



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Efectos de la Aplicación Tópica de Melatonina y
Apigenina en la Aceleración de la Formación
Ósea en Procesos de Osteointegración
Implantológica

D. Tareq Abdal Latef Ali Abu Taha

2015

A mis padres y a mi querida mujer nur y nuestro hijo obayda, a mis hermanos Eyas, su esposa Dra Razan, Thamer y su esposa Yasmin, Ali, Mohammad, Enas y su esposo Mohammad; a mis sobrinos Sara, Zaid, Yosef, Mayar, Faisal y Ali; y mi tia Nuha.

Agradecimientos

Agradecimientos

Son muchas las personas que me han ayudado a desarrollar este proyecto de investigación. Sin embargo, quisiera resaltar, en primer lugar, la colaboración que me ha brindado el Dr. José Luis Calvo Guirado, que no solo escuchó con interés mis inquietudes sobre el tema de la implantología dental, sino que siguió mis avances desde el principio y me guió hasta el final con infinita paciencia.

Además, cuando me permitió formar parte de su equipo de investigación en un tema tan interesante como pionero (como los que él suele abordar), abrió mi mente al estudio especializado y mis manos al servicio del avance de la odontología. Quisiera, asimismo, destacar que su condición de académico excelente está firmemente asentada en su extraordinaria condición humana.

Por ello, me hizo fácil lo difícil desde el primer momento; cosa que especialmente agradezco dada mi situación de extranjero. Ha sido un honor trabajar con él en ambos sentidos. Quisiera también hacer extensivo este agradecimiento al Dr. Carlos Pérez Albacete y a la Dra. María Piedad Ramírez Fernández.

No me gustaría olvidar en este apartado dedicado a los agradecimientos a mis compañeros y compañeras que me han ayudado durante todo este tiempo. He aprendido mucho de ellos. Al cariño que les tengo se suma ahora la admiración y el respeto.

Me dejo para el final la parte de mi vida más importante: mi familia. A todos ellos les agradezco su apoyo: Eyas, Dra Razan, Thamer, Ali, Mohammad, Enas, Mohammad, Sara, Zaid, Yosef, Mayar, Faisal, Ali. Aunque es difícil destacar a uno de entre todos ellos, quisiera hablar de Ali. Querido hermano, pese a estar muy lejos de nosotros, te llevaré en el corazón toda mi vida.

Y termino este apartado con mi familia más cercana: A mi mujer Nur por su sacrificio, ayuda y apoyo constante y mi hijo Obayda, desde que nacio, ha sabido convivir con “padre y una tesis.” Ellos han sido, al final, los que han soportado las dificultades y falta de tiempo que implica el estudio de un doctorado y la redacción del presente trabajo de investigación. He pasado mucho tiempo lejos de ellos; un tiempo que, a partir de ahora, espero recuperar con creces.

Existen otras muchas personas que han contrubuido, muchas veces sin saberlo, a que yo realice este trabajo. Personas de las que he aprendido. Alumnos, compañeros y profesores del master implantología oral y biomateriales de los cuales aprendo todos los días, especial agradecimiento quiero expresar a la Dra. Mari Carmen Mompean.

A TODOS VOSOTROS, MUCHAS GRACIAS.

“EL ÉXITO ES LA SUMA DE PEQUEÑOS ESFUERZOS,
REPETIDOS, DÍA TRAS DÍA”

(Anónimo)

Índice de abreviaturas:

AI: Autoinjertos

AL: Aloinjertos

ALP: Fosfatasa alcalina

AP: Aloplásticos

AP1: Activador de la proteína 1

BMPs: Proteínas morfogenéticas del hueso

BSP: Proteínas de superficie

Cbfa1/Runx2: Factor de transcripción específico de osteoblastos

COL1A1: Colágeno tipo I

CXCLs: Monocinas

DFDBA: Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft.

FDBA: Freeze-Dried Bone Allograft.

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos

HA: Polímeros hidroxiapatita

IFN- γ : Citoquina producida por los linfocitos T

ILs: Interleucinas

MCPs: Proteínas quimiotácticas monocíticas

M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos

MEC: Matriz extracelular

NF- κ B: Factor nuclear κ B

NO: Óxido nítrico

OCN: Osteocalcina

OPG: Osteoprotegerina

OPN: Osteopontina

PGS: Prostaglandinas

PKC: Proteína quinasa C

PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento

RANK: Receptor activador del factor nuclear κ B

RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear

κ B rhBMP-2: Proteína morfogénica ósea humana recombinante

ROG: Regeneración ósea guiada

RTG: Regeneración tisular guiada

Runx2: Factor de transcripción 2-relacionado con RUNT

RZR: Receptor nuclear de la melatonina

TCP: Fosfato Tricálcico

TNF- α : Factor de necrosis tumoral

TRAP: Fosfatasa ácida tartrato-resistente

XE: Xenoinjertos

β -TCP: Cerámica de beta fosfato tricálcico

Índice

Índice

I. Resumen/Abstract	
1. Introducción	1
1.1 Bases moleculares del metabolismo óseo	2
1.2 Regeneración ósea	7
1.3 Técnicas de regeneración ósea	10
1.4 Biomateriales	12
1.5 Sustancias osteogénicas	13
2. Objetivos	39
3. Material y métodos	41
3.1 Materiales	42
3.2 Método	45
4. Resultados	55
4.1 Treinta días	56
4.2 Sesenta días	59
4.3 Noventa días	62
4.4 Comparación entre los periodos de estudio	65
5. Discusión	68
6. Conclusiones	77
7. Bibliografía	79
8. Anexos	100

Resumen

Resumen:

El objetivo de este estudio ha sido evaluar los efectos de la aplicación de melatonina y apigenina sobre la neoformación y maduración ósea en 30, 60 y 90 días en alveolos post extracción. La muestra está compuesta por nueve perros *Beagle* de entre 14 y 16 meses. Los resultados ponen de manifiesto, respecto a la melatonina, un porcentaje bajo de hueso inmaduro a los 30 y a los 60 días de su aplicación, siendo los resultados con diferencia significativa entre este grupo y el grupo control. Sin embargo, el aumentó en la madurez ósea tras la aplicación de melatonina es mayor que si se aplica apigenina, y la diferencia entre la aplicación de ambas sustancias es estadísticamente significativa tanto en el primer como en el segundo mes. A los 90 días no se han encontrado diferencias significativas entre las sustancias aplicadas, ni entre estas sustancias y el grupo control.

Abstract:

The aim of this study is to evaluate the effects of the application of melatonin and apigenin in the formation and maturation of new bone at 30, 60 and 90 days in post-extraction sites. The sample is composed of nine *Beagle* dogs between 14 and 16 months of age. Regarding the melatonin, the results show a low percentage of immature bone within 30 and 60 days of its application, being the results significantly different between this group and the control group. However, the increase in bone maturity after the application of melatonin is bigger than when apigenin is applied, and the difference between the applications of both substances is statistically significant in the first moth as well as in the second month. Within the 90 days there are no significant differences between the applied substances, neither between these substances and the control group.

Introducción

1. Introducción

Los pacientes con atrofia severa de los procesos alveolares maxilares, o con senos maxilares excesivamente neumatizados, presentan dificultades para la osteointegración de los implantes debido a la ausencia de hueso tanto en altura como en anchura. Por ello, estos pacientes suponen un reto a la hora de rehabilitar estos maxilares. **(González-García R. y cols. 2005)**. Debido a las dificultades que se producen para una adecuado osteointegración durante la rehabilitación, los injertos óseos constituyen una opción terapéutica para obtener un volumen y morfología óseos apropiados para tales fines.

La regeneración ósea, por tanto, tiene como objetivo crear un hueso sano y suficiente en los procesos alveolares de los maxilares, para cubrir defectos óseos periodontales o para tener procesos alveolares adecuados donde colocar prótesis dentales de manera convencional o implantes dentales osteointegrados.

Osteointegración se define como la conexión directa estructural y funcional entre el hueso vivo y la superficie de un implante **(Branemark PI. y cols. 1985)**. Los implantes osteointegrados requieren para su colocación de una cantidad suficiente de hueso alveolar que los cubra y soporte.

En la presente investigación se afrontan las cuestiones antes referidas desde un punto de vista teórico, abordando los mecanismos existentes para la regeneración ósea (osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción), así como los biomateriales empleados para la reconstrucción; y práctico, a partir de una investigación realizada con perros *Beagle* en la que se han analizado los resultados obtenidos en la regeneración ósea tras aplicarles melatonina o apigenina.

1.1 Bases moleculares del metabolismo óseo:

El tejido óseo es un tejido capaz de regenerarse tras un trauma; de hecho, está en constante proceso de transformación o remodelado. Dentro de la matriz extracelular (MEC) se encuentran las células características de este tejido: osteógenas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Figura 1).

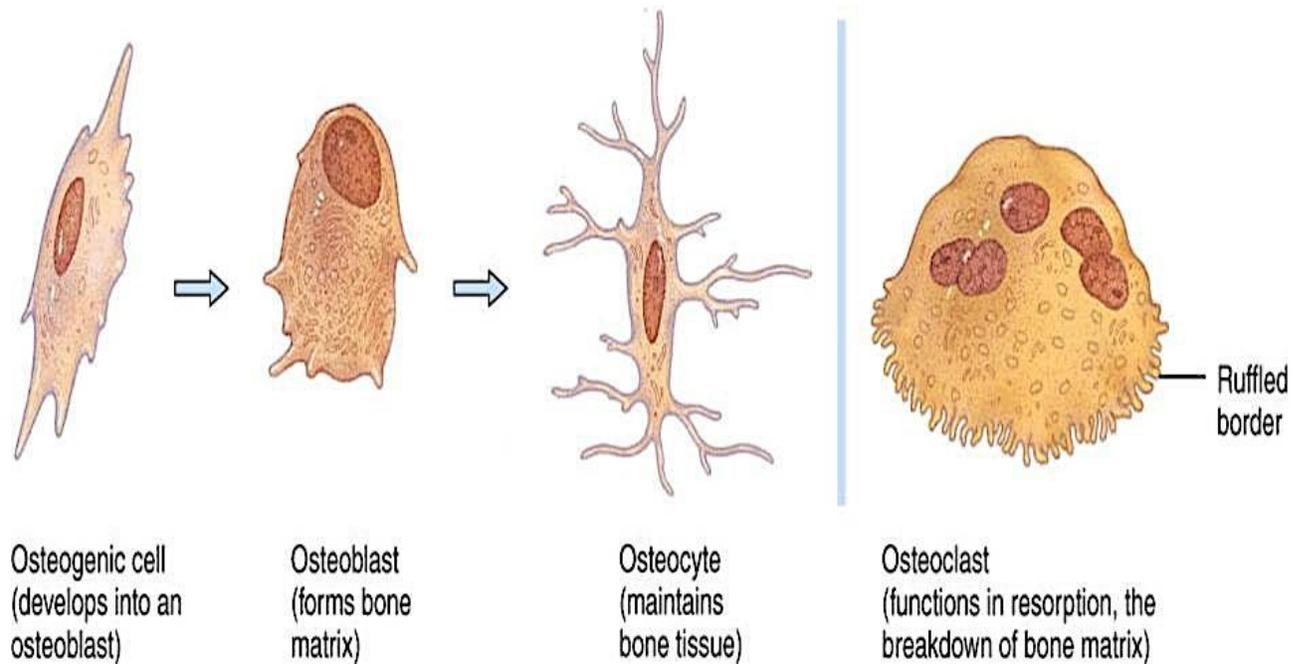


Figura 1. Las células osteogénicas se transforman en osteoblastos que darán lugar a los osteocitos. (Fernández-Tresguerres I. y cols. 2006).

La función de los osteoblastos es la de formar hueso y sintetizar proteínas y factores de crecimiento, liderando el proceso de regeneración ósea. Los osteocitos, por su parte, participan de dicha función y mineralizan la matriz extracelular (Fernández-Tresguerres I. y cols. 2006).

Finalmente, los osteoclastos degradan y reabsorben la matriz ósea, generando compuestos reactivos de oxígeno que oxidan las moléculas que forman parte de la matriz extracelular, como el ácido hialurónico y el colágeno **(Abarrategi A. 2009)**.

1.1.1 Proliferación y diferenciación osteoblástica:

La diferenciación hacia la línea celular osteoblástica es controlada, en un primer estadio, por la expresión génica del factor de transcripción Cbfa1/Runx2 y las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), que son los primeros indicadores de la diferenciación osteogénica ya que dan lugar a la transformación de una célula madre mesenquimal en una célula osteoprogenitora **(Fernández-Tresguerres I. y cols. 2006)**.

Estos precursores celulares diferenciados expresan proteínas específicas para su función, o marcadores, en la membrana celular, de modo que en estas células osteoprogenitoras tiene lugar la expresión génica del polipéptido α -1 del colágeno tipo I (COL1A1) y de la osteopontina (OPN), que regulan la proliferación y diferenciación de estas células hacia preosteoblastos. Del mismo modo, posteriormente tendrá lugar la expresión de la fosfatasa alcalina (ALP) y la sialoproteína ósea (BSP), que son proteínas de superficie que participan en la diferenciación hacia osteoblastos maduros para la maduración de la matriz ósea **(Heersche JNM. y cols. 2002)**.

La osteocalcina (OCN) junto con la osteopontina (OPN) son marcadores osteog3nicos en las fases finales de la diferenciaci3n osteobl3stica y regulan la mineralizaci3n del tejido 3seo dando lugar finalmente a la diferenciaci3n de los osteoblastos en osteocitos o c3lulas de revestimiento (Arbolea L. y cols. 2013). (Figura 2).

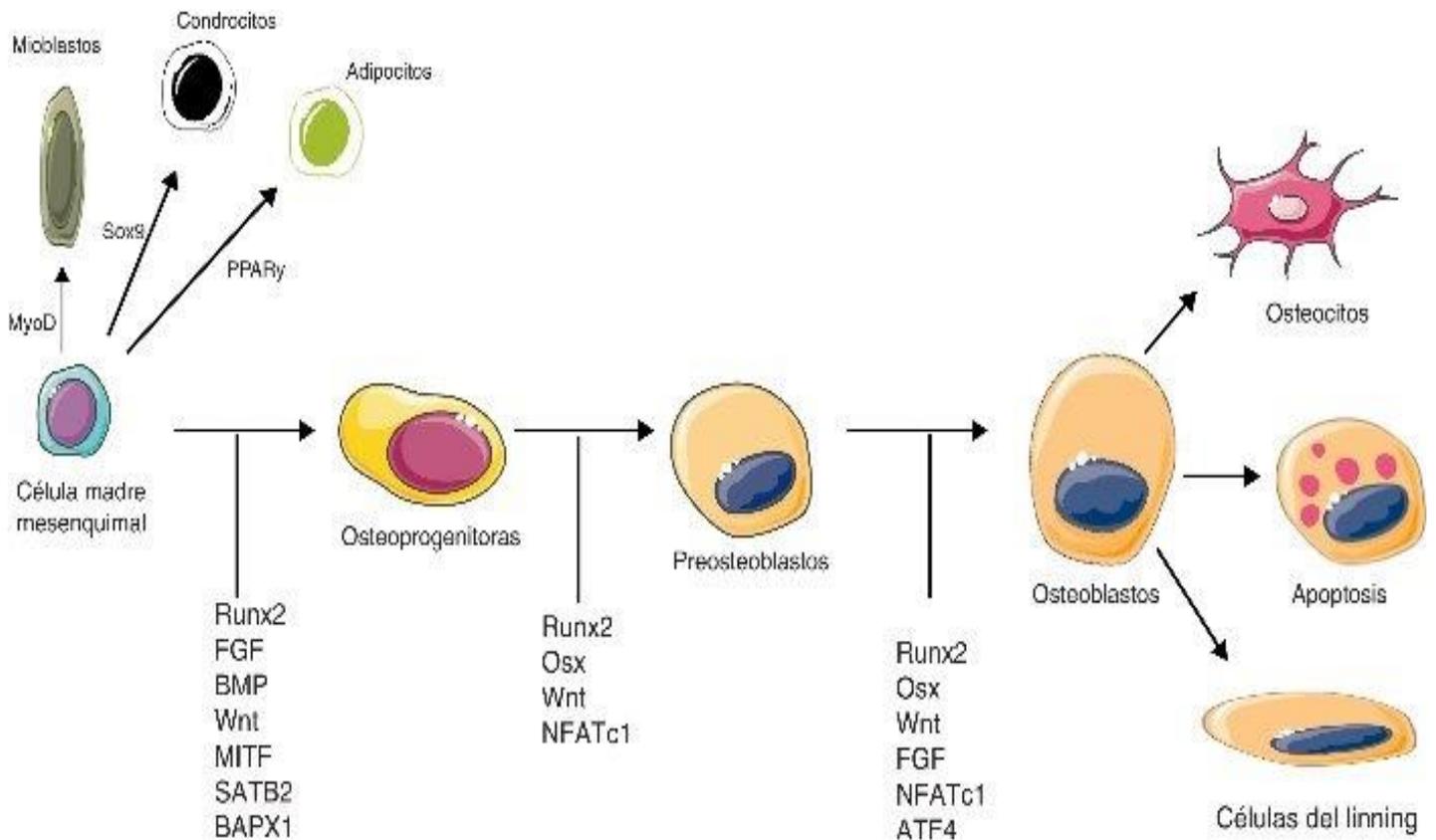


Figura 2. Se3ales moleculares que desempe3an un papel clave en la diferenciaci3n y activaci3n osteobl3stica.

(Fuente imagen: <http://www.reumatologiaclinica.org/>)

1.1.2 Osteoclastogénesis y actividad osteoclástica:

La regulación de la reabsorción ósea tiene lugar mediante complejas interacciones entre el osteoclasto y otras células presentes en el microambiente del hueso.

Dicha regulación se produce actuando sobre el número de osteoclastos presentes o bien sobre la capacidad reabsortiva de dichos osteoclastos. Las células presentes en el microambiente de los osteoclastos incluyen las células medulares progenitoras, osteoblastos, macrófagos y linfocitos T. Todas estas células, incluyendo los osteoclastos, generan citoquinas y factores de crecimiento que actúan sobre la formación y/o actividad osteoclástica . **(Mundy GR. y cols. 1993).**

En la osteoclastogénesis el factor estimulante de la colonia de macrófagos (M-CSF) es requerido en fases tempranas para la formación de células gigantes multinucleadas a partir de células madre hematopoyéticas de la médula ósea (precursoras de macrófagos y monocitos). No obstante, la regulación de la osteoclastogénesis está centrada en 3 llaves moleculares **(Mikán JF. y cols. 2015):**

1. OPG (osteoprotegerina, una proteína soluble sintetizada por los osteoblastos y preosteoblastos).
2. RANKL (un ligando situado en la superficie de los osteoblastos y preosteoblastos).
3. RANK (un receptor situado en la membrana osteoclastos y preosteoclastos).

La interacción entre RANKL y su receptor RANK inicia la diferenciación y actividad osteoclástica, incrementando la reabsorción. Sin embargo, en presencia de OPG, la unión de esta con el RANKL inhibe la unión de este ligando su receptor RANK y por tanto, también se inhibe la diferenciación osteoclástica **(Simonet WS. y cols. 1997; Lacey DL. y cols. 1998; Burgess TL. y cols. 1999).**

Además, existen numerosos factores humorales de acción local que ejercen algún efecto sobre la reabsorción ósea (Figura 3). (Lafita J. y cols. 2003).

Entre las citocinas que inducen aumentos de la reabsorción se encuentran muchas de las que participan como mediadores de la inflamación. Así, se ha demostrado que incrementan la actividad osteoclástica, directa o indirectamente, la IL-1, IL-6, IL-7, IL-11, IL-17 y el TNF- α . Por el contrario, otras como la IL-4, IL-10 o el IFN- γ ejercen un efecto inhibitor. (Riancho JA. y cols. 2003).

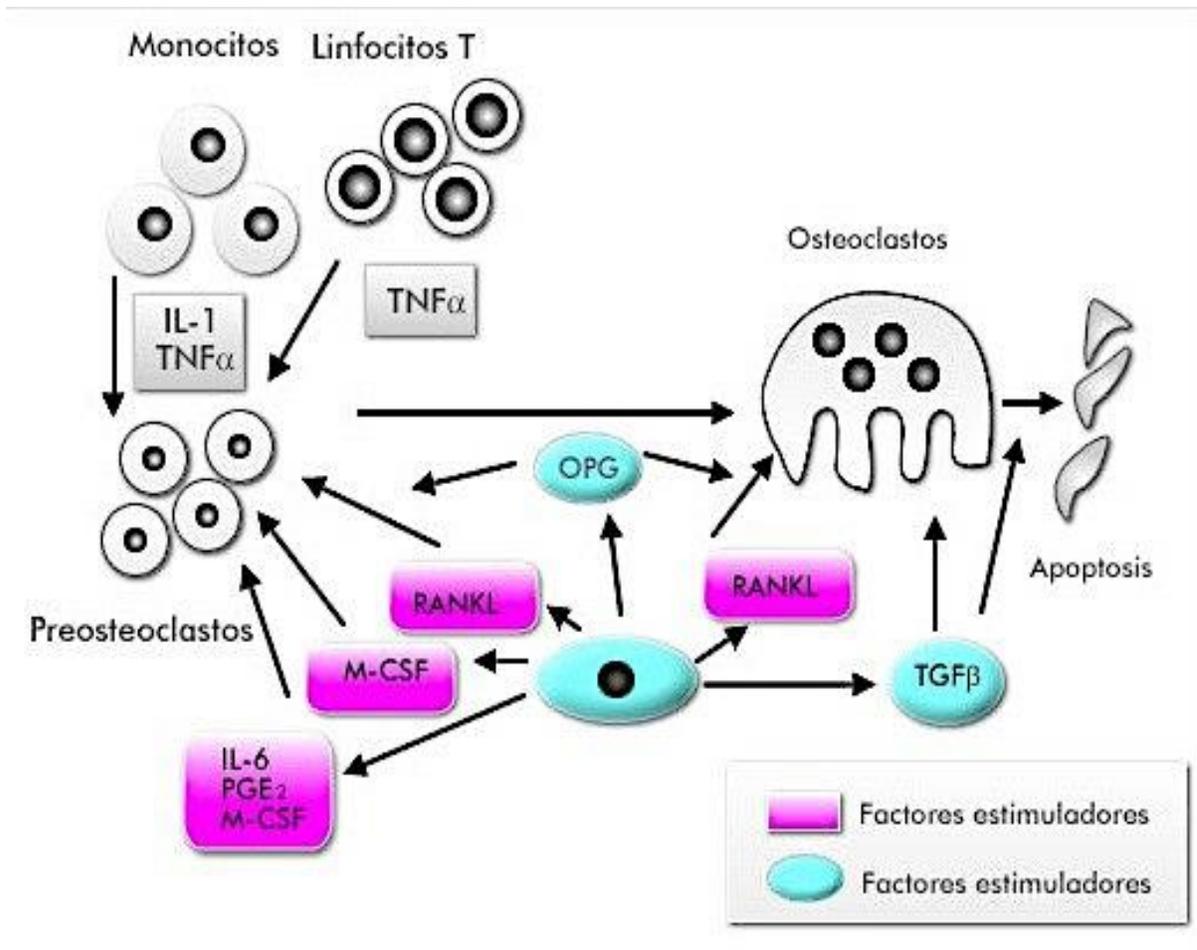


Figura 3. Mecanismos de regulación de la remodelación ósea. (Lafita T. y cols. 2003).

1.2 Regeneración ósea

1.2.1 Osteogénesis:

La osteogénesis es la neoformación ósea mediada por el trasplante en el material de relleno de células vivas que llevan a cabo la regeneración ósea de una forma directa. (Figura 4) Este mecanismo se emplea en los autoinjertos y, especialmente, en los injertos córtico-esponjosos y particulados de esponjosa, debido a su más rápida revascularización (**Velez MA. y cols. 2009**).

Por tanto, los materiales osteogénicos son capaces de formar hueso a partir de las células vivas que poseen (osteoblastos y osteocitos), que se reproducirán para alcanzar ese objetivo. De este modo, durante la osteogénesis, el propio injerto, al llevar en sí mismo células capacitadas para establecer centros de crecimiento y formación ósea, es apto para formar tejido óseo en ausencia de células mesenquimatosas indiferenciadas (Figura 4).

El hueso autólogo es el único material de injerto con capacidad osteogénica; pudiendo tratarse de hueso esponjoso y/o medular.

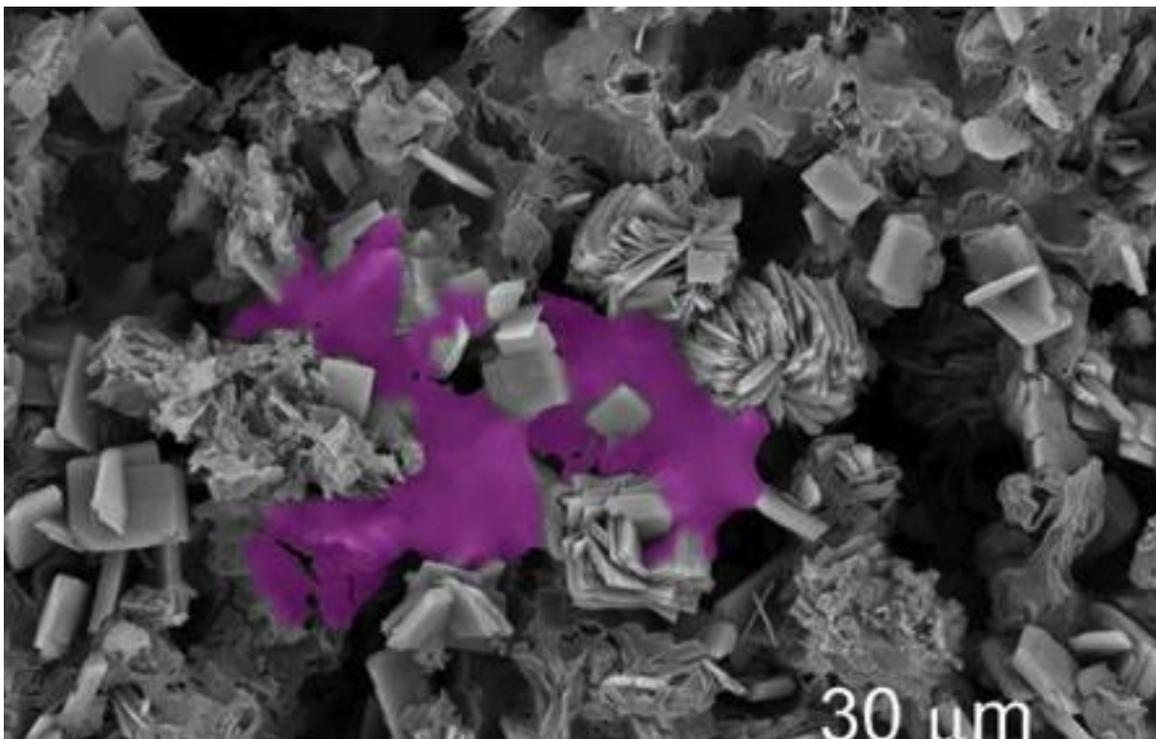


Figura 4. Célula osteoblástica humana colonizando el nuevo biomaterial (en púrpura), tras 72 horas de cultivo in vitro. CSIC. (Fuente imagen: <http://www.heraldo.es>)

1.2.2 Osteoinducción

La osteoinducción es la capacidad que tienen algunos materiales para liberar determinadas sustancias llamadas “osteoaductoras”, que pueden inducir la formación de hueso a partir de un mecanismo endocondral en zonas alejadas del margen del lecho receptor (**Infante-Cossio P. y cols. 2007**) (Figura 5).

Así, los materiales osteoaductivos promueven la estimulación celular en la herida o su entorno, provocando la conversión fenotípica de células precursoras capaces de formar hueso.

A continuación se exponen algunos ejemplos de estos materiales osteoaductivos (**Tortolini P. y cols. 2012**) :

- a) El hueso autólogo en la fase de reabsorción que libera proteínas morfogenéticas.
- b) El plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) que estimula la quimiotaxis, diferenciación y proliferación celular.
- c) Las proteínas morfogenéticas (**Oporto VG. y cols. 2008**). En la práctica, este tipo de regeneración ósea, solo se consigue con el injerto autólogo y alogénico.

1.2.3 Osteoconducción:

La osteoconducción es el proceso por el cual el material inorgánico implantado ofrece una matriz para el crecimiento de células óseas progenitoras a partir de los márgenes del defecto. (Figura 5) El material empleado para tal fin puede ser permanente o reabsorbible. Este osteoaductor puro no forma hueso de una forma intrínseca, su osificación tampoco es endocondral y la formación de hueso que promueve siempre comienza en la periferia (**Infante-Cossio P. y cols. 2007**).

Mediante la osteoconducción se proporciona una matriz o estructura física apropiada para el crecimiento de hueso nuevo, por lo que estos materiales actúan como guías para el desarrollo óseo y permiten que se deposite el hueso nuevo que se va formando por sustitución progresiva (Nasr H. y cols. 2000; Mastrogiacomo M. y cols. 2005; Mastrogiacomo M. y cols. 2006; Maestre-Ferrín L. y cols. 2009; Guskuma MH. y cols. 2010).

A continuación se exponen algunos ejemplos de materiales osteoconductores:

- d) El hueso autólogo.
- e) La fibrina autóloga.
- f) La hidroxiapatita reabsorbibles.
- g) El sulfato de calcio.
- h) El fosfato tricálcico.
- i) La fibrina liofilizada.
- j) El hueso desmineralizado.
- k) Los cristales cerámicos bioactivos.

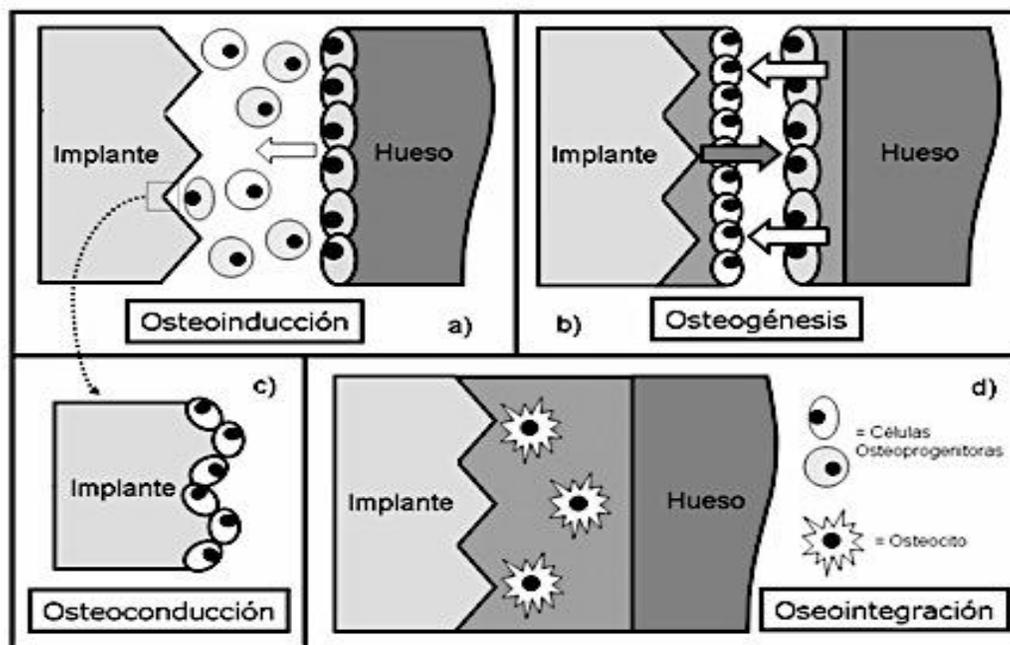


Figura 5. La osteoinducción permite la diferenciación de células osteoprogenitoras. La osteogénesis se produce cuando las células osteoprogenitoras alcanzan la superficie del implante o bien por la proliferación de estas células desde el borde del hueso. El crecimiento celular coloniza la superficie del implante (osteoconducción). La presencia de osteocitos alrededor del implante permite que se de la osteointegración en la interfase hueso-implante. (Fuente imagen: www.bvs.sld.cu.)

1.3 Técnicas de regeneración ósea

1.3.1 Regeneración tisular guiada (osteopromoción):

Esta técnica desarrollada en periodoncia para el tratamiento de los defectos óseos periodontales, consiste en facilitar el crecimiento y regeneración del tejido óseo, separando a través de una membrana el hueso alveolar periodontal de los tejidos blandos superiores (encía, mucosa y periostio).

(Figura 6) De esta forma se evita la invasión de la zona que va a ser regenerada por parte de las células del epitelio gingival y del tejido conjuntivo, y se favorece el crecimiento de las células progenitoras del ligamento periodontal en la superficie radicular (**Pato J. y cols. 2010**).

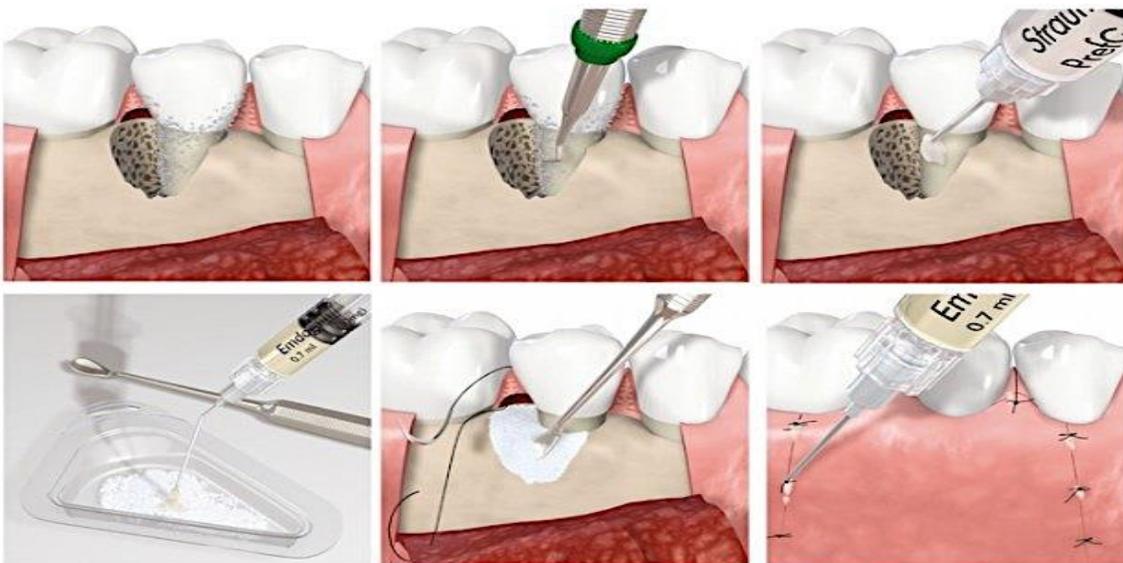


Figura 6. Técnica de regeneración periodontal.
(Fuente imagen: <http://www.clinicaninoles.es/>)

La regeneración ósea guiada se ha ido incorporando a la práctica implantológica con buenos resultados clínicos. Frecuentemente se utiliza de forma simultánea a la inserción de los implantes para favorecer la cicatrización y aumentó del volumen óseos que aseguren la estabilidad primaria del implante y su oseointegración (**Quevedo L. y cols. 2015**).

1.3.2 Osteodistracción:

Esta técnica hace posible el crecimiento de los huesos en longitud, altura o anchura mediante la colocación de unos dispositivos especialmente diseñados para ello llamados "distractores óseos" (Figura 7). (Quevedo L. y cols. 2015).

En esta técnica se realiza una fractura ósea y se va separando lenta y progresivamente ambos polos de fractura. Para ello se utilizan unos elementos quirúrgicos denominados osteodistractores los cuales van separando los fragmentos óseos produciendo un elongación del coágulo de fibrina (callo de fractura) que aparece entre los dos fragmentos tras la fractura del hueso, para crear un puente óseo entre ambos.

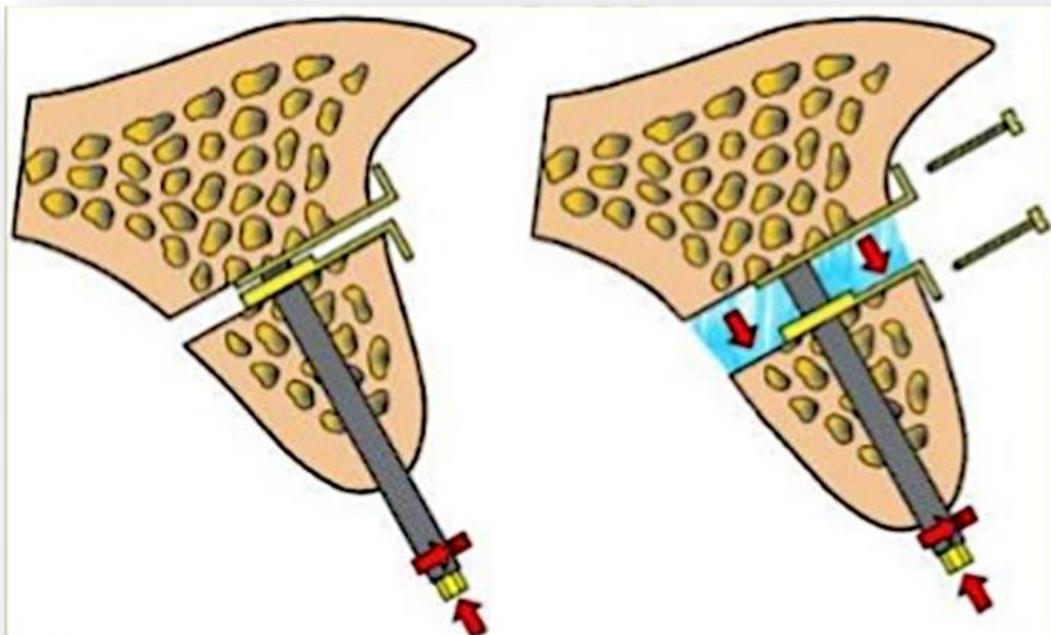


Figura 7. Técnica de Crecimiento de Hueso con Distractores óseos.

(Quevedo L. y cols. 2015)

1.4 Biomateriales:

Los biomateriales o “sustitutos biológicos” deben cumplir una serie de requisitos para que resulte óptima su utilización en estos casos (**Oporto VG. y cols. 2008**).

- Mantener un sustrato celular vivo.
- Conservar las características estructurales internas.
- Mantener la geometría tridimensional.
- Permitir la migración celular a la zona del biomaterial.
- Facilitar la unión celular en superficies sintéticas, glicosaminoglicanos y proteínas de la matriz extracelular.
- Mantener una adecuada circulación colateral.
- Favorecer el desarrollo y mantenimiento de un apropiado fenotipo celular.
- Ayudar a la liberación de proteínas morfogenéticas y proteínas reguladoras.

Los biomateriales que cumplen con estas características y que actualmente se utilizan en la regeneración ósea se clasifican de la siguiente forma (**Olate S. y cols. 2007; Oporto VG. y cols. 2008**):

- Autoinjertos (AI): hueso obtenido del mismo paciente.
- Aloinjertos (AL): biomaterial procesado para ser incorporado a sujetos de la misma especie (*Freeze–Dried Bone Allograft* o FDDBA; *Demineralized Freeze–Dried Bone Allograft* o DFDBA; y Proteína Morfogenética o BMP).

- Aloplásticos (AP): sustitutos óseos sintéticos (cerámicas, polímeros hidroxiapatita o HA; fosfato tricálcico o TCP; y sulfato de calcio).
- Xenoinjertos (XE o matrices óseas): biomaterial procesado a partir de especies no humanas bovina equina, porcina o coralina.

En la búsqueda de nuevos biomateriales, naturales o sintéticos para ser aplicados en los métodos de regeneración ósea, se ha analizado el comportamiento de varios materiales. En una de las investigaciones se evaluó el injerto de hueso autólogo, un xenoinjerto bovino (Endobon ®) y otro porcino (MP3®) y la hormona melatonina.

Los resultados del análisis estadístico mostraron un mejor comportamiento de la melatonina respecto al control y los xenoinjertos porcino y bovino, acelerando esta hormona el proceso de la regeneración. En dicho estudio se concluyó que la melatonina actúa como un agente biomimético, reduciendo la inflamación y favoreciendo la regeneración. **(Modelo experimental de la respuesta ósea a implantes y melatonina: estudio radiológico e histomorfométrico 2009)**

1.5 Sustancias osteogénicas:

En cuanto a las sustancias osteogénica, cabe destacar que la utilización de hormonas como la melatonina y sustancias de origen natural como los flavonoides o el quitosán poseen efectos estimuladores a escala ósea que pueden resultar prometedores en términos de neoformación para los defectos óseos.

Aplicaciones en periodoncia

Como se ha comentado anteriormente, se están llevando a cabo varias investigaciones utilizando quitosán como inductor de la regeneración ósea **(Chesnutt BM. y cols. 2009; Oktay E. y cols. 2010)**, y se ha observado que tras la aplicación de este compuesto a los defectos óseos aumenta la formación de hueso **(Klokkevold PR. y cols. 1996)**. Se ha probado en animales el efecto

de las membranas de quitosán en los procesos de regeneración ósea guiada (ROG) obteniéndose buenos resultados (**Kojima K. y cols. 2004; Shin SY. y cols. 2005; Knight DK. y cols. 2007**).

Estos resultados muestran el enorme potencial del uso de estas membranas de quitosán en los procedimientos de regeneración tisular guiada (RTG) y en la terapia regenerativa periodontal. Un estudio sobre perros de raza *Beagle* (**Yeo YJ. y cols. 2005**) ha demostrado que, en comparación con los tratamientos convencionales, la regeneración tisular guiada con membranas de quitosán reabsorbibles estimulan la regeneración ósea en la cavidad oral (**Kung S. y cols. 2011**).

En otro estudio llevado a cabo con perros *Beagle* se estudió el efecto de la aplicación tópica de melatonina mezclada con hueso porcino colagenizado en la osteointegración (contacto implante hueso) de implantes dentales después de 3 meses a partir de su inserción. Se evaluó la pérdida ósea del hueso crestral a 3 meses en implantes sin tratar, implantes recubiertos con melatonina e implantes con melatonina mezclada con hueso porcino. (**Piatelli M. y cols. 1999**)

Los resultados cuatro semanas después de la inserción del implante mostraban que la melatonina con hueso colagenizado porcino aumentaba significativamente la osteointegración y reducía la reabsorción de la cresta ósea alveolar.

Finalmente, cabe destacar que es interesante el uso de biomateriales biocompatibles donde los procesos permitan la actuación de agentes biomiméticos para la formación de hueso nuevo (**Piatelli M. y cols. 1999; Kim SH. y cols. 2004; Orsini G. y cols. 2006; Nannmark U. y col. 2008**).

1.5.2 Melatonina

Se trata de una molécula (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Figura 8) secretada principalmente por la glándula endocrina pineal, aunque también es posible su síntesis en otros tejidos como el de la retina, timo, bazo, ovarios, testículos, intestino y linfocitos. Se sintetiza a partir del aminoácido esencial triptófano.

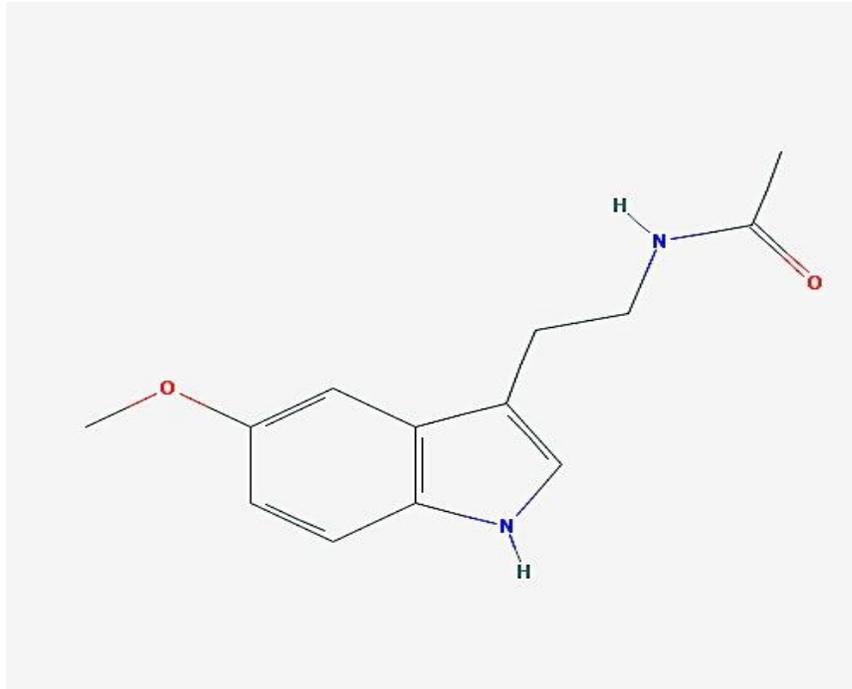


Figura 8. Molécula de Melatonina

(National Center for Biotechnology Information. 2015)

(Fuente imagen: NIH. U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Melatonin#section=Top>)

Su síntesis está influida por factores ambientales tales como las diferentes estaciones del año, los cambios de luz y los cambios de temperatura. A esta regulación por los ciclos de luz y oscuridad del entorno es lo que llamamos “ritmo circadiano” (Figura 9). También existen factores endógenos como el estrés y la edad que modulan la secreción de esta hormona (Royano P. Y cols. 2007).

La síntesis de melatonina por la glándula pineal es inhibida por la luz y estimulada por la oscuridad, por lo que su producción varía con la duración de la noche. Del mismo modo, su síntesis, al igual que la de otras hormonas, desciende con la edad, de tal forma que entre los 35-40 años empieza a descender llegando a disminuir su producción en un 40% hacia los 55-65 años **(Acuña-Castroviejo D. y cols. 2015)**.

La melatonina, debido a su naturaleza altamente lipofílica, una vez sintetizada por la glándula pineal, se difunde por la sangre alcanzando rápidamente otros fluidos corporales como la saliva, el fluido cerebroespinal, el líquido folicular ovárico, el líquido amniótico, el semen y el líquido de la cámara anterior del ojo **(Díaz B. y cols. 1998)**.

La función más conocida de la melatonina es su papel de “reloj biológico”, informando al organismo sobre el momento del día (fotoperiodo) y época del año en la que estamos, todo según la duración de las horas de luz y oscuridad. Además de esto (y en relación con la anterior idea), esta hormona tiene efectos sobre los sistemas endocrino y reproductivo. La melatonina, como podemos ver, actúa sobre distintos aspectos de la fisiología humana, mediante reacciones macrocelulares relacionadas con la unión de la indolamina a receptores de membrana **(Simko F. y col. 2007; Girgert R. y cols. 2009; Imbesi M. y cols. 2009; Gómez-Moreno G. y cols. 2012)**.

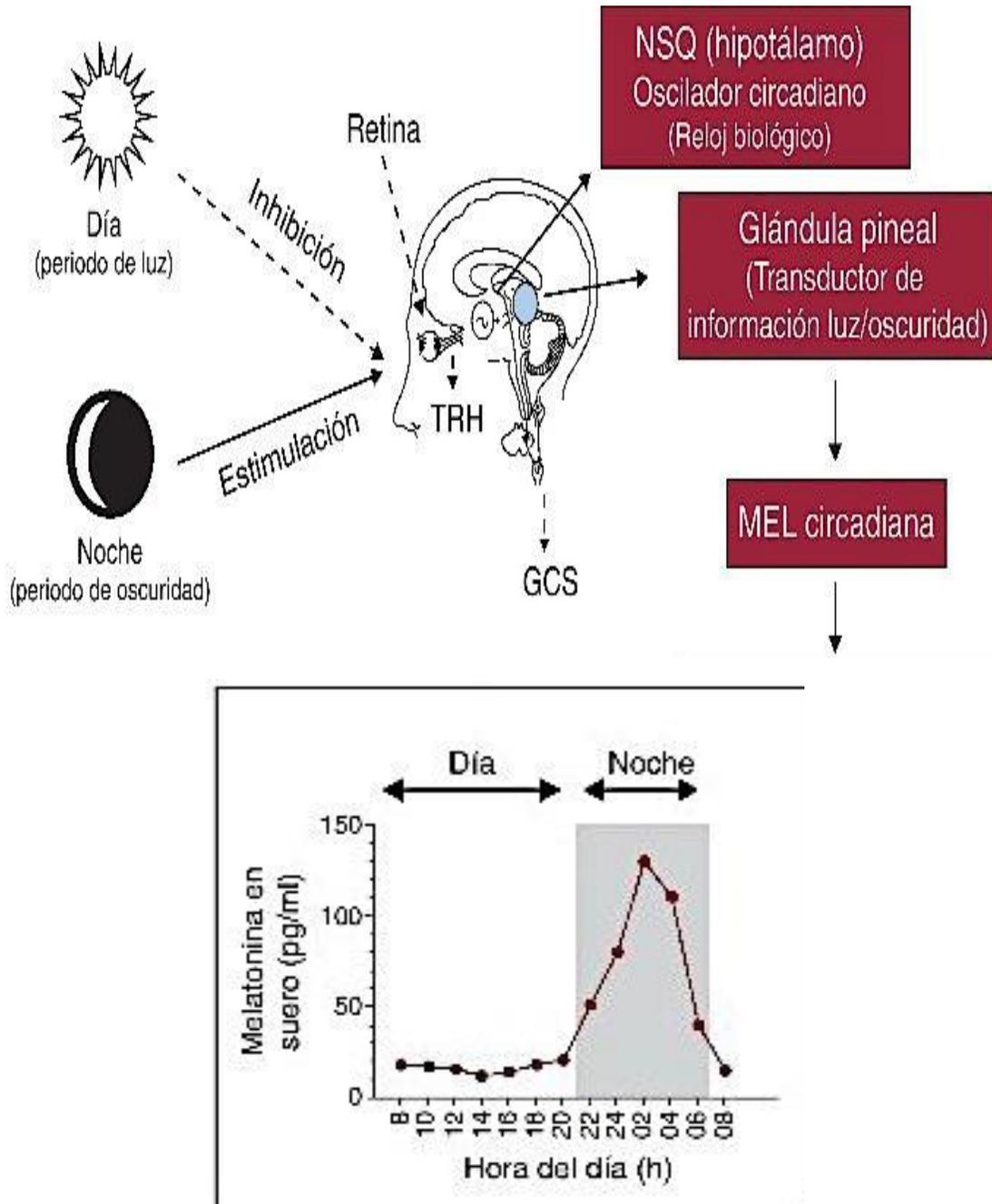


Figura 9:

Figura 9: Regulaci3n fisiol3gica de la melatonina por el entorno de luz/oscuridad detectado por la retina **GCS**: ganglios cervicales superiores; **MEL**: melatonina; **NSQ**: n3cleo supraquiasm3tico; **TRH**: tracto retinohipotal3mico.

(Dominguez-Rodriguez A y cols. 2012).

Del mismo modo, en algunos estudios (**Arias J. y cols. 2003; Sánchez M. y cols. 2006; Guerrero JM. y cols. 2007**) se ha comprobado que también tiene un efecto modulador sobre el sistema inmune. Este efecto modulador consiste en intervenir en los procesos de infección, inflamación, así como también en procesos autoinmunes.

Actualmente se están estudiando otras propiedades de la melatonina como, por ejemplo, su propiedad antioxidante neutralizadora de radicales libres y su propiedad citoprotectora, así como oncosupresora.

1.5.2.1 Mecanismo de acción

La melatonina tiene distintas forma de actuar una vez sintetizada:

De forma endocrina: la hormona sintetizada actúa sobre órganos y tejidos a los que llega a través del torrente sanguíneo.

De forma paracrina: la hormona actúa sobre células vecinas.

De forma autocrina: la hormona actúa sobre la misma célula.

Los mecanismos de acción de esta molécula una vez llega a la célula son múltiples y complejos. Se sabe, por ejemplo, que se puede unir a los receptores de la membrana plasmática y que debido a su naturaleza lipofílica, puede penetrar la célula con facilidad e incluso llegar a su núcleo para unirse a los receptores nucleares. En la célula existen receptores nucleares y proteínas citoplasmáticas que se unen a la melatonina. Del mismo modo, la melatonina puede captar radicales libres y neutralizar un gran número de reactivos que se consideran tóxicos como, por ejemplo, los reactivos a base de oxígeno y de nitrógeno, causantes del dolor y la inflamación (**Guerrero JM. y cols. 2007**).

Asimismo, la melatonina es capaz de actuar de forma indirecta estimulando la síntesis de otros antioxidantes intracelulares, además de proteger los enzimas antioxidantes de la célula.

En la siguiente imagen (Figura 10) se ilustran los diferentes mecanismos de acción de la melatonina. Esta se puede unir directamente a los receptores de membrana citoplasmática, o bien puede atravesar directamente la membrana y neutralizar los radicales libres o las proteínas del citoplasma. También se puede unir a los receptores nucleares e interactuar con ellos (**Esposti D. y cols. 1994**).

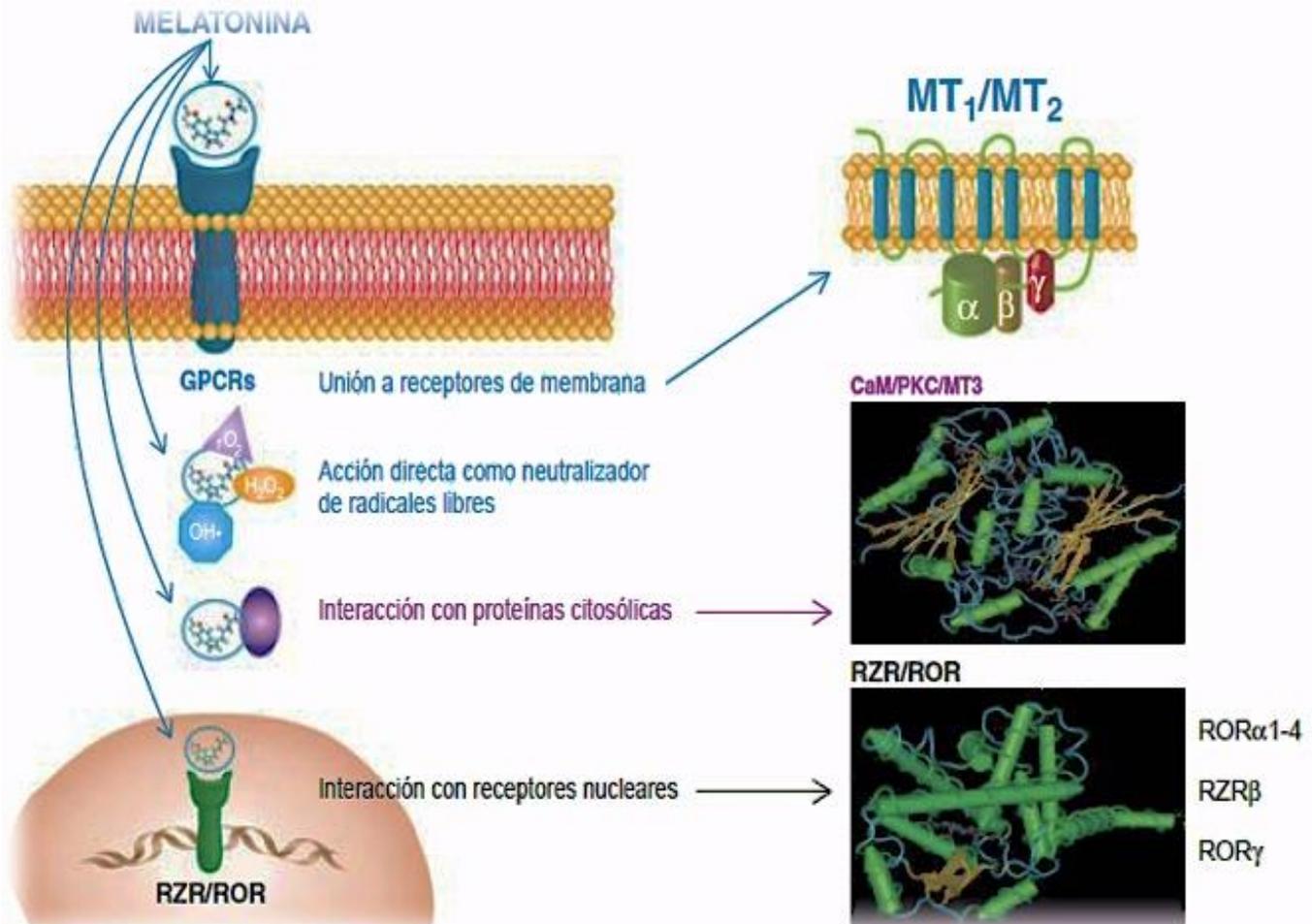


Figura 10. Mecanismo de acción de la Melatonina

GPCR: receptores acoplados a proteína G; CaM: calmodulina; PKC: proteína quinasa C; RZR/ROR: subfamilia de receptores retinoicos.
(Guerrero JM. y cols. 2007)

Al unirse a los receptores de membrana los activa y desencadena una serie de reacciones celulares que dan lugar a un “efecto” antiinflamatorio, analgésico y neuropático. Del mismo modo, es capaz de neutralizar los radicales hidroxilos, radicales implicados en el desarrollo de enfermedades degenerativas que aparecen durante el envejecimiento (**Guerrero JM. y cols. 2007**).

Ya hemos visto que la melatonina influye en varias reacciones metabólicas y celulares, pudiendo actuar a nivel de membrana, como es el caso de la unión de la melatonina a receptores de membrana, o incluso actuar a nivel intracelular. De hecho, se han identificado receptores nucleares para la melatonina en órganos periféricos y en células del sistema nervioso central, ya que la melatonina puede actuar en estos dos niveles: neurales como el hipocampo, hipófisis, retina, etc, y no neurales, como las gónadas, el intestino y otros (**Acuña-Castroviejo D. y cols. 1994; Hirose T. y cols. 1994; Carlberg C. y cols. 1994**).

A nivel intracelular la melatonina puede atravesar la membrana celular y unirse a proteínas propias del citosol, como son la quinasa C, la calmodulina, la calreticulina, etc (**Huerto-Delgadillo L. y cols. 1994; Anton-Tay F. y cols. 1998; Hevia D. y cols. 2008**).

Por ello, se concluye que la melatonina es un importante protector celular además de un potente antioxidante (**Macías M. y cols. 2003**) como se ha visto anteriormente.

No obstante, la propiedad que más nos interesa en nuestra investigación es la capacidad que tiene la melatonina como hormona mediadora de la estimulación y formación ósea (**Roth JA. y cols.1999; Witt-Enderby PA. y cols. 2006; Suzuki N. y cols. 2008**).

1.5.2.2 Propiedades osteogénicas

En el campo de la odontología la propiedad osteogénica de la melatonina es de gran importancia ya que los tratamientos que se llevan a cabo necesitan un soporte óseo sano y adecuado para las rehabilitaciones orales, entre otras aplicaciones. Además, durante las intervenciones se producen radicales libres de oxígeno y nitrógeno que, como se ha comentado en el apartado anterior, dan lugar a procesos inflamatorios, oxidativos y de dolor. Debido a ello las células se debilitan y la capacidad regenerativa del tejido óseo disminuye considerablemente (**Cobo Vázquez, C. M. 2013**).

Se sabe que la melatonina está presente a elevadas concentraciones en la médula ósea, donde excede los niveles séricos en 100 veces **(Tan DX. y cols. 1993)**, actuando sobre las células óseas precursoras existentes en ella. Esto se ha demostrado mediante estudios sobre la actividad de la melatonina en la médula ósea de ratas **(Haldar C. y cols. 1992)**. Efectivamente, existen documentos que ponen en evidencia la influencia de la melatonina sobre el metabolismo óseo, actuando en el hueso de la misma forma en que lo haría un factor local de crecimiento, con efectos paracrinos en células cercanas **(Cutando A. y cols. 2008; Calvo-Guirado JL. y cols. 2009)**.

Además de esto, la melatonina también regula de manera significativa el metabolismo del calcio, previniendo la osteoporosis y la hipocalcemia en determinados casos. La forma en que interfiere en estas patologías quizá se deba a su interacción con otros factores reguladores, tales como la paratohormona, la calcitonina y las prostaglandinas **(Hakanson DO. y cols. 1987; Ostrowska Z. y cols. 2003)**.

En los estudios que se han llevado a cabo se ha comprobado que la melatonina en concentraciones micromolares, es capaz de estimular la proliferación y síntesis de fibras de colágeno tipo I en osteoblastos humanos in Vitro **(Nakade O. y cols. 1999)**. También se ha visto que, en cultivos de preosteoblastos en ratas, la melatonina estimula la síntesis de algunos marcadores óseos como la sialoproteína, la fosfatasa alcalina, la osteopontina y la osteocalcina, mediante la estimulación génica de la expresión de estas proteínas que forman parte de la matriz ósea, facilitando de este modo la formación de tejido óseo nuevo. **(Arboleya L. y cols. 2013)**

En conclusión, a escala preosteoblástica, la melatonina mejora la formación de nuevo tejido óseo ya que estimula la expresión de genes de ciertas proteínas en la matriz ósea. En este sentido, se ha demostrado que la melatonina, después de un periodo de 5 a 9 días, promueve la expresión de genes para la producción de sialoproteína ósea, fosfatasa alcalina, osteopontina y osteocalcina, lo que acorta

significativamente el tiempo necesario para la diferenciación de los preosteoblastos en osteoblastos, desde 21 días (como ocurre en el grupo control) a 12 días (**Takechi M. y cols. 2008**). Este efecto es debido a que los genes de una gran cantidad de proteínas de la matriz ósea contienen la secuencia de bases (RGGTCA) necesaria para que el receptor nuclear de la melatonina (RZR) se una a su zona promotora. Además, este incremento en la formación de tejido óseo es también mediado por receptores de membrana para la melatonina (**Radio NM. y cols. 2006; Maldonado MD. y cols. 2007**).

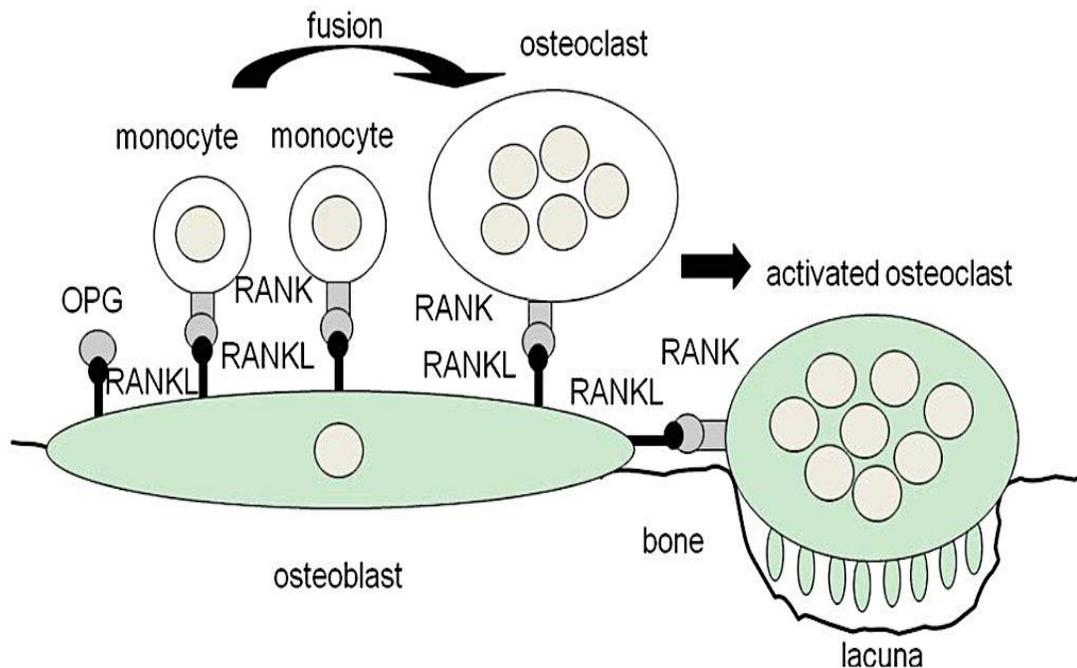
Asimismo, la melatonina puede actuar directamente sobre el osteoclasto. Como se ha visto anteriormente, los osteoclastos generan especies reactivas de oxígeno en el microambiente del hueso, lo que puede contribuir a la degradación de los componentes de la matriz ósea debido a moléculas de su estructura tales como el colágeno o el ácido hialurónico, que son susceptibles de daño oxidativo por los radicales libres (**Garrett IR. y cols. 1990**). En este sentido, los osteoclastos secretan fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP), que presenta un centro binuclear con un hierro activo que reacciona con el peróxido de hidrógeno y a través de la vía de la reacción de Fenton, produce radicales hidroxilo. El ión férrico formado en esta de reacción también interactúa con el peróxido de hidrógeno para producir el anión radical peróxido y el ión férrico.

Por lo tanto, tiene lugar una secuencia de reacciones a nivel de los osteoclastos, que dan lugar a un aumento de hidroxilos y oxígeno a través de la continua oxidación y reducción en el hierro activo presente en el tartrato. Esto permite la generación de gran cantidad de especies reactivas dependientes de la disponibilidad de peróxido de hidrógeno en el ambiente (**Halleen JM. y cols. 1999**).

Mediante esta propiedad antioxidante, la melatonina capta y neutraliza los radicales libres, interfiriendo en la función del osteoclasto e inhibiendo la degradación ósea. Por tanto, la melatonina, debido a sus propiedades antioxidantes y su capacidad de neutralizar las especies reactivas, inhibe la reabsorción ósea (**Tan DX. y cols. 1993**).

Esta inhibición de la reabsorción ósea es reforzada por otra reacción inducida por este incremento en la formación de la melatonina en el proceso osteoclastogénesis. La activación del receptor nuclear factor-kappa B ligando (RANKL) es una importante proteína en la diferenciación y proliferación osteoclástica. Otra proteína, la osteoprotegerina (OPG), interfiere con su potencial biológico. RANKL y OPG juegan un papel crítico en el metabolismo óseo dando lugar a la destrucción del hueso como resultado de la elevación de RANKL y el descenso de OPG. La melatonina altera este proceso por la modulación de la tríada molecular OPG/RANK/RANKL, elevando los niveles de OPG que impiden la unión de RANKL a su receptor RANK y, por tanto, inhibiendo la reabsorción ósea (**Koyama H. y cols. 2002**).

A escala molecular, la acción de inhibición de la reabsorción ósea de la melatonina se produce cuando esta reduce el receptor RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand), importante molécula del metabolismo óseo. Este receptor se encuentra en la superficie de la membrana de los osteoblastos y su función es la de activarlos (Figura 11).



OPG, osteoprotegerin; RANK, receptor activator of NFκB, RANKL, RANK ligand.

Figura 11. El sistema RANK/RANKL induce tanto la osteoclastogénesis a partir de monocitos como la activación de los osteoclastos maduros (Shigeru K. y cols. 2010)

En la anterior figura se puede observar como en la inhibición de la reabsorción ósea intervienen varias reacciones: la interacción entre el factor NF- κ B ligando (RANKL) y su receptor nuclear (RANK), que intervienen en la diferenciación y proliferación osteoclástica incrementando la reabsorción ósea y la síntesis de osteoprotegerina (OPG) que interfiere en el metabolismo óseo.

En conclusión, RANKL y OPG juegan un papel crítico en la remodelación ósea, de forma que cuando RANKL aumenta y OPG disminuye se produce la destrucción del hueso. (Figura 12).

La melatonina altera este proceso interfiriendo en el control de estas tres moléculas (y el complejo que forman OPG/RANK/RANKL) de tal forma que, elevando los niveles de OPG, se impide la unión de RANKL a su receptor RANK y, por tanto, se inhibe la reabsorción ósea (Koyama H. y cols. 2002). Todos estos datos apuntan hacia un efecto osteogénico de la melatonina (Calvo-Guirado JL. y cols. 2010).

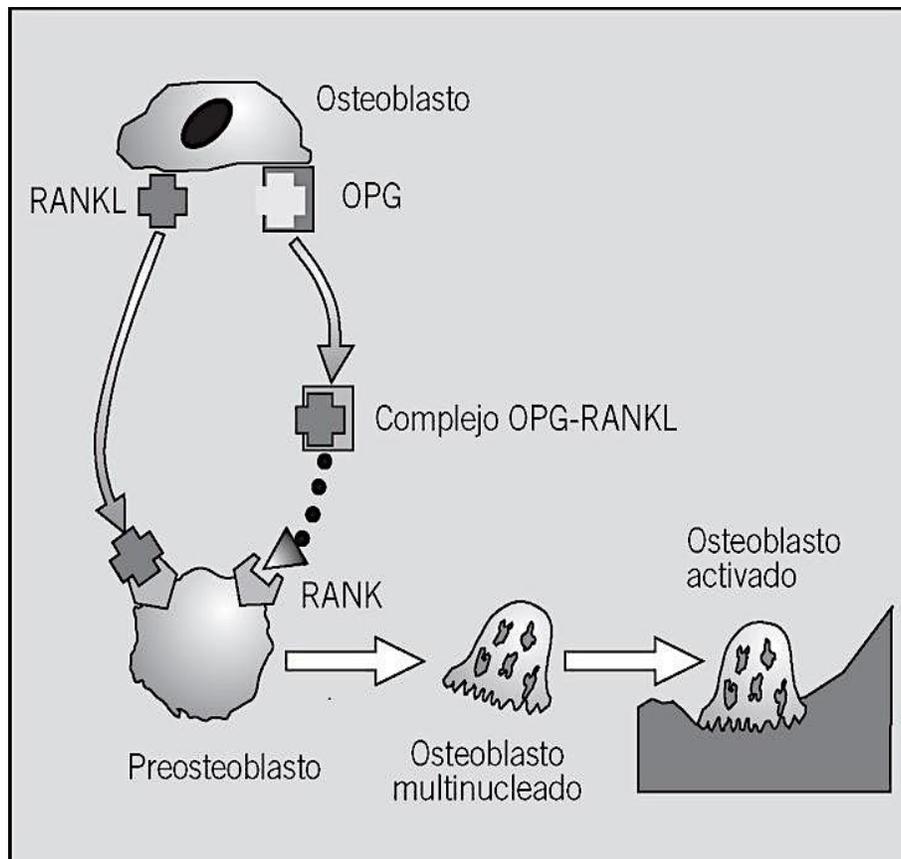


Figura 12. Mecanismo de acción del sistema OPG-RANKL (Muñoz-Torres M. y cols. 2004).

Por lo tanto, se puede concluir que la melatonina es un mediador importante en la formación de hueso y del metabolismo óseo, ya que:

- Estimula la síntesis de fibras de colágeno de tipo I en osteoblastos in vitro.
- Promueve el desarrollo de marcadores óseos proteicos en cultivos de preosteoblastos.
- Reduce el periodo de diferenciación de los preosteoblastos en osteoblastos de 21 días a 12 días **(Cobo CM. y col.2013)**.

1.5.2.3 Antecedentes de utilización de melatonina en odontología

Ya se ha hablado anteriormente de las principales propiedades de la melatonina. La odontología intenta aprovechar para sí la acción que esta molécula tiene en el sistema inmune, óseo, antioxidante y oncostático. Otra propiedad de vital importancia en odontología es el uso de la melatonina en la sedación y anestesia de la zona a tratar.

Se han llevado a cabo múltiples estudios, con personas y animales, evaluando los efectos de la melatonina en la cavidad oral. Asimismo, se ha intentado comprobar cómo actúa esta molécula ante la respuesta inflamatoria que se produce tras una intervención quirúrgica.

En uno de estos estudios **(Cutando A. y cols. 2009)**, se ha realizado una extensa revisión de la literatura científica y se concluye que la melatonina se puede aplicar con buenos resultados en diferentes patologías corporales. Asimismo, en el estudio se resaltan sus propiedades terapéuticas en la cavidad oral. En concreto, la melatonina se ha demostrado beneficiosa en procesos periodontales, úlceras orales y cáncer oral, entre otros procesos orales.

Es por ello que los odontólogos están empezando a considerar muy importante esta molécula en los tratamientos de determinadas patologías, utilizando la melatonina sola o bien combinándola con otros fármacos.

En otro estudio (**Gómez-Moreno G. y cols. 2007**), se evaluó la relación entre enfermedad periodontal y los niveles de melatonina y se comprobó que los pacientes con enfermedad periodontal tenían niveles más bajos de melatonina en saliva y en plasma.

Cutando y cols. llevaron a cabo un estudio, en el que aplicaban localmente melatonina en los alvéolos post-extracción de premolares en perros Beagle, en el momento de la colocación de implantes post-extracción. A las dos semanas se comprobó que el perímetro de hueso que estaba en contacto con los implantes que recibieron melatonina había aumentado. La aplicación local de melatonina había favorecido la formación de hueso nuevo con una mayor densidad ósea, comparado con los controles. La aplicación local de melatonina en alvéolos post-extracción de perros disminuyó el estrés oxidativo y facilitó la neoformación ósea. La extracción da lugar a un proceso inflamatorio agudo, aumentando el estrés oxidativo, como hemos visto con anterioridad. Sin embargo, esta respuesta inflamatoria no se daba en los lugares donde se administró la melatonina. (**Cutando A. y cols. 2007**).

Los resultados experimentales parecen evidenciar que la aplicación tópica de melatonina (aplicada sobre la pulpa dental antes de la rehabilitación bucal) resulta muy beneficiosa ya que favorece la neoformación ósea (**Gómez-Moreno G. y col. 2012**).

En un estudio, llevado a cabo por investigadores de la Universidad de Granada y la Universidad de Michigan sobre la relación entre la melatonina salivar y los diferentes grados de la enfermedad periodontal, se encontró que los pacientes con porcentajes salivales y de melatonina más altos tuvieron un menor índice periodontal indicando, de este modo, que la melatonina puede actuar contra la infección e inflamación, debido a sus propiedades antioxidantes, antienvjecimiento e inmunológicas. (**Arana C. 2006**). Considerando todas estas propiedades de la melatonina que promueven la actividad de los fibroblastos, la regeneración ósea y la protección frente a las infecciones y procesos inflamatorios, es de gran utilidad su uso para el tratamiento de la enfermedad periodontal (**Cutando A. y cols. 2006**).

La melatonina también actúa en la cavidad oral estimulando la producción de fibras de colágeno tipo I y modulando la actividad osteoblástica y osteoclástica **(Cutando A. y cols. 2007)**

1.5.3 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo muy amplio de polifenoles que encontramos en las plantas, vegetales, semillas y frutas. De hecho, se han identificado más de 5.000 flavonoides diferentes. **(Bhagwat SA. Y cols. 2011)**

Tienen una estructura molecular general (C6-C3-C6) que posteriormente puede modificarse mediante la adhesión de algunos grupos funcionales. De ahí la amplia variabilidad que encontramos en la naturaleza. Los flavonoides podemos definirlos como polifenoles hidrófilos (Figura 13).

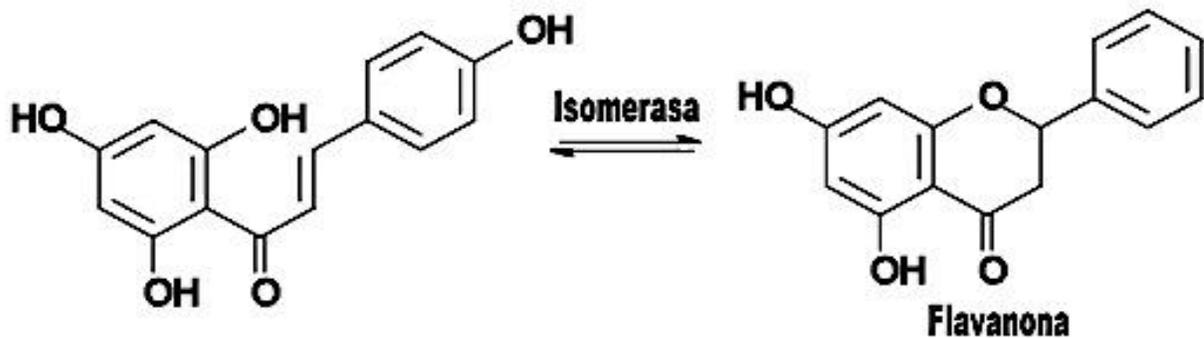
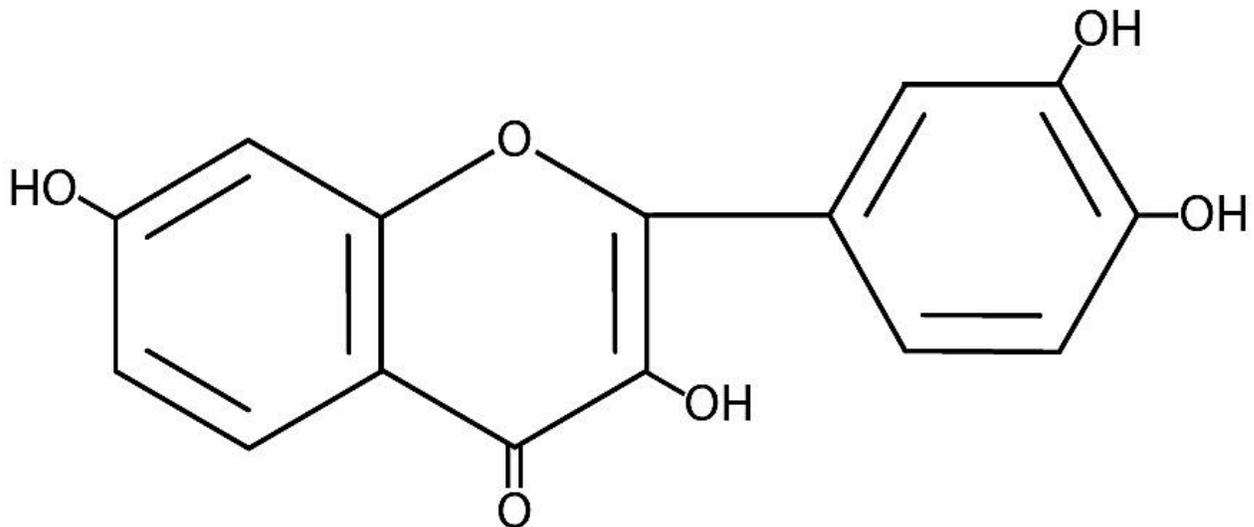


Figura 13. Estructura base de los flavonoides. Esqueleto de una chalcona, que mediante la acción de la enzima isomerasa se convierte en una flavanona

(Fuente imagen: <http://www.datuopinion.com/>)



(Fuente imagen: <http://commons.wikimedia.org/>)

Los flavonoides se pueden clasificar en distintos grupos, según su estructura molecular y vía metabólica (Figura 14): chalconas, flavonas (apigenina y luteolina), flavonoles (quercetina, kaempferol, miricetina y fisetina), flavandioles (leucocianidina, leucopelargonidina y leucodelfinidina), antocianinas, taninos condensados, auronas, flavanonas (naringenina, liquiritigenina y eriodictiol), dihidroflavonoles (precursores directos de flavandioles y flavonoles), dihidromiricetina, dihidroquercetina y dihidrokampferol. **(Sukmanskii OI. 2002; Tripoli E. y cols 2007).**

En líneas generales se dividen en dos grandes grupos:

- 1 Isoflavonoides: derivan de los flavonoides debido a un cambio en la estructura molecular de estos últimos. Los isoflavonoides más conocidos son la genisteína y la daidzeína.
- 2 Neoflavonoides: al igual que el grupo anterior, también derivan de los flavonoides, debido a un cambio en la estructura molecular de estos últimos.

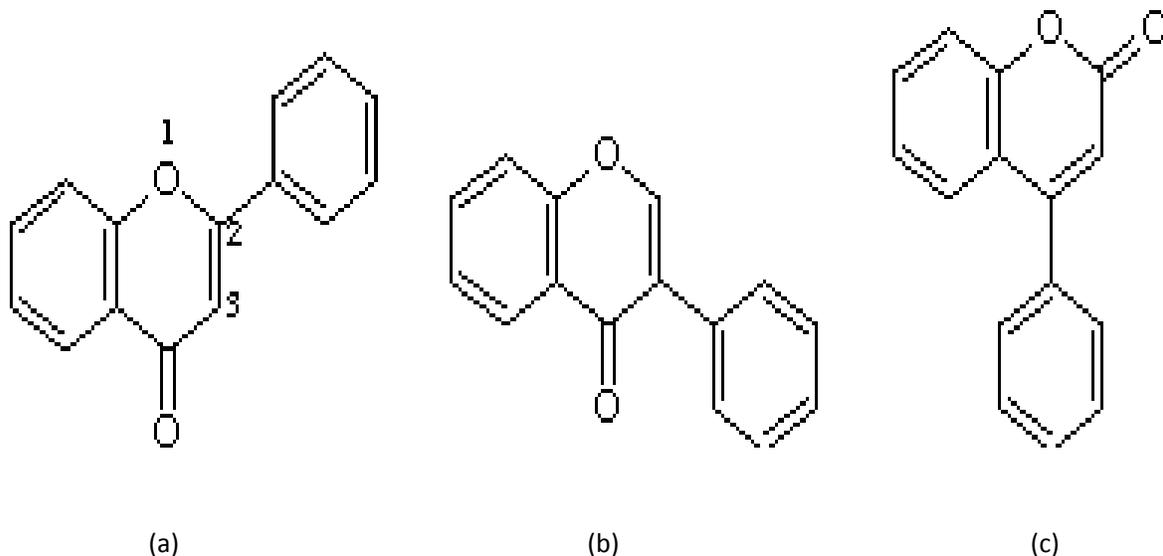


Figura 14. Estructura molecular de los flavonoides (a), isoflavonoides (b) y neoflavonoides (c)

(Fuente imagen: <http://javiermartineznoguera.blogspot.com.es/>)

1.5.3.1 Función de los flavonoides en las plantas

Los flavonoides principalmente son pigmentos que encontramos en las plantas y son responsables de varias funciones: **(Benavente-García O. y cols. 2008; Bhagwat SA. Y cols. 2011; Wang L. y cols. 2009)**.

- Protegen a las plantas de los rayos UV del sol, pudiendo llegar a captar hasta un 90% de las radiaciones UV.
- Algunos flavonoides, debido a su sabor desagradable, como en el caso de los taninos, protegen a la planta de los herbívoros.
- Parece ser que intervienen en la regulación del transporte de la hormona auxina, hormona fundamental en el crecimiento de las plantas.
- Algunos flavonoides forman parte de los pigmentos de flores y hojas dando lugar a un colorido intenso que atrae a los insectos, facilitando de este modo la polinización.
- También es curioso el caso de algunas plantas carnívoras que poseen en sus flores y hojas un pigmento flavonoide que les confiere el color rojo, púrpura o azul (antocianina) que atrae a los insectos de los que se van a alimentar.
- Otros flavonoides lo que hacen es conferir aromas además de colores a los frutos de tal forma que los hacen más apetecibles para los animales que se alimenten de ellos y además hace que dispersen sus semillas.

Algunos proponen que el consumo conjunto de flavonoides en países occidentales es de entre 100-150 mg/día **(Manach C. y cols. 2004)**. Pero en estudios detallados de consumo por países se ponen de manifiesto diferencias significativas. Desde las cantidades más bajas de Japón y Finlandia de 24 mg **(Knekt P. 2002)** y 63 mg **(Arai Y. y cols. 2000)** al día respectivamente, hasta unos 190 mg/día **(Chun O. y cols. 2007)** en USA; en Australia el consumo medio alcanza a 454 mg/día **(Johannot L. y cols. 2006)**.

Otra fuente de variaciones en cuanto a resultados es la diferente metodología de los trabajos pues los resultados varían en función del número de flavonoides estudiados.

1.5.3.2 Aplicaciones en medicina

El ser humano no es capaz de sintetizar flavonoides; los obtiene a partir de los vegetales de los que se alimenta. Últimamente han adquirido mayor importancia entre los consumidores ya que influyen de forma muy positiva en la salud de las personas. Así, se ha descubierto que estas moléculas contienen propiedades antimicrobianas, anticancerígenas, antiinflamatorias, cardiosaludables, etc. **(Zhang X. y cols. 2014)**

De hecho, se han realizado numerosas investigaciones sobre sus beneficios en algunos aspectos de la salud humana y actualmente se están estudiando sus formas de acción a nivel molecular. **(La VD y cols. 2009)**

Se sabe que algunos flavonoides inhiben el crecimiento de células cancerosas, otros tiene un efecto sobre el funcionamiento del corazón, facilitando la circulación sanguínea, actuando sobre el músculo cardíaco, por lo que el consumo de estos compuestos podría disminuir el riesgo de sufrir enfermedades cardíacas. **(Wei H. 1990; Benavente-García O. y cols. 2008; La VD y cols. 2009).**

En cuanto a sus propiedades antiinflamatorias así como analgésicas, se están llevando a cabo estudios en este campo para averiguar cómo interactúan en nuestro organismo y de qué forma evitan la inflamación y el dolor asociado. También se sabe que tienen propiedades antibacterianas, antivirales antifúngicas y antioxidantes **(Benavente-García O. y cols. 2008).**

En un principio se le atribuyó a los flavonoides, entre otras moléculas orgánicas presentes en la dieta, un papel directo antioxidante desde el plasma sanguíneo **(Gay G. y cols. 1987)**, confiriéndoles un mecanismo de acción in vivo similar al que tiene lugar in vitro, ya que eran evidentes los efectos protectores frente a radicales libres y

se consideraron varias posibles rutas antioxidantes. Una de ellas era la captura de radicales libres impidiendo la reacción en cadena oxidativa que desencadenan. Para ello es fundamental la estructura molecular y los grupos funcionales **(Heijnen C. y cols. 2002)** y depende de la presencia de un doble enlace entre C-2 y C-3 y de dos grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B y otros dos en C-3 y C-5 **(Benavente-García O. y cols. 2008)**.

Sin embargo en los últimos años la evidencia del papel fundamental de la estructura molecular de los flavonoides junto con detalladas investigaciones sobre biodisponibilidad, absorción y metabolismo de estas moléculas aportadas en la alimentación modificó la estrategia de abordar los distintos modos de acción en el organismo. De este modo los estudios del papel beneficioso para la salud de los flavonoides no se limitan a la capacidad antioxidante directa sobre radicales libres, sino que además buscan otros mecanismos de acción indirecta muy importantes sobre los sistemas antioxidantes propios del organismo regulando la actividad y la expresión de enzimas endógenas encargadas de la reducción de ROS a moléculas menos reactivas **(Myhrstad MC, y cols. 2006)**.

1.5.3.3 Mecanismos antioxidantes de los flavonoides

La propiedad antioxidante de los flavonoides se debe a su estructura química que, como hemos visto con anterioridad, posee un número variable de grupos hidroxilo fenólicos. Estos grupos hidroxilo fenólicos le confieren la propiedad de quelación del hierro y de otros metales de transición, proporcionándole una gran capacidad antioxidante. **(La VD y cols. 2009; Benavente-García O. y cols 2008)**.

Debido a esta capacidad antioxidante, los flavonoides nos protegen del daño oxidativo que se puede originar en nuestro organismo. Este hecho hace que los flavonoides tengan usos terapéuticos en distintos tipos de patologías, como por ejemplo en el cáncer, la cardiopatía isquémica o la aterosclerosis, entre otras. Hay que resaltar, que según las estadísticas, las poblaciones que consumen productos ricos en flavonoides tienen menores riesgo de padecer afecciones cardiovasculares. **(Lafita J. Y cols 2003; Benavente-García O. y cols. 2008)**.

La forma en que estas moléculas actúan es neutralizando los radicales libres, como el radical hidroxilo y superóxido, y modificando la síntesis de icosanoides (moléculas de carácter lipídico, mediadoras en el sistema nervioso central, en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune) como las prostaglandinas, los tromboxanos, los leucotrienos, y ciertos hidroxiácidos precursores de los leucotrienos, dando lugar a una respuesta anti-prostanoide y antiinflamatoria). También evita la agregación plaquetaria y de ahí sus efectos antitrombóticos (**Benavente-García O. y cols. 2008; Bhagwat SA. y cols. 2011**).

Los flavonoides pueden unirse a enzimas, transportadores de hormonas, y ADN. También pueden unirse a ciertos iones metálicos y radicales libres, evitando de esta forma los efectos tóxicos y oxidativos de estos grupos (**Taysi S. y cols. 2005; Amin I. y cols. 2004**).

Como ya se ha visto, los flavonoides son capaces de eliminar el oxígeno reactivo bloqueando la acción oxidativa de estas moléculas sobre las células. Por ello, se dice que los flavonoides son citoprotectores y se atribuye su propiedad antioxidante a la capacidad que tiene de quelar el hierro y otros radicales libres (**Sukmanskii OI. y cols. 2002; Amin I. y cols. 2004**).

Su capacidad antioxidante y, por tanto, citoprotectora, hace que inhiban unas enzimas que generan especies reactivas de oxígeno e hidroperóxidos orgánicos, las oxidasas. También inhiben otras enzimas como la fosfolipasa, implicada de forma no directa en los procesos oxidativos. A la vez que inhiben unas enzimas, son capaces de activar otras como la catalasa y la superóxido dismutasa, ambas con importantes propiedades antioxidantes, interfiriendo la acción de los radicales libres (**Simon Z y col. 2002; Nakamura H. y cols. 2010**).

1.5.3.4 Propiedades osteogénicas de los flavonoides

La propiedad de los flavonoides que nos interesa para este estudio es la de estimular la proliferación osteoblástica y la formación ósea. Esta propiedad está siendo ampliamente estudiada ya que podría prevenir la osteoporosis (**Sukmanskii**

OI. y cols. 2002; Nakamura H. y cols. 2010), patología que afecta a los huesos y que mayoritariamente sufren las mujeres en edad menopáusica.

Esta patología está asociada a la disminución de la producción de estrógenos en mujeres de entre 45 y 50 años. Al disminuir estas hormonas, se produce pérdida de masa ósea, lo que conocemos como “osteoporosis”. En la osteoporosis se produce pérdida de masa ósea debido a que el hueso reabsorbido por los osteoclastos no es reemplazado por hueso nuevo en su totalidad como consecuencia de una disminución de la función de los osteoblastos.

Los estrógenos actúan indirectamente sobre el remodelado óseo, regulando la actividad de diversos mediadores de la siguiente forma: controlan el sistema ligando receptor RANKL-RANK mediante el incremento de los niveles de osteoprotegerina (OPG), su receptor señuelo, efecto que se potencia con su papel supresor sobre la síntesis de ciertas interleukinas (IL-1, IL-6), prostaglandina (PGE2), factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) y sobre el factor de necrosis tumoral (TNF- α). De esta forma, frenan la diferenciación y activación de los preosteoclastos. Pero los estrógenos también pueden actuar sobre los osteoclastos activados, incrementando su apoptosis, tanto directamente como potenciando la síntesis del Transforming Growth Factor (TGF β) (**Lafita J. Y cols 2003**).

A pesar de que la ingesta de estrógenos podría estimular la formación ósea, su uso en terapias hormonales sustitutivas es controvertido ya que varios estudios llevados a cabo informan de los riesgos para la salud que conlleva recibir este tipo de terapia. De hecho, se habla de que la terapia hormonal en la menopausia puede afectar el riesgo de una mujer de padecer ciertos tipos de cáncer, así como también sobre la posibilidad de sufrir alguna enfermedad cardíaca o accidente cerebrovascular.

Es por ello que la investigación y consumo de ciertos fitoestrógenos está de actualidad ya que son productos naturales con propiedades beneficiosas, y con una similitud estructural y funcional con los estrógenos, de tal forma que poseen

un enorme potencial terapéutico alternativo en casos de osteoporosis **(De Gortázar R. y cols. 2005)**

En ciertos estudios científicos se ha podido comprobar que algunos flavonoides como la quercetina o la genisteína conservan la masa ósea en ratas ovariectomizadas mediante la reabsorción ósea *in vivo*. Además, reducen la osteoclastogénesis a través de mecanismos que involucran al factor NF- κ B y a un activador de la proteína 1 (AP-1) **(Li BB y cols. 2003; La VD y cols. 2009)**.

Recientemente se ha demostrado que la naringenina inhibe la liberación de citoquinas proinflamatorias, interfiriendo sobre la osteoclastogénesis al inhibir la diferenciación osteoclástica y la reabsorción ósea. **(Mikán JF. y cols. 2015)**.

La ipriflavona parece tener mecanismos de acción antireabsortivos y de formación ósea. Los mecanismos antireabsortivos incluyen la inhibición de la activación de los osteoclastos maduros así como la formación de nuevos osteoclastos. Por otra parte, los efectos osteoblásticos de la ipriflavona y sus metabolitos estimulan la proliferación de una línea celular osteoblástica, incrementando la actividad de la fosfatasa-alcalina y aumentando la formación de colágeno. Estas sustancias regulan la diferenciación osteoblástica al aumentar la expresión de importantes proteínas de la matriz ósea y facilitando así su mineralización **(Minegishi T. y cols. 2002; Maki K. y cols. 2005; Ito K y cols. 2007)**.

Apigenina

En este estudio se ha empleado un nuevo flavonoide conocido como “apigenina” y se ha evaluado su efectos sobre la neoformación y maduración ósea.

La apigenina es un flavonoide que pertenece al grupo de las flavonas (Figura 15) y lo podemos encontrar en frutas y verduras tales como el perejil, la cebolla, el apio o el pomelo. La apigenina también está presente en el vino tinto y en la cerveza.

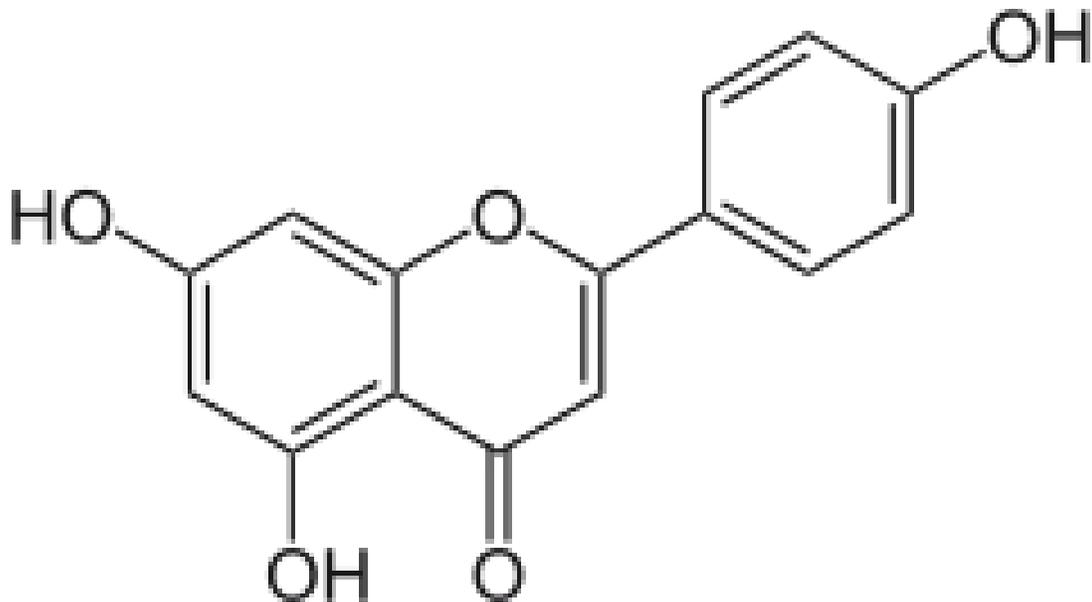


Figura 15. Estructura molecular de la apigenina

(Fuente imagen: spanish.alibaba.com)

Ya hemos visto que los flavonoides, poseen actividades reguladoras a nivel biológico y que sus principales efectos se ejercen sobre células sanguíneas y células endoteliales a nivel microvascular, presentando propiedades antiinflamatorias, antitumorales y actuando como protectores a nivel cardiovascular **(Benavente-García O. y col. 2008)**.

Al igual que sucede con otros flavonoides, la apigenina es considerada una molécula bioactiva con estas mismas propiedades, interesantes para la salud del ser humano. Estas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerosas hacen que hoy en día este flavonoide sea objeto de estudio.

Además, a escala vascular refuerza y protege los capilares sanguíneos, inhibiendo ciertas enzimas y proteínas implicadas en la degradación del colágeno, proteína que forma parte del tejido de dichos capilares.

Por su parte, a escala ósea se ha documentado que la apigenina posee efectos protectores sobre la pérdida ósea en ratas ovariectomizadas (**Park JA. y cols. 2008**). Los estudios han demostrado que la apigenina actúa disminuyendo la osteoclastogénesis y la función osteoclástica, a la vez que incrementa la diferenciación osteoblástica (**Choi EM. 2007**).

Estos efectos se deben a la capacidad de la apigenina para unirse a los receptores de estrógenos debido a que su estructura molecular se asemeja a la de ellos.

Debido a esta similitud molecular, la apigenina se une a los receptores estrogénicos tipo α y β , sobre todo a los receptores β , lo que da lugar a que se produzca una mayor actividad de transcripción de la apigenina en tejidos en que los receptores beta están presentes en cantidades relevantes, como es el caso del hueso, del sistema nervioso central y del endotelio vascular.

En conclusión, la apigenina incrementa los procesos de proliferación y diferenciación osteoblástica debido al efecto que posee sobre los receptores beta presentes en los osteoblastos. La apigenina, de modo análogo estradiol, aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina, un marcador temprano de la diferenciación osteoblástica, y aumenta la expresión génica de la osteocalcina en estas células, un marcador más tardío de diferenciación osteoblástica (**Bandyopadhyay S. y cols. 2006; Siddiqui JA. y cols. 2010**).

Hay que resaltar que la actividad osteogénica de la apigenina es consecuencia de la estimulación de producción de células osteoprogenitoras en la médula ósea mediante la expresión génica de proteínas morfogenéticas del hueso 2 y 6 (BMP-2 y BMP-6) y mediante la expresión del polipéptido 1 del colágeno tipo I (COL1A1), necesario para la diferenciación de estas células **(Mak P. y cols. 2006)**.

Ya se ha visto cómo actúa la apigenina a nivel osteoblástico, pero la apigenina también actúa sobre los osteoclastos, inhibiendo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Este factor induce la secreción de varias citocinas osteoclastogénicas por parte de la línea celular osteoblástica. El TNF- α induce la producción de interleucina-6 (IL-6), RANT (regulador de la expresión, secreción y activación de células T) y proteína quimiotáctica monocítica 1 y 3 (MCP-1 y MCP-3). Por otra parte, incrementa la producción de IFN-gamma, que estimula la secreción de monocinas, CXCL-9 y CXCL-10 en los osteoblastos. Estas citocinas inflamatorias contribuyen a la osteoclastogénesis por estimular a los osteoblastos, a los fibroblastos y a las células T activadas para producir RANKL que, a su vez, induce la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea **(Shigeyama Y. y cols. 2000)**.

De forma similar, la apigenina inhibe la expresión de marcadores de la diferenciación osteoclástica como la fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP), el receptor activador del factor nuclear kappa (RANK) y el receptor de calcitonina, lo que provoca la inhibición de la formación de osteoclastos multinucleados. Esta inhibición tiene lugar incluso en células precursoras osteoclásticas obtenidas de la médula ósea de ratones, después del tratamiento con RANKL y con el factor estimulante de la colonia de macrófagos (MCSF) **(Choi EJ. y col. 2009)**.

Objetivos

2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue evaluar los efectos de la aplicación de melatonina y de un nuevo flavonoide (apigenina) sobre la neoformación y maduración ósea en un periodo de 30, 60 y 90 días mediante un estudio histológico e histomorfométrico.

El objetivo secundario de este estudio fue cuantificar y comparar la cantidad de hueso inmaduro a los 30, 60 y 90 días.

Material y método

3. Material y método

3.1 Materiales

3.1.1 Animales de experimentación

En este estudio se han utilizado nueve perros de raza *Beagle* (Figura 16) procedentes del Animalario de la Universidad de Murcia, con una edad comprendida entre los 14 y los 16 meses y con un peso aproximado de entre 16 y 18 kg. Los perros presentan mandíbulas intactas, dentición permanente totalmente erupcionada sin ningún tipo de trauma oclusal. Los especímenes mostraron buenas condiciones de salud general y oral.

Una vez recibidos los animales, se procedió a su identificación y fueron alimentados *ad libitum* con dieta sólida a base de pienso y agua.



Figura 16. Especímen de Beagle.

<http://www.petcliv.es/las-mascotas/beagle/beagle-enfermedades-y-problemas-salud>

El estudio experimental se realizó también en las instalaciones del Animalario de la Universidad de Murcia, en concreto, en la sede Espinardo.

3.1.2 Listado de Materiales:

- Periostotomo Molt.
- Periostotomo Williger.
- Espejos intraorales.
- Sonda periodontal.
- Jeringas de anestesia con autoaspiración.
- Agujas de anestesia Normon Jet Plus 30 G 0,3 x 25 mm.
- Carpules de anestesia articaína Ultracain[®] con Epinefrina 40/0,005 mg/ml.
- Turbina.
- Fresas de odontosección.
- Aspirador quirúrgico.
- Pinzas mosquito.
- Bateas.
- Flavonoide (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzopyrone, Sigma- Aldrich Química, S.L.)
- Osteoinductor (N-Acetyl-5-methoxytryptamine, Sigma-Aldrich Química, S.L.)
- Membranas de colágeno.
- Porta agujas Castroviejo 18 cm 1152TC/18.
- Tijeras de Mayo.
- Sutura 3/0 TB-15. Lorca Mariñ[®] Ref. 55346.
- Fresa de Trefina Ø 3mm.
- Gasas.
- Digluconato de clorhexidina 2%.

- Suero glucosalino.
- Cámara fotográfica Nikon D60.
- Aparato de rayos X.
- Ultrasonidos Satelec.
- Punta de ultrasonidos Scaling GD1.
- Lápiz Staedler Noris[®] 120 HB 2.
- Bisturíes desechables con hojas del numero 15.
- Separadores Minnesota.

3.2 Método

3.2.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio de casos y controles con tres grupos: dos grupos con tratamiento (a un grupo se le aplicó melatonina y al otro apigenina) y un grupo control al que no se aplicó ningún tratamiento.

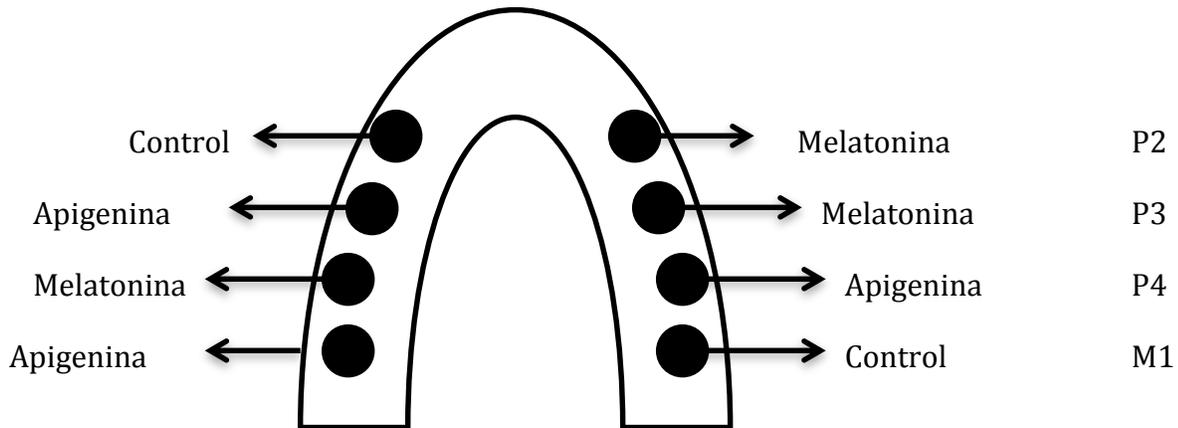
Los perros fueron evaluados en tres periodos (30, 60 y 90 días) siguiéndose, en todos los casos, el mismo procedimiento de valoración.

3.2.2 Diseño del estudio

3.2.2.1 Normas de experimentación

En este estudio se han cumplido en todo momento los principios éticos en investigación definidos en el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, así como la Ley 32/2007 de 7 de noviembre para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. Todas las intervenciones se han realizado bajo la supervisión del veterinario adscrito al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia.

3.2.2.2 Número de alveolos por mandíbula con esquema:



3.2.2.3 Randomización

www.Randomización.com.

Tres materiales fueron randomizados con el programa anteriormente descrito.

3.2.3 Procedimiento quirúrgico

Todas las intervenciones se realizaron bajo la supervisión del veterinario adscrito al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia. Bajo anestesia general, se inició el procedimiento realizando una tartrectomía con ultrasonidos para eliminar el sarro y contar con un campo quirúrgico limpio.

Se tomaron unas radiografías intraorales para conocer el punto de bifurcación de las piezas a extraer con el fin de realizar la exodoncia por odontosección y que, de esta manera, el alveolo conservase la máxima integridad posible. Con un lápiz, y siguiendo la guía radiográfica, se trazó una línea en la superficie vestibular de los dientes a extraer, perpendicular al margen gingival, para realizar la odontosección sin modificar la anatomía del alveolo.

3.2.3.1 Exodoncias y tratamiento

Primero se procedió a la inducción anestésica de los animales con los siguientes fármacos:

- Calmo Neosan® (Maleato de Acepromazina): 0,5-1mg/kg peso (1-2ml/10kg peso) vía intramuscular, como tranquilizante antes de la anestesia general.
- Anestesia general: Imalgene® (Ketamina+Clorbutol: 5-8 mg/kg peso vía intravenosa).
- Calmo Neosan®: como coadyuvante del anestésico en la dosis arriba indicada.
- Atropina: 0,05 mg/kg peso vía subcutánea para disminuir las secreciones.

A continuación, y bajo anestesia general, se realizaron en la mandíbula las exodoncias de los premolares P2, P3, P4 del lado izquierdo y M1 bilaterales.



Figura 17: Odontosección



Figura 18. Exodoncias realizadas

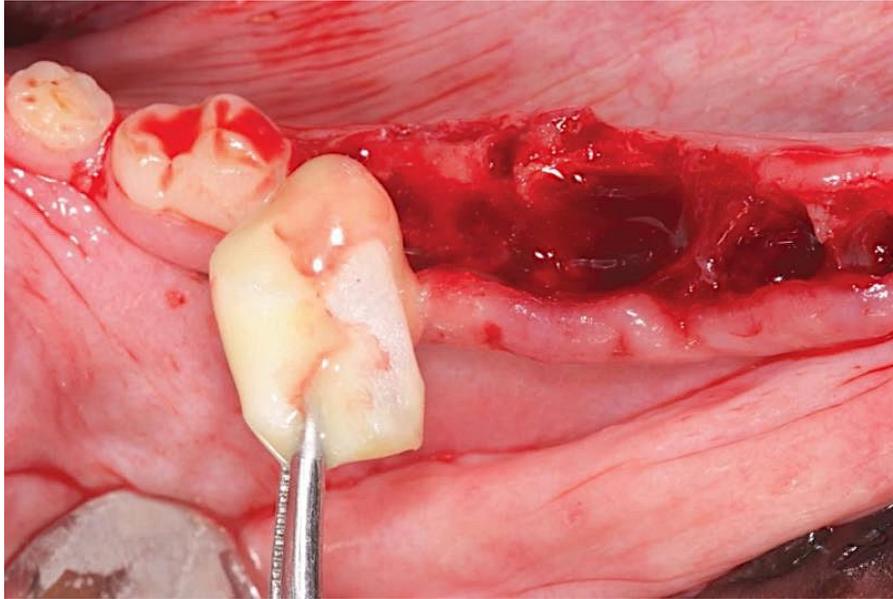


Figura 19. Aplicación de flavonoides en alveolo post-extracción.

Los alvéolos P2, M1 y M2 del lado izquierdo se rellenaron con una esponja de colágeno portadora de flavonoides (apigenina); los alvéolos P2, M1 y M2 del lado derecho se rellenaron con una esponja de colágeno portadora de melatonina; y en los alvéolos P3 de ambos lados y P4 del lado izquierdo no se colocó nada para dejarlos cicatrizar siguiendo su curso normal. En el procedimiento quirúrgico se rellenaron los alveolos de forma randomizada en cada perro.



Figura 20. Esponjas de colágeno embebidas en melatonina previo a su inserción en los alveolos

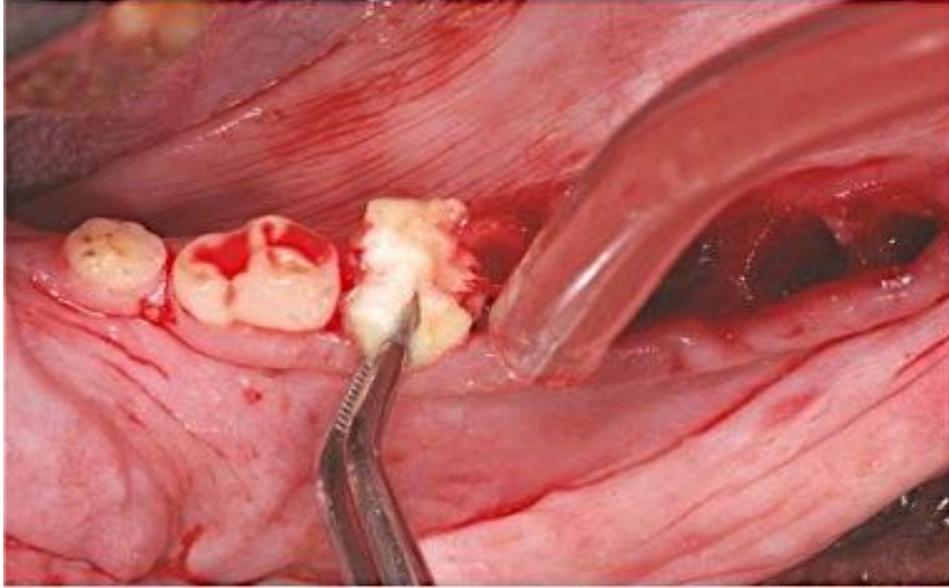


Figura 21. Aplicación de melatonina en alveolo post –extraccion.

La sutura se efectuó con puntos simples reabsorbibles (3-0 TB-15. Lorca Marín. Ref. 55346) para conseguir que la encía cubriese completamente las membranas.



Figura 22. Hueso cicatrizado después de la aplicación de melatonina y flavonoides

Asimismo, se conservó el sector anterior de canino a canino, el premolar P1 y el molar M3 para que los perros pudieran mantener una mínima función masticatoria. En el maxilar superior no se realizó ninguna intervención.

Durante todo el procedimiento quirúrgico se mantuvo la vía intravenosa de cada perro con suero glucosalino (250 cm³) que se transfundió totalmente para facilitar la hidratación y recuperación post quirúrgica de los animales.

El antibiótico y el antiinflamatorio se administraron al terminar la intervención quirúrgica y posteriormente cada dos días durante un total de cuatro días, para prevenir la infección e inflamación post-operatorias, tal y como establecen los comités de ética de experimentación animal. La medicación antiinflamatoria, analgésica y antimicrobiana que se utilizó fue la siguiente:

- Voren® antiinflamatorio (Dexametasona isonicotinato): 1-2 ml. vía intramuscular.
- Bivamox® antibiótico (Amoxicilina): 2 ml. vía intramuscular.

Después de la intervención quirúrgica se trasladó a los perros a su estabulario para que, bajo la supervisión veterinaria, se recuperasen progresivamente de la operación. En los días posteriores se realizaron los cuidados post-quirúrgicos de las heridas redundancia para evitar que se produjeran infecciones y se vigiló el estado general en el que se encontraban los animales. A partir de este momento y durante el tiempo que duró el estudio, los perros fueron alimentados *ad libitum* con dieta blanda a base de pienso blando y agua.

3.2.3.2 Toma de biopsias

En cada uno de estos periodos se utilizaron tres perros y se les realizó nueve biopsias a cada uno de ellos (de las cuales tres eran muestras de melatonina, otras tres de apigenina y otras tres de control).

Previamente a la toma de biopsias a los animales se les realizó una limpieza de la mucosa oral mediante gasas impregnadas en digluconato de clorhexidina al 2%.

A continuación se les suministró anestesia local en la encía vestibular y lingual y se realizó una incisión supracrestal desde el canino hasta el segundo molar y se despegó un colgajo de espesor total.



Figura 23. Colgajo de espesor total después de tres meses de cicatrización.

Utilizando una trefina de 2,75 mm. de diámetro, se practicó un orificio en el lado izquierdo y otro en el lado derecho a nivel de P2, M1 y M2, donde anteriormente se habían colocado las esponjas con flavonoides y melatonina. Asimismo, se obtuvieron las biopsias de los alvéolos P3 y P4 pertenecientes al grupo control.

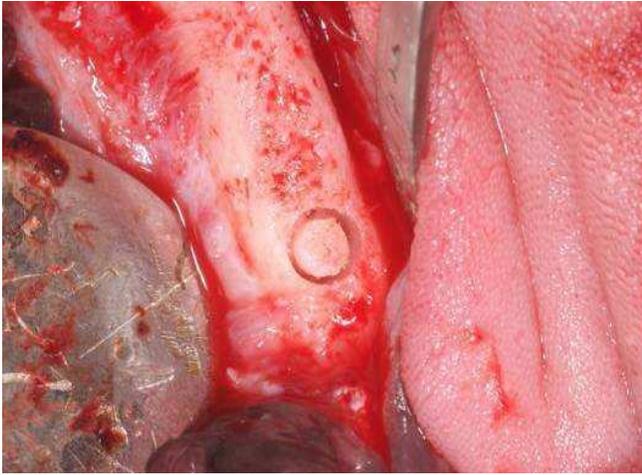


Figura 24

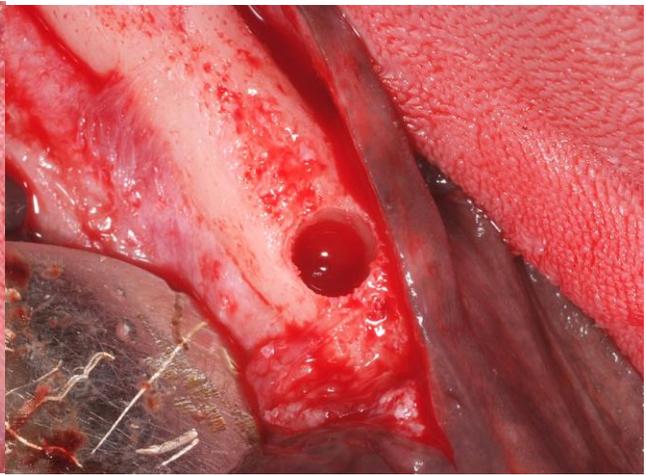


Figura 25

Figura 24 y 25: Zona de la Extracci6n de la Biopsia en Mand6bula



Figura 26

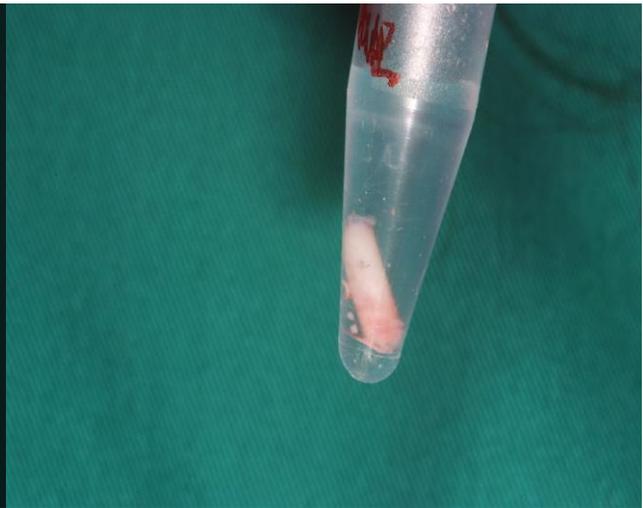


Figura 27

Figura 26: Biopsia 6sea del hueso cicatrizado de melatonina, flavonoides y Apegenina.

Figura 27: Se conservaron individualizadamente con formaldeh6do al 4%.

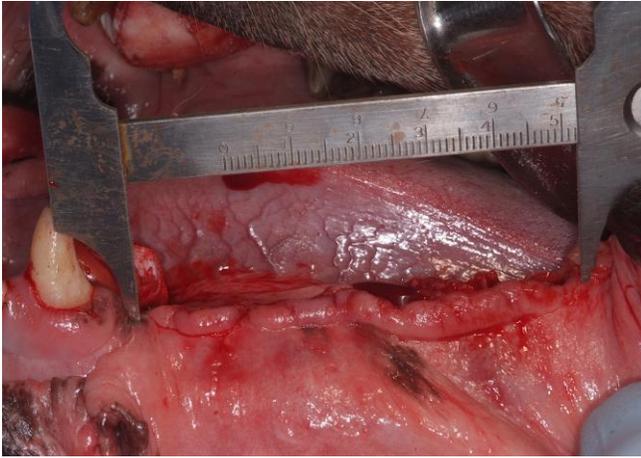


Figura 28

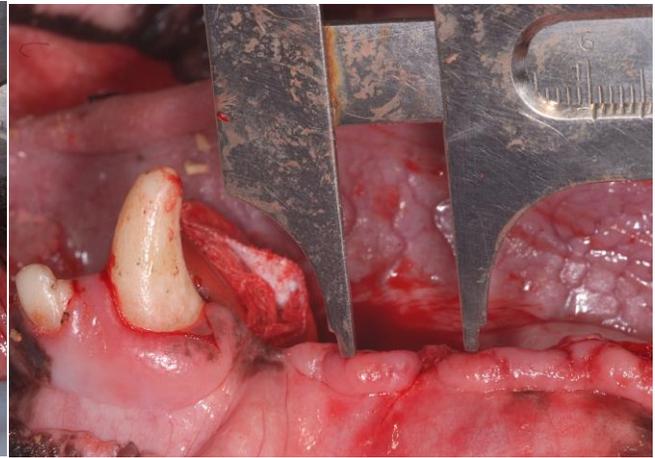


Figura 29

Figura 28 y 29: Medición en anchura y longitud del reborde alveolar

3.2.3.3 Preparación de las muestras histológicas

Los cilindros de hueso que se obtuvieron se conservaron individualizadamente con formaldehído al 4% en frascos de 10 cc. Durante un periodo de 15 días. Las muestras fueron descalcificadas con TBD-2 (Anatomical Pathology International, Runcon, Cheshire, UK) durante 30 días. Tras la deshidratación e inclusión en parafina, en las muestras se realizaron cortes de 8 micras para su tinción con azul de toluidina y hematoxilina-eosina.

3.2.3.4 Método de análisis histológico e histomorfométrico de la neoformación ósea

En este estudio, para realizar el análisis histomorfométrico, se utilizó una magnificación de 20X para observar las imágenes en el microscopio y se valoraron digitalmente (Olympus DP12, Nagano, Japón) analizando 10 campos por cada muestra. En el análisis de las imágenes se utilizó el software Microimage 4.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

Todos los análisis fueron realizados por el mismo investigador que desconocía el grupo al que pertenecía cada una de las muestras.

En cada campo de cada una de las muestras se valoró únicamente el área de hueso neoformado, sin tener en cuenta el tejido conjuntivo. De la totalidad del área ósea se determinó el porcentaje de hueso inmaduro:

$$\% \text{ Hueso inmaduro} = (\text{Área de hueso inmaduro} / \text{Área total de hueso}) \times 100$$

El hueso inmaduro se caracteriza por imágenes de hueso mineralizado totalmente desorganizado, con elevados índices de celularidad y grandes cavidades medulares; mientras que el hueso maduro se caracteriza por imágenes con predominio de osteonas formadas por láminas de hueso que se organizan de forma concéntrica alrededor de los conductos de Havers. Para cada una de las muestra se calculó el promedio de los diez campos analizados de hueso inmaduro.

3.2.3 Análisis estadístico

Los cálculos se realizaron con el programa SPSS 19® (Chicago, Illinois, USA) con licencia en la Universidad de Murcia. El valor de significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

Los métodos estadísticos utilizados fueron los siguientes:

- Estadística descriptiva: media, desviación estándar y error estándar.
- Estadística analítica: se utilizó el test de la T de Student para muestras dependientes para comparar las diferencias existentes entre las variables.

Resultados

4 Resultados

4.1 Treinta días:

4.1.1 Microscopio óptico

En el grupo control se observa una cantidad elevada de hueso neoformado cubriendo el defecto óseo. Sin embargo, este hueso nuevo es totalmente inmaduro, ya que las imágenes muestran un tejido muy desorganizado, con elevados índices de celularidad y grandes cavidades medulares.

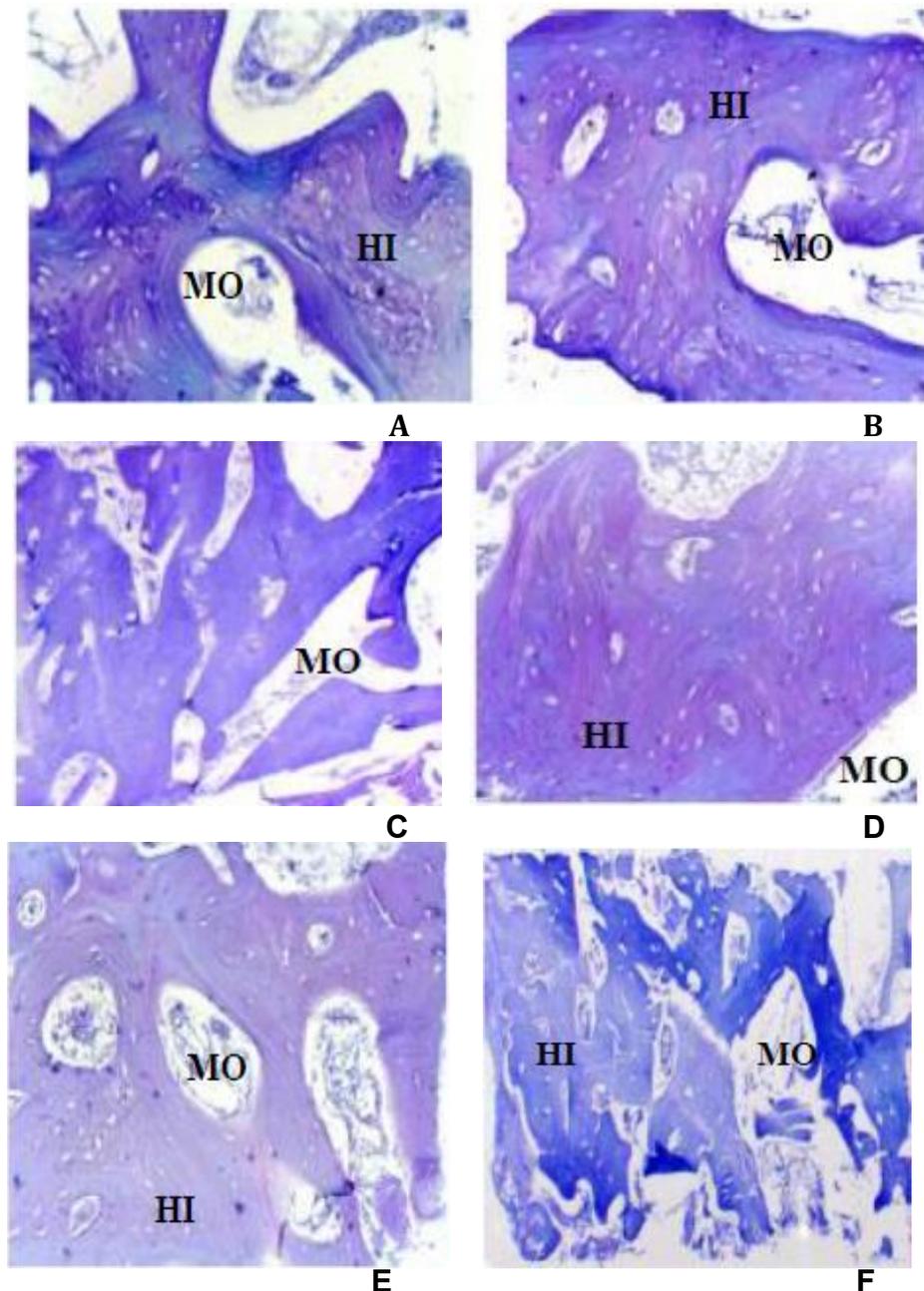


Figura 30: A y B) Control 30 días. C y D) flavonoides 30 días. E y F) Melatonina 30 días.

* **H.I.:** Hueso Inmaduro Desorganizado. **M.O:** Medula ósea
Tinción azul de Toluidina.

Por otra parte, en los grupos tratados con melatonina y apigenina, las imágenes revelan la existencia de hueso neoformado en el que se detectan zonas de tejido mineralizado que está organizado, formando osteonas constituidas por láminas de hueso que se disponen de forma concéntrica alrededor de los conductos de Havers. Este tejido organizado es mucho más apreciable en los defectos tratados con melatonina. También se observan zonas de tejido óseo dispuesto de forma irregular, pero en menor medida que en el grupo control. Tanto en los defectos tratados con melatonina como en los tratados con apigenina no existen restos de material de regeneración, ya que éste ha sido reabsorbido.

4.1.2 Análisis Histomorfométrico

La histomorfometría revela que el grupo sin tratamiento presenta un mayor porcentaje de hueso inmaduro respecto a la totalidad de hueso neoformado, en concreto un $(57,66 \pm 2,29)$; para los defectos óseos tratados con apigenina, se obtiene un porcentaje de hueso inmaduro de $(32,62 \pm 2,76)$ y, los defectos tratados con melatonina son los que muestran, con un valor de $(21,96 \pm 5,42)$, un menor porcentaje de hueso inmaduro (Tabla 1).

	Control	Melatonina	Apigenina
% Hueso	57,66 ± 2,29	21,96 ± 5,42	32,62 ± 2,76

Tabla 1. Parámetros histomorfométricos a los 30 días.

En el análisis de las diferencias entre las tres muestras del estudio (Tabla 1) se muestra lo siguiente:

- El hueso inmaduro en el grupo tratado con melatonina es inferior al del grupo control y la diferencia entre las medias es estadísticamente significativa ($t(8)=16,222$).
- El hueso inmaduro en el grupo tratado con apigenina es inferior al del grupo sin tratamiento y la diferencia de medias también ha resultado significativa ($t(8)=19,167$).
- Respecto a los grupos con tratamiento, el hueso inmaduro en el grupo

tratado con melatonina es inferior al del grupo tratado con flavonoides y esta diferencia es estadísticamente significativa ($t(8)=10,301$).

Control_Melatonina		Control_Apigenina		Apigenina	
t	p	t	p	t	p
16,222	,000*	19.167	,000*	10,301	,000*

*P < 0,05

Tabla 2. Pruebas t de las diferencias de hueso inmaduro entre los grupos al primer mes.

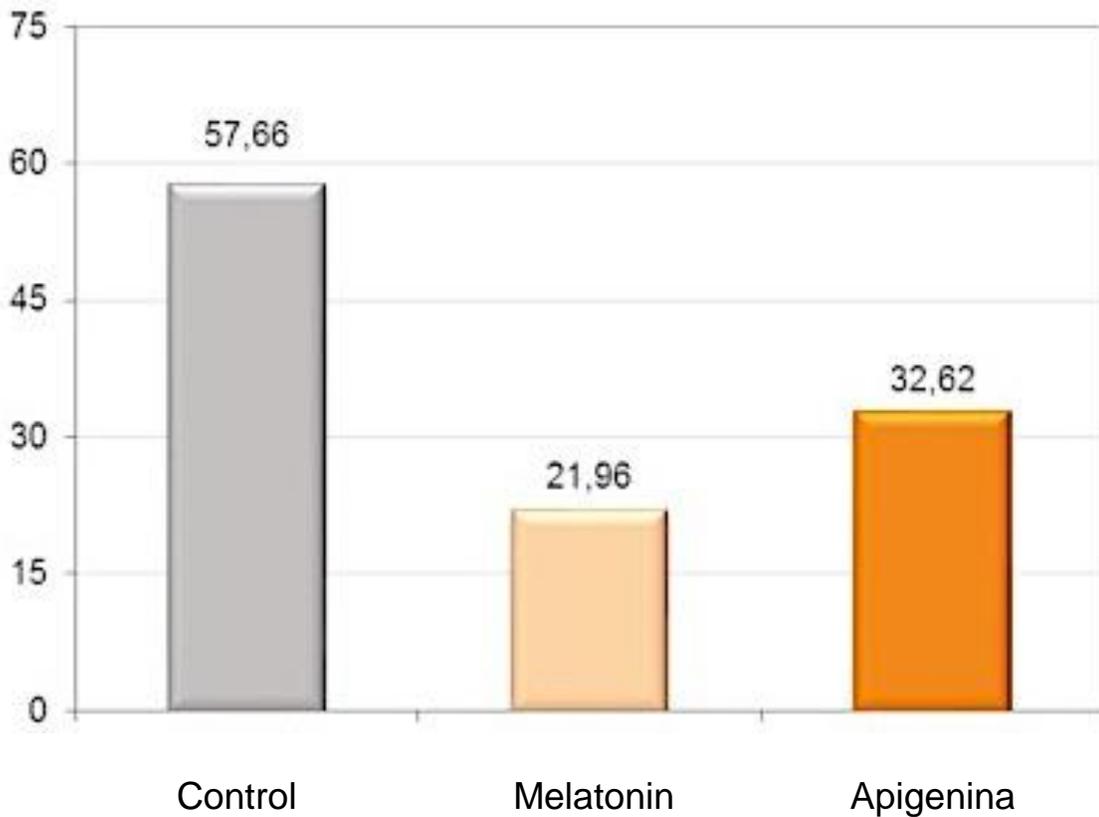


Gráfico 3. Valores medios del hueso inmaduro a los 30 días en el grupo de control, melatonina y flavonoides

El gráfico 1 muestra que a los 30 días hay diferencias entre los porcentajes de hueso inmaduro que presentan cada uno de los grupos y los análisis reflejan que las comparaciones entre las medias de los grupos han resultado estadísticamente significativas.

4.2 . Sesenta días

4.1.1 Microscopio óptico

En el grupo control se observa que hay una mayor organización del hueso neoformado que cubre el defecto óseo, ya que las imágenes muestran zonas de láminas concéntricas formando osteonas, aunque hay otras zonas que todavía presentan huso inmaduro desorganizado.

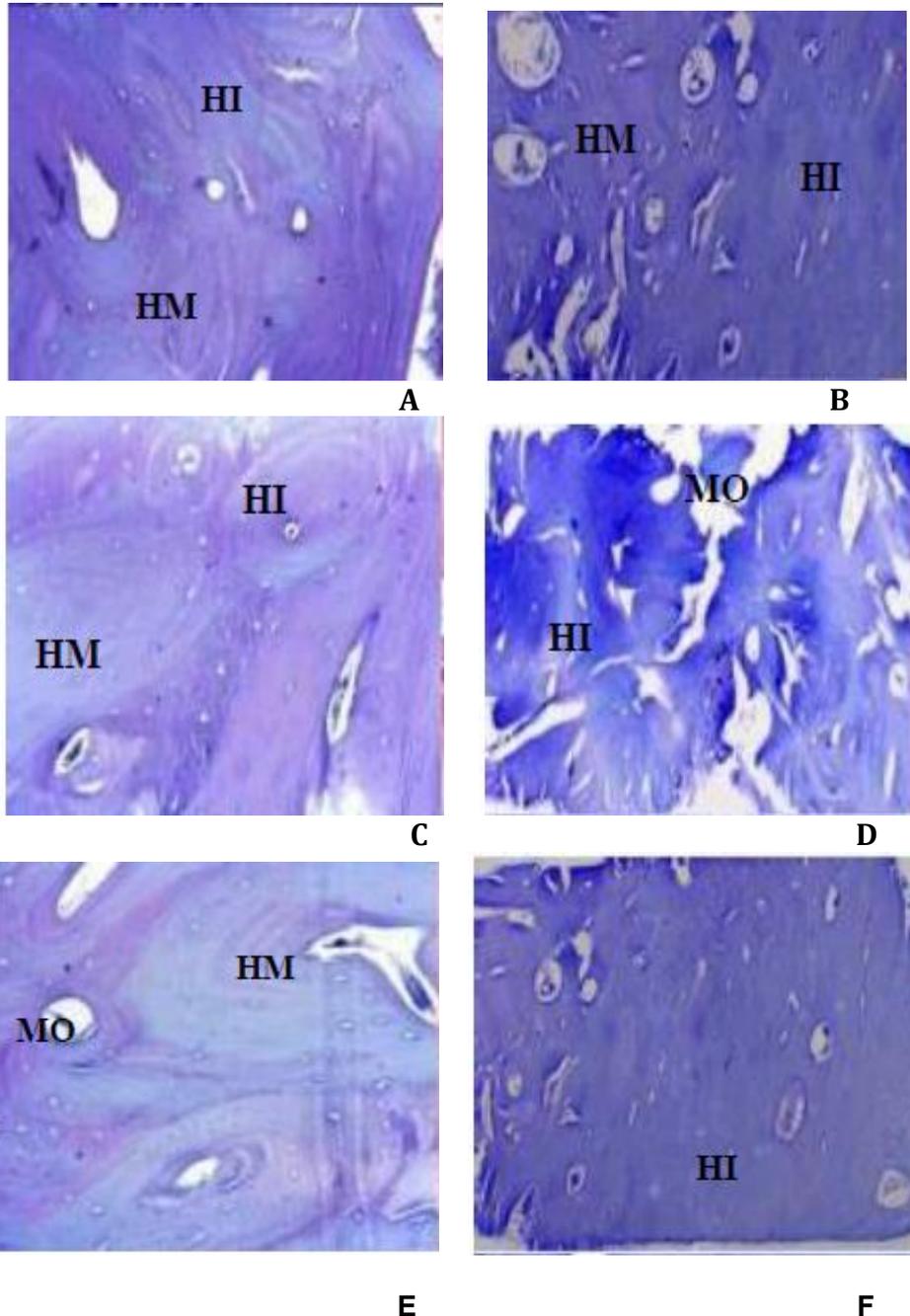


Figura 31: A y B) Control 60 días. C y D) Apigenina 60 días. E y F) Melatonina 60 días.
***H.I.:** Hueso Inmaduro Desorganizado **H.M.:** Hueso Maduro Organizado. **M.O.:** Medula ósea
Tinción azul de Toluidina.

Respecto al grupo tratado con apigenina, las imágenes se caracterizan por el predominio de hueso neoformado maduro organizado en osteonas, aunque aún existen áreas de hueso desorganizado con elevada celularidad. Sin embargo, estas zonas son muy pequeñas respecto al total del tejido óseo.

Por otra parte, en el grupo tratado con melatonina se observan imágenes caracterizadas por tejido óseo neoformado totalmente maduro y organizado en osteonas.

4.2.2 Análisis Histomorfométrico

La histomorfometría revela que, a los 60 días, el grupo control es el que presenta mayor porcentaje de hueso inmaduro con respecto a la totalidad de hueso neoformado ($35,28 \pm 1,31$); en los grupos con tratamiento se muestra que, en los defectos óseos tratados con apigenina, el porcentaje de hueso inmaduro es de ($18,15 \pm 4,25$) y, para los defectos tratados con melatonina, el porcentaje de hueso inmaduro es el más bajo, en concreto de ($9,69 \pm 1,37$) con respecto a la totalidad de hueso neoformado (Tabla 3)

	Control	Melatonina	Apigenina
% Hueso	$35,28 \pm 1,31$	$9,69 \pm 1,37$	$18,15 \pm 4,25$

Tabla 3. Parámetros histomorfométricos a los 60 días.

Respecto al análisis de las diferencias entre las tres muestras del estudio a los 60 días (Tabla 3) observamos lo siguiente:

- El hueso inmaduro en el grupo tratado con melatonina es inferior al del grupo control y la diferencia de las medias es estadísticamente significativa ($t(8)=51,001$).
- El hueso inmaduro en el grupo tratado con apigenina es inferior al del grupo sin tratamiento y la diferencia de medias que se obtiene también ha resultado significativa ($t(8)=12,441$).

--- En cuanto a los grupos a los que se ha aplicado tratamiento, en el grupo tratado con melatonina el hueso inmaduro es inferior al del grupo tratado con flavonoides y la diferencia en el segundo mes también es estadísticamente significativa ($t(8)=8,714$).

Control_Melatonina		Control_Apigenina		Apigenina	
t	p	t	p	t	p
51,001	,000*	12,441	,000*	8,714	,000*

*P < 0,05

Tabla 4. Pruebas t de las diferencias de hueso inmaduro entre los grupos al segundo mes.

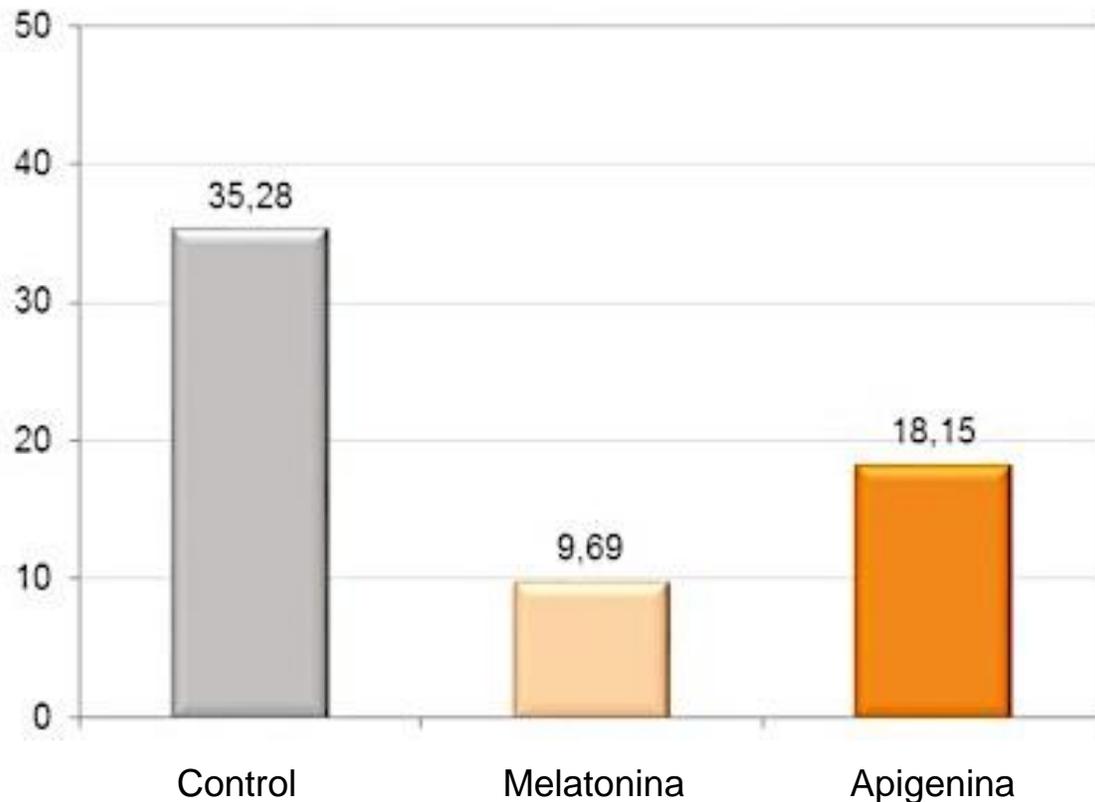


Gráfico 2. Valores medios del hueso inmaduro a los 60 días en el grupo de control, melatonina y flavonoides

El gráfico 2 muestra que a los 60 días hay diferencias entre los porcentajes de hueso inmaduro que presentan los tres grupos y, además, los análisis reflejan que las comparaciones entre las medias de los grupos han resultado estadísticamente significativas.

4.3 Noventa días

4.3.1 Microscopio óptico

A los 90 días, tanto el grupo control, como el grupo tratado con melatonina y el grupo tratado con apigenina presentan imágenes caracterizadas por tejido óseo completamente maduro formado por osteonas, aunque existen pequeños restos de tejido desorganizado que corresponden a zonas de remodelación ósea.

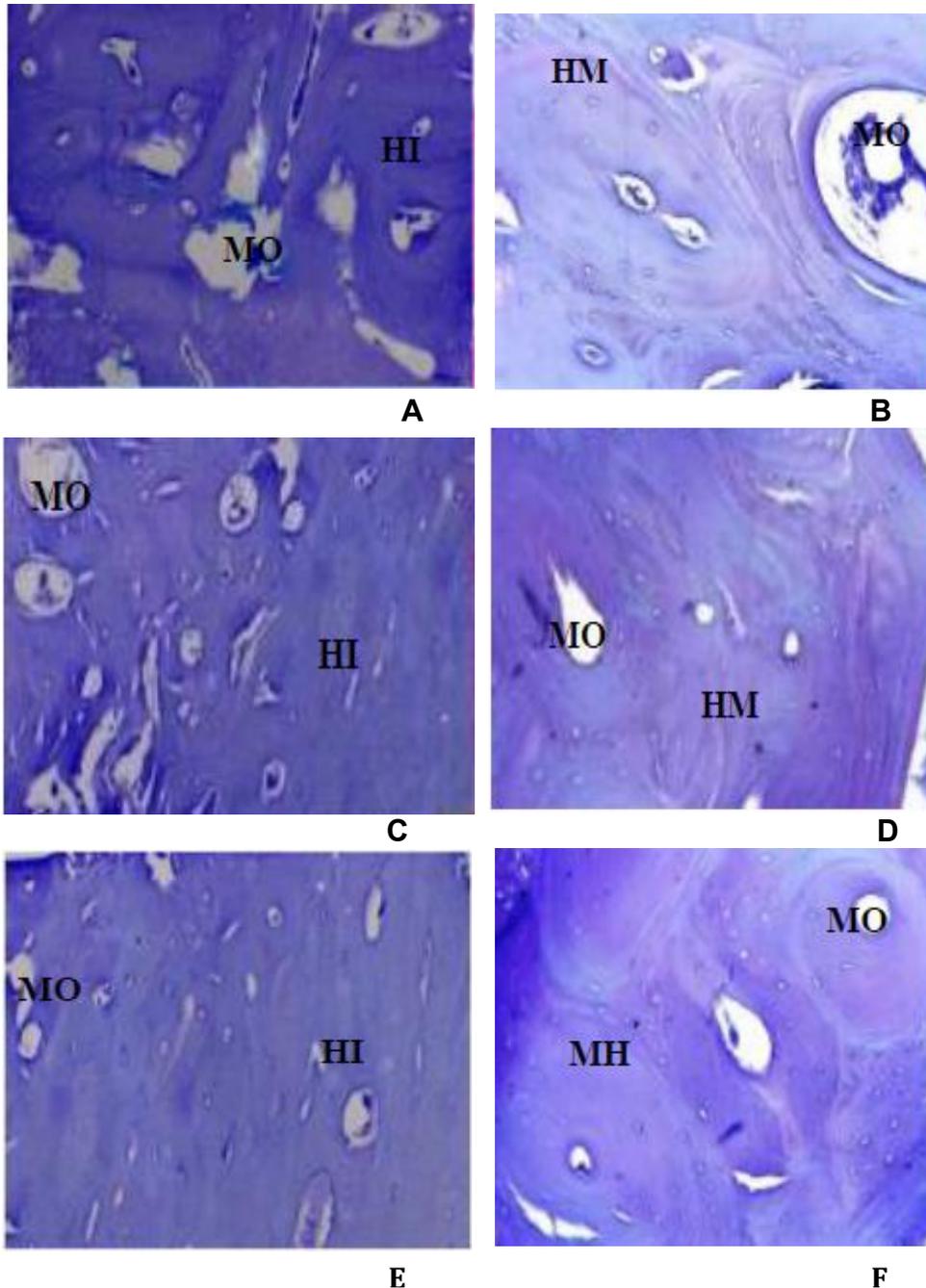


Figura 32: A y B) Control 90 días. C y D) Apigenina 90 días. E y F) Melatonina 90 días Imágenes caracterizadas por tejido óseo completamente maduro formado por osteonas. **H.M:** Hueso Maduro Organizado. **H.I:** Hueso Inmaduro Desorganizado. **M.O:** Medula ósea Tinción azul de Toluidina.

4.3.2 Análisis histomorfométrico

La histomorfometría revela que se han reducido las diferencias en el porcentaje de hueso inmaduro que existe entre los tres grupos. Aun así, el grupo sin tratamiento continua presentando el mayor porcentaje de hueso inmaduro con respecto a la totalidad de hueso neoformado ($8,20 \pm 1,39$). Para los defectos óseos tratados con apigenina el porcentaje de hueso inmaduro es de ($7,20 \pm 3,63$), y para los defectos tratados con melatonina, el porcentaje de hueso inmaduro es el más bajo, de ($5,97 \pm 1,99$), con respecto a la totalidad de hueso neoformado (Tabla 5).

%	Control	Melatonina	Apigenina
Hueso inmaduro	$8,20 \pm 1,39$	$5,97 \pm 1,99$	$7,20 \pm 3,63$

Tabla 5. Parámetros histomorfométricos a los 90 días.

Respecto al análisis de las diferencias entre las tres muestras del estudio a los 90 días (Tabla 5) observamos lo siguiente:

- En el grupo tratado con melatonina, el hueso inmaduro es inferior al del grupo sin tratamiento. No obstante, la diferencia de las medias no es estadísticamente significativa ($t(8)=2,201$) a los 90 días.
- En el grupo tratado con apigenina, el hueso inmaduro también es inferior al del grupo control y la diferencia de medias que se obtiene tampoco ha resultado significativa ($t(8)=,619$).
- Si comparamos los grupos con tratamiento, en el grupo tratado con melatonina el hueso inmaduro es inferior al del grupo tratado con flavonoides; sin embargo, la diferencia en el tercer mes no es estadísticamente significativa ($t(8)=1,637$).

Control_Melatonina		Control_Apigenina		Apigenina	
t	p	t	p	t	p
16,222	,000*	19.167	,000*	10,301	,000*

*P <0,05

Tabla 6: Pruebas t de las diferencias de hueso inmaduro entre grupos al tercer mes.

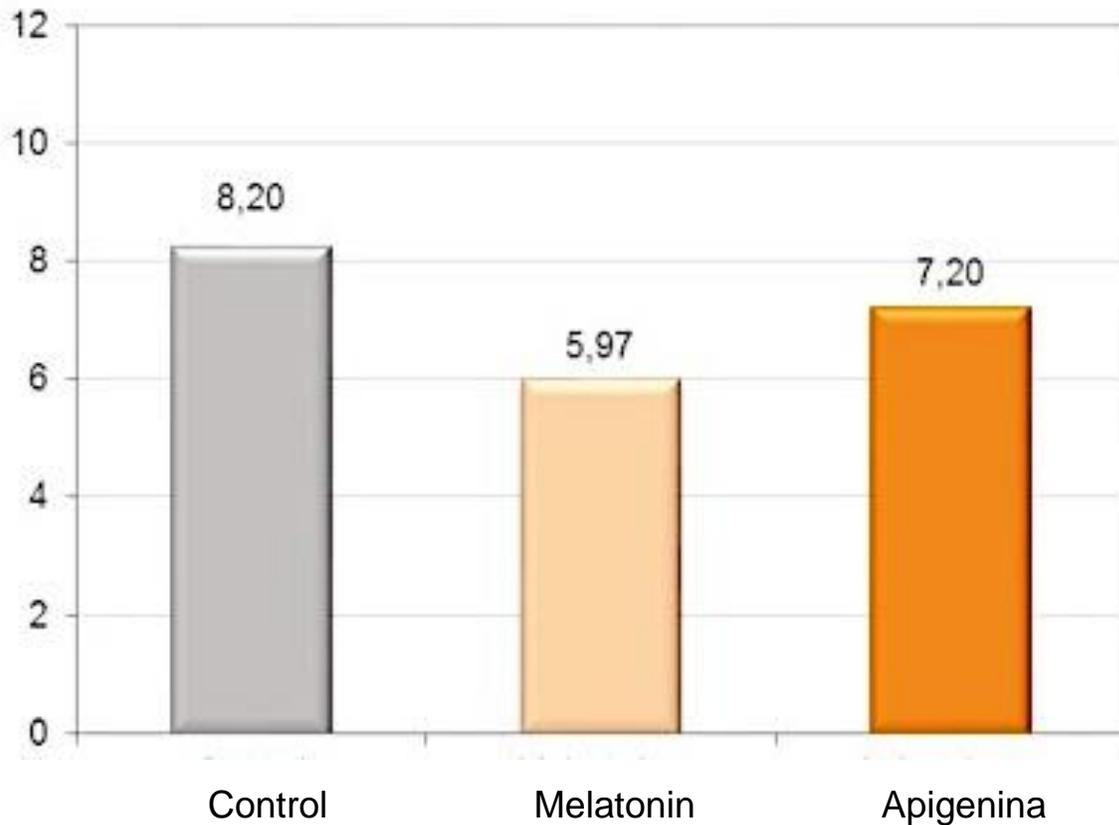


Gráfico 3. Valores medios del hueso inmaduro a los 90 días en el grupo de control, melatonina y flavonoides.

El gráfico 3 muestra que a los 90 días se han reducido las diferencias entre los porcentajes de hueso inmaduro de los tres grupos y, en consecuencia, la comparación entre las medias no ha resultado estadísticamente significativa.

4.4 Comparación entre los diferentes periodos de estudio

El análisis de la evolución del porcentaje de hueso inmaduro en el grupo con tratamiento de melatonina muestra lo siguiente (Tabla 8):

- La diferencia entre las medias de hueso inmaduro del segundo y del primer mes es estadísticamente significativa ($t(8)=8,479$).
- La diferencia entre las medias de hueso inmaduro del tercer y del segundo mes también es estadísticamente significativa ($t(8)=8,707$).

Melatonina30_Melatonina60		Melatonina60_Melatonina90	
t	P	t	P
8,479	,000*	8,707	,000*

* P < 0,05

Tabla 7. Pruebas t de las diferencias de hueso inmaduro entre el primer, segundo y tercer mes en el grupo melatonina.

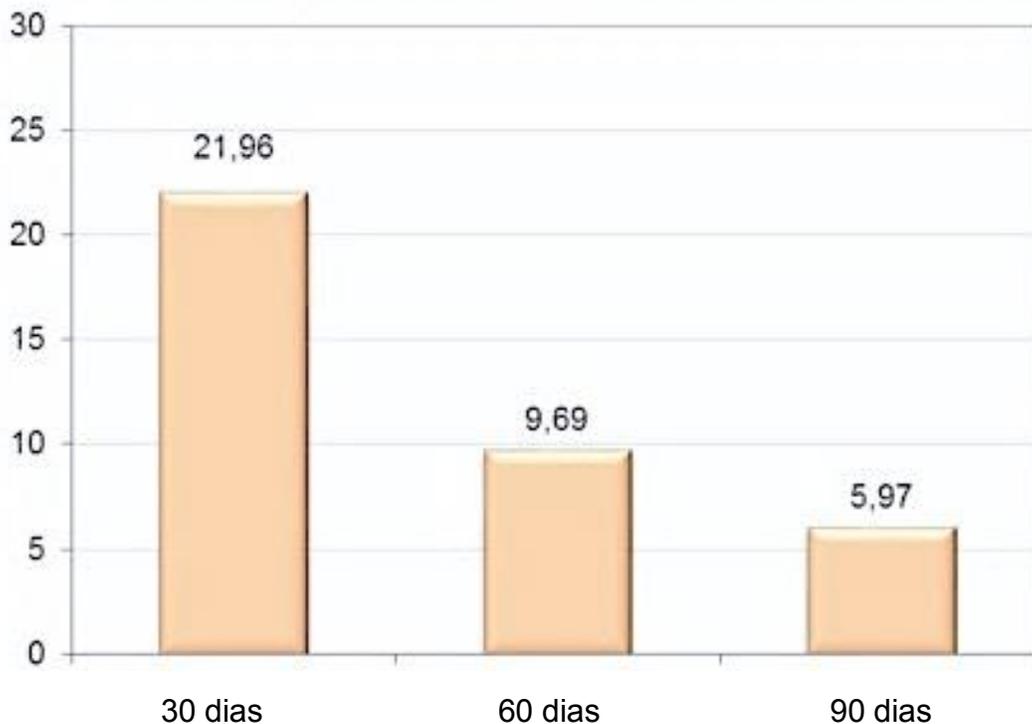


Gráfico 4. Valores medios del hueso inmaduro a los 30, 60, 90 días en el grupo de flavonoides

Como podemos ver en el gráfico 4, la aplicación de melatonina ha producido una disminución en el porcentaje de hueso inmaduro a lo largo de los meses y las diferencias entre las medias de cada mes han resultado estadísticamente significativas.

Con respecto a la evolución del porcentaje de hueso inmaduro en el grupo al que se ha aplicado apigenina (Tabla 8) podemos observar lo siguiente:

- La diferencia entre las medias de hueso inmaduro del segundo y del primer mes es estadísticamente significativa ($t(8)=26,568$).
- La diferencia entre las medias de hueso inmaduro del tercer y del segundo mes también es estadísticamente significativa ($t(8)=26,564$).

Apigenina 30_ Apigenina		Apigenina 60_ Apigenina	
t	P	t	P
26,568	,000*	26,568	,000*

*** $P < 0,05$**

Tabla 8: Pruebas t de las diferencias de hueso inmaduro entre el primer, segundo y tercer mes en el grupo flavonoides

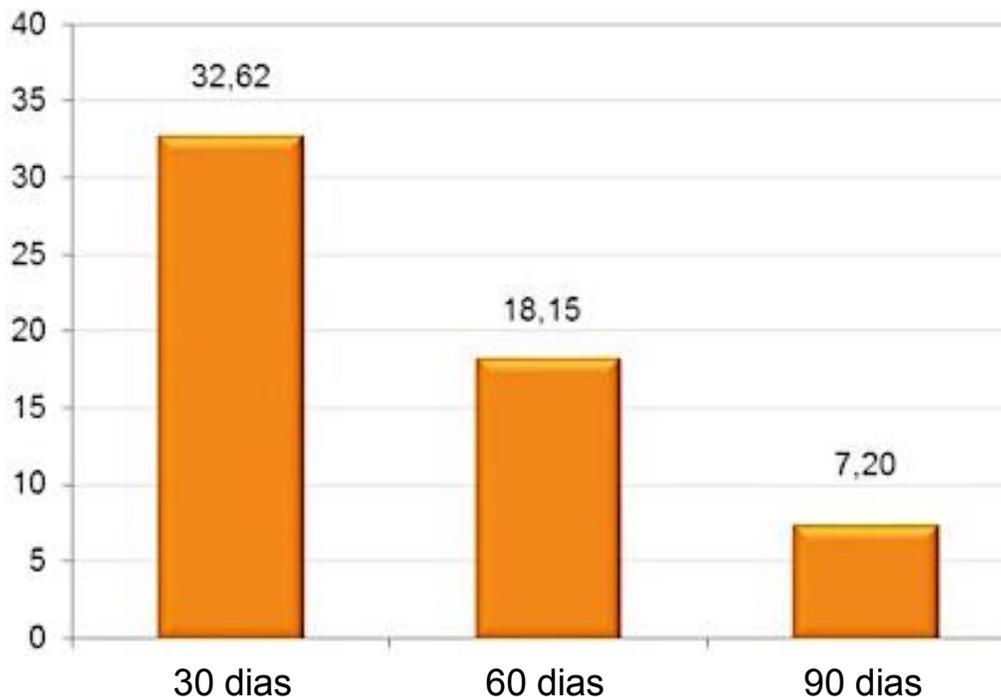


Gráfico 5. Valores medios del hueso inmaduro a los 30, 60, 90 días en el grupo de flavonoides.

En el gráfico 5 se observa que la aplicación de apigenina también ha producido una disminución en el porcentaje de hueso inmaduro a lo largo de los meses y las diferencias entre las medias de cada mes han resultado estadísticamente significativas.

Discusión

5. Discusión

El objetivo de esta investigación ha sido evaluar los efectos de la aplicación de melatonina y de apigenina en la neoformación y maduración ósea en alvéolos post-extracción.

Se utilizó perros Beagle por la semejanza de su cresta alveolar con los humanos, además son de fácil manejo y son fáciles de obtener. Decidimos usar sólo perros Beagle macho porque las hembras podían alterar los valores histomorfométricos óseos como consecuencia de la secreción de estrógenos.

Se ha demostrado otros estudios con perros, que después de las exodoncias, y antes de colocar los implantes, hace falta que pasen aproximadamente 60 días de curación con el fin de obtener una correcta cicatrización de los tejidos blandos y una organización estable de los tejidos óseos, obteniendo así una mandíbula edéntula perfecta para la colocación de implantes dentales. **(Block MS. y cols. 2000; Oda T. y cols. 2000)**. Nuestros resultados demuestran que hace falta solamente 30 días para obtener una correcta cicatrización de los tejidos blandos y una organización estable de los tejidos óseos tras la aplicación de sustancias osteogénicas como la melatonina o la apigenina.

La relación entre la melatonina y el metabolismo óseo ha sido documentada en varios estudios, en los cuales la melatonina actúa en el hueso como un factor local de crecimiento, con efectos paracrinos en células cercanas. **(Conti A. y cols. 2000; Nakade O. y cols. 1999; Koyama H. y cols. 2002; Pandi_Perumal SR. y cols. 2006)**. Nuestros resultados han demostrado demostrando que la aplicación de la melatonina en alveolos postextracción aumentó significativamente el porcentaje de la neoformación ósea y hueso maduro. De forma general, podemos decir que a los 30 días existe mayor formación de hueso maduro y por lo tanto el proceso de neoformación ósea es más rápido.

En este estudio a los 30 días de la aplicación de melatonina y en alvéolos postextracción se observó un bajo porcentaje de hueso inmaduro con diferencias estadísticamente significativas si lo comparamos con el grupo control. La aplicación de la melatonina, en la cavidad oral ha demostrado tener efectos benéficos en el tratamiento de la patología periodontal, como procesos regenerativos postexodoncia **(Cutando A. y cols. 2007)**. 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. **(Nakade O. y cols. 1999; Roth JA. y cols 1999; Radio NM. y cols. 2006)**. Este incremento de la madurez ósea es aún más marcado para la melatonina que para la apigenina, y estas diferencias se mantienen cuando realizamos el estudio a los 60 días. Estos datos representan la capacidad que posee la melatonina para estimular y acelerar el proceso de maduración ósea en estadíos tempranos.

Esto significa que la melatonina tiene una acción directa sobre los osteoblastos estimulando la diferenciación de preosteoblastos tanto en cantidad como en velocidad, lo que supone una mayor producción de matriz ósea y su correspondiente calcificación. Roth JA. y cols. 1999 observaron que la melatonina estimulaba la diferenciación de líneas preosteoblasticas, de forma que las células tratadas con melatonina maduraron a osteoblastos en plazo de 12 días, frente a los 21 días de los preosteoblastos del grupo control **(Roth JA. y cols 1999)**. En nuestro trabajo el aumento en la proliferación de los osteoblastos llevado a cabo por la melatonina, se traduciría en una mayor formación de hueso maduro, ya que la temprana diferenciación celular aceleraría notablemente la síntesis y mineralización de la matriz osteoide. A nivel preosteoblástico, la melatonina mejora la formación de nuevo tejido óseo ya que estimula la expresión de genes de ciertas proteínas en la matriz ósea.

En este sentido, se ha demostrado que la melatonina, después de un periodo de 5 a 9 días, promueve la expresión de genes para la producción de sialoproteína ósea, fosfatasa alcalina, osteopontina y osteocalcina, lo que acorta significativamente el tiempo necesario para la diferenciación de

los preosteoblastos en osteoblastos, desde 21 días a 12 días (**Siddiqui JA. y cols. 2010**).

En estudios similares los valores que se obtuvieron demuestran que la melatonina de manera independiente induce la formación de hueso, avalando de esta manera nuestros resultados. La melatonina es muy efectiva a los 15 días después de su colocación, mejorando de manera significativa la formación ósea aquellos valores que no necesitan una formación de hueso nuevo, sino que estimula al hueso existente. (**Cutando A y cols. 2008; Takechi M. y cols. 2008**). La capacidad osteoinductora de la melatonina es limitada, comienza a decrecer a partir de los 30 días, excepto para los parámetros que están relacionados con la formación de hueso si permaneciese de manera continuada esta acción, no habría un efecto terapéutico, sino un efecto oncogénico (**Takechi M. y cols 2008**).

En el estudio de Koyama y cols. realizado en ratones, se evalúa la capacidad de la melatonina para aumentar la masa ósea. Los resultados obtenidos expresan que la melatonina es capaz de aumentar la masa ósea, sin embargo; no hay un aumento apreciable de los valores histomorfométricos. Este aumento de la masa ósea se debe a la supresión de la reabsorción (**Koyama H. y cols. 2002**), como pudimos comprobar en nuestro trabajo, que al expresar la melatonina es capaz de aumentar la masa ósea, lo cual se debe a la supresión de la reabsorción.

En este ámbito, encontramos los criterios de Bradford Hill entre una exposición y un efecto (**Bradford Hill A. y cols. 1965**). Ante esta situación se trata de conocer si la asociación entre las dos variables que investigamos existe una posible relación causa-efecto, ha sido confirmada por más de un estudio, en poblaciones y circunstancias distintas por autores diferentes. En este estudio se ha demostrado que la aplicación de melatonina sí es capaz de modificar los parámetros histomorfométricos óseos.

Numerosos trabajos publicados hasta el momento describen el efecto protector de la melatonina en diferentes modelos experimentales de estrés oxidativo (**Ians O. y cols. 1991; Antolin A. y cols. 1996**). En el grupo de perros al que se le

aplicó melatonina tópica en las heridas alveolares, se apreció cómo la melatonina redujo significativamente los elevados niveles de peroxidación lipídica del grupo control un día después de las exodoncias, incluso ligeramente por debajo de los valores basales. Otros autores también demuestran que la melatonina es capaz de reducir eficazmente in vivo la peroxidación de los lípidos **(Yamamoto HA. y cols. 1996; Reiter RJ. y cols. 1998)**. Yamamoto y Tang refieren que la melatonina previene la peroxidación lipídica inducida por cianuro en ratones. Del mismo modo, el pretratamiento con esta indolamina redujo la formación de malonildialdehído, un indicador de peroxidación lipídica, en animales con otitis media, donde existía, una respuesta inflamatoria de base **(Taysi S. y cols. 2005)**.

Se sabe que la melatonina está presente en elevadas concentraciones en la médula ósea, donde excede los niveles séricos en 100 veces **(Tan DX y cols. 1993)**. También se ha demostrado que la melatonina influye sobre las células óseas precursoras presentes en la médula ósea de ratas **(Cutando A y cols. 2008)**.

A nivel de los osteoclastos, tienen lugar una serie de reacciones, que provocan un aumento de grupos hidroxilos y oxígeno. Este ambiente da lugar a la degradación de los componentes de la matriz ósea, colágeno y ácido hialurónico, ya que son proteínas susceptibles de ser oxidadas por radicales libres **(Shigeru K. y cols. 2010)**. La melatonina es capaz de neutralizar los radicales libres y, de esta forma, inhibir la reabsorción ósea **(Tan Dx. y cols. 2007; Calvo-Guirado JL. y cols. 2010)**.

Esta inhibición de la reabsorción ósea es reforzada por otra reacción inducida por este incremento en la formación de la melatonina en el proceso osteoclastogénesis.

La melatonina a través de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias puede atenuar esta reacción y disminuir la producción de especies reactivas (Cutando 2007) y como consecuencia la reabsorción ósea. Esta inhibición de la

reabsorción ósea puede ser explicada por otra acción inducida por la melatonina sobre el proceso de la osteoclastogénesis. La melatonina altera el proceso de destrucción del hueso mediante la modulación de la tríada molecular OPG/RANK/RANKL, elevando los niveles de OPG, lo que impide la unión de RANKL a su receptor RANK y, por tanto, inhibiendo la reabsorción ósea **(Koyama H. y cols. 2002)**. Como se ha podido comprobar en nuestro estudio la melatonina inhibe la reabsorción ósea y altera el proceso de destrucción del hueso mediante la modulación de la triada molecular.

En un estudio llevado a cabo por Cutando A. y cols. (2008) se evaluó el efecto de la aplicación tópica de 1,2 mg de polvo liofilizado de melatonina en los alvéolos post-extracción de molares y premolares en perros *Beagle* en el momento de la colocación de implantes post-extracción. Asimismo, se llevó a cabo un estudio histomorfométrico a las dos semanas de su aplicación y se observó que había aumentado el perímetro del hueso que estaba en contacto con los implantes que recibieron melatonina. La aplicación de melatonina dio lugar a una mayor densidad ósea, mayor formación de hueso nuevo, y hueso inter-espiras, comparado con los controles. En este sentido coincide con nuestros resultados donde obtenemos mas anchura y grosor del hueso a los 30 días al aplicar la melatonina.

Cutando A. y cols. (2007) realizaron otro estudio en el que se extrajeron los molares y premolares de las mandíbulas superior e inferior de 16 perros de raza *Beagle*. De estos 16 perros, 8 fueron tratados con 2 mg melatonina aplicada en los alvéolos postextracción, mientras que los otros 8 perros actuaron de grupo control. Mediante el análisis de sangre se concluyó que la aplicación de melatonina reducía el estrés oxidativo. En nuestros resultados se presupone 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.

En nuestro trabajo nos planteamos estudiar los efectos de los flavonoides como la apigenina, nuestro estudio muestra un incremento en la velocidad de maduración ósea tanto a los 30 como a los 60 días, aunque este incremento es menor si lo comparamos con los efectos de la melatonina. Del mismo modo, las

diferencias son significativas cuando lo comparamos con los resultados obtenidos en el grupo control. Estos resultados según otros demuestran estudios que los flavonoides actúan como agentes de activación osteoblástica incidiendo en el incremento de la densidad mineral ósea, en grado similar al proporcionado por otras alternativas terapéuticas **(Chiechi LM. y cols. 2002)**. Además se ha documentado que la apigenina posee efectos protectores sobre la pérdida ósea en ratas ovariectomizadas. Otros estudios demuestran que la apigenina actúa a nivel óseo disminuyendo la osteoclastogénesis y la función osteoclástica y, por otro lado, incrementando la diferenciación osteoblástica. **(Shigeyama Y. y cols. 2000; Bandyopadhyay S. y cols. 2006; Choi EM. y cols. 2007; Siddiqui JA. y cols. 2010)**.

En otra línea, la relación entre los flavonoides y el metabolismo óseo está siendo estudiada. Se sabe que estas moléculas poseen actividades reguladoras a nivel biológico, dado que sus principales efectos se ejercen en las células sanguíneas y las células endoteliales a escala microvascular. No resulta sorprendente que presenten propiedades antiinflamatorias, antitumorales y actúen como protectores a nivel cardiovascular **(Simon Z. y col. 2002)**. En cuanto a sus efectos a nivel óseo, se está estudiando a la ipriflavona del grupo de las isoflavonas.

Numerosos estudios *in vitro* han referido que los flavonoides son importantes mediadores en la estimulación y formación ósea, promoviendo la diferenciación osteoblástica e inhibiendo la osteoclastogénesis **(Jeong YJ. y cols. 2005; Benavente-García O. 2008; Kim HS. y cols. 2013)**.

En este estudio, hemos comprobado el incremento en la formación de nuevo hueso estimulado por flavonoides a estadios tempranos con una mayor producción y diferenciación celular en la zona cortical que acelera considerablemente la síntesis y mineralización de la matriz ósea. Además, los flavonoides disminuyen la reabsorción ósea ya que, debido a sus propiedades antioxidantes, actúan sobre los osteoclastos inhibiendo las señales moleculares

encargadas de promover su diferenciación (**Bandyopadhyay S. y cols. 2006; Goto T. y cols. 2014**). Se ha demostrado en otro estudio que la apigenina no sólo inhibe la reabsorción ósea sino que también, induce a la apoptosis de los osteoclastos, demostrando así un efecto positivo sobre el recambio óseo (**Jeon H. y cols. 2008**).

La apigenina incrementa de forma significativa la proliferación y diferenciación de los osteoblastos. Estos efectos se deben a la capacidad de la apigenina para unirse a los receptores de estrógenos. Por su estructura, la apigenina se asemeja a los estrógenos; de ahí su relativa adhesión a los receptores estrogénicos tipo α y β , aunque en mayor grado a los segundos. Esta preferencia para ligarse con los receptores tipo β llevará consigo una mayor actividad de transcripción de la apigenina sobre aquellos tejidos en que los receptores beta están presentes en cantidades relevantes, tales como el hueso, el sistema nervioso central y el endotelio vascular. La apigenina incrementa los procesos de proliferación y diferenciación osteoblástica, lo que puede explicarse por el efecto que posee sobre los receptores beta presentes en los osteoblastos. La apigenina, de modo análogo al β -estradiol, aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina, un marcador temprano de la diferenciación osteoblástica, y aumenta la expresión génica de la osteocalcina en estas células, un marcador más tardío de diferenciación osteoblástica (**Bandyopadhyay S. y cols. 2006; Siddiqui JA. y cols. 2010**).

Además, la actividad osteogénica de la apigenina es provocada por la estimulación de la producción de células osteoprogenitoras en la médula ósea mediante la expresión génica de proteínas morfogenéticas del hueso 2 y 6 (BMP-2 y BMP-6) y mediante la expresión del polipéptido 1 del colágeno tipo I (COL1A1) necesario para la diferenciación de estas células. (**Bandyopadhyay S, y cols. 2006; Siddiqui JA. y cols. 2010**).

A nivel de los osteoclastos, la apigenina inhibe el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que induce la secreción de varias citocinas osteoclastogénicas por parte de la línea celular osteoblástica. El TNF- α induce la producción de interleucina-6 (IL-6), RANTES (regulador de la expresión, secreción y activación

de células T) y proteína quimiotáctica monocítica 1 y 3 (MCP-1 y MCP-3). Por otra parte, incrementa la producción de IFN-gamma, que estimula la secreción de monocinas, CXCL-9 y CXCL-10 en los osteoblastos. Estas citocinas inflamatorias contribuyen a la osteoclastogénesis al estimular a los osteoblastos, a los fibroblastos y a las células T activadas para producir RANKL, que a su vez induce la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea. **(Simonet WS. y cols. 1997; Lacey DL. y cols. 1998; Burgess TL, y cols. 1999; Shigeyama Y. y cols. 2000; Riancho JA. y cols. 2003; Bandyopadhyay S. y cols. 2006; Choi EM. y cols. 2007).**

De forma similar, la apigenina inhibe la expresión de marcadores de la diferenciación osteoclástica como la fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP), el receptor activador del factor nuclear kappa (RANK) y el receptor de calcitonina, lo que provoca la inhibición de la formación de osteoclastos multinucleados. Esta inhibición tiene lugar incluso en células precursoras osteoclásticas obtenidas de la médula ósea de ratones, después del tratamiento con RANKL y con el factor estimulante de la colonia de macrófagos (MCSF) **(Tan DX. y cols. 1993).**

En un estudio se ha obtenido resultado similares a la de nuestro estudio demostrando que la acción positiva de la apigenina sobre el recambio óseo estimulando los efectos de activación de las células osteoblásticas. Aunque este mecanismo de acción tuvo un desarrollo lento **(Enrique BM. y cols. 20013).** Tales como observamos en nuestro estudio al estudiar las imágenes del microscopio, se observó un regeneración ósea a los 30 días aunque es menor que la melatonina.

Conclusiones

5 Conclusiones

La melatonina y apigenina demostraron sus ventajas en la maduración ósea, aunque el tratamiento con melatonina favorece la neoformación y maduración ósea en mayor medida que el tratamiento con apigenina.

La aplicación tópica de melatonina así como de apigenina dan lugar a una disminución significativa del porcentaje de hueso inmaduro a lo largo del periodo de estudio.

Bibliografía

Bibliografía:

1. Abarrategi A. Estudio del quitosano como biomaterial portador de rhBMP-2: desarrollo, caracterización y aplicabilidad en regeneración de tejido óseo [Tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Biológicas; 2009.
2. Acuña-Castroviejo D, Carretero M, Doerrier C, López LC, García Corzo L, Tresguerres JA, EscamesG. Melatonin protects lung mitochondria from aging. *Age* 2011; *Age (Dordr)*. 2012 Jun; 34(3): 681-92.
3. Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menéndez-Peláez A. Characterization of high- affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *Pineal Res*. 1994; 16(2): 100–112.
4. Amin I, Koh BK, Asmah R. Effect of cacao liquor extract on tumor marker enzymes during chemical hepatocarcinogenesis in rats. *J. Med. Food* 2004; 7: 7-2.
5. Anton-Tay F, Ramírez G, Martínez I et al. In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res*. 1998;23(5):601–606.
6. Antolin A, Rodriguez C, Sain Z RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML. Neuhormone melatonina prevents cell damage: Effect on gene expression of antioxidative enzymes. *FASEB J*. 1996; 10:882-90.
7. Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., Kinae, N.: Dietary Intakes of Flavonols, Flavones and Isoflavones by Japanese Women and the Inverse Correlation between Quercetin Intake and Plasma LDL Cholestero Concentration. *J Nutr*. 2000; 130(9): 2243- 50.

- 8.** Arana Molina C. Melatonina, estrés oxidativo y osteointegración en la cavidad oral. Universidad: Granada. Facultad de medicina y odontología, departamento e fisiología. Tesis doctoral. Fecha lectura: 2006.

- 9.** Aras HC, Ekström J. Melatonin-evoked in vivo secretion of protein and amylase from the parotid gland of the anaesthetised rat. *J Pineal Res* 2008; 45(4): 413-21.

- 10.** Arboleya L, Castañeda S. Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. *Reumatol Clin.* 2013; 9(5): 303-15.

- 11.** Arias J, Melean E, Valero N, Pons H, Chacín-Bonilla L, Larreal, Bonilla E. Efecto de la Melatonina en la proliferación linfocitaria y la producción de Interleucina 2 (IL-2) e Interleucina 1 beta (IL-1) en esplenocitos de ratones. *Invest. Clín.* 2003; 44(1): 41-50.

- 12.** Bandyopadhyay S, Lion JM, Mentaverri R, Ricupero DA, Kamel S, Romero JR, Chattopadhyay N. Attenuation of osteoclastogenesis and osteoclast function by apigenin. *Biochem Pharmacol.* 2006; 14; 72(2): 184-97.

- 13.** Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Agric Food Chem.* 2008; 56(15): 6185-205.

- 14.** Bhagwat SA, Haytowitz DB, Holden JM. USDA database for the flavonoid content of selected foods, release 3. U.S. Department of Agriculture. *Procedia food science. ARS.* 2011; 2:81-86

- 15.**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.

- 16.** Bradford Hill A. The environment and disease: Association or causation? *Proc R Soc Med* 1965; 58: 295-300.

- 17.** Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T (eds). *Tissue-integrated prostheses. Osseointegration in clinical dentistry*. Chicago: Quintessence; 1985; 77(3): 496- 497.

- 18.** Burgess TL, Qian YX, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M et al. The Ligand for Osteoprotegerin (OPGL) Directly Activates Mature Osteoclasts. *Cell Biol*. 1999; 145(3): 527-538.

- 19.** Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, Barone A, Cutando A, Alcaraz-Baños M, Chiva F, López-Marí L, Guardia. Melatonin plus porcine bone on discrete calcium deposit implant surface stimulates osteointegration in dental implants. *Pineal Res*. 2009; 47(2): 164-72

- 20.** Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, López-Marí L, Guardia J, Martínez JM, Barone a et al. Actions of melatonin mixed with collagenized porcine bone versus porcine bone only on osteointegration of dental implants. *Pineal Res*. 2010; 48(3): 194-203.

- 21.** Calvo-Guirado JL, Ramírez-Fernández MP, Gómez-Moreno G, Maté-Sánchez JE, Delgado-Ruiz R, Guardia J et al. Melatonin stimulates the growth of new bone around implants in the tibia of rabbits. *Pineal Res*. 2010; 49(4): 356–59.

- 22.** Carlberg C, Hooft Van Huijsduijnen R, Staple JK. RZR_s. A new family of retinoid- related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol*. 1994; 8(6): 757–770.
- 23.** Chesnutt BM, Yuan Y, Buddington K, Haggard WO y Bumgardner JD. Composite chitosan/nano-hydroxyapatite scaffolds induce osteocalcin production by osteoblasts in vitro and support bone formation in vivo. *Tissue Engineering Part A*. 2009; 15(9): 2571-2579.
- 24.** Chiechi LM, Secreto G, D'Amore M, Fanelli M, Venturelli E, Cantatore F, Valerio T, Laselva G, Loizzi P. Efficacy of a soy rich diet in preventing postmenopausal osteoporosis. The Menfis randomized trial. *Maturitas*. 2002; 42: 295-300.
- 25.** Choi EM. Apigenin increases osteoblastic differentiation and inhibits tumor necrosis factor- α -induced production of interleukin-6 and nitric oxide in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Die Pharmazie. IJPS*. 2007; 62(3): 216-220.
- 26.** Choi EJ, Kim GH. Apigenin Induces Apoptosis through a Mitochondria/Caspase- Pathway in Human Breast Cancer MDA-MB-453 Cells. *Clin Biochem Nutr*. 2009; 44(3):260-265.
- 27.** Chun, O. K., Chung, S. J., Song, W. O. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of US adults. *J Nutr*. 2007; 137(5): 1244-1252.
- 28.** Cobo CM, López-Quiles J. Efecto de la melatonina aplicada localmente en el interior de alveolos post-extracción de terceros molares retenidos. [Trabajo Fin de Máster]. Estudio piloto. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Odontología, 2013. [Trabajo Fin de Máster].

- 29.** Cutando A, Arana C, Gómez-Moreno G, Escames G, López A, Ferrera MJ, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. *Periodontol.* 2007; 78(3): 576-83.

- 30.** Cutando A, Calvo Guirado JL, Guardia J. La melatonina, aspectos clínicos en odontología. *J A D A.* 2009; 4(5): 244-249.

- 31.** Cutando A, Galindo P, Gómez-Moreno G, Arana C, Bolaños J, Acuña-Castroviejo D, Wang HL. Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. *Periodontol.* 2006; 77(9): 1533-1538.

- 32.** Cutando, A, Gómez-Moreno G, Arana C. Superficies bioactivas en implantología: una nueva perspectiva. *Avances en Periodoncia* 2007; 19(1): 43-50.

- 33.** Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ. Melatonin: potencial function in the oral cavity. *Periodontol. Pineal Research.* 2007; 78(6): 1094-102.

- 34.** Cutando A, Gomez-Moreno G, Arana C, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Melatonin reduces oxidative stress because of tooth removal. *J Pineal Res.* 2007; 42:419-20.

- 35.** Cutando A, Arana C, Gómez-Moreno G, Escames G, López A, Ferrera MJ, Reiter RJ, Acuña- Castroviejo D. Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. *J Periodontol.* 2007; 78:576-83.

- 36.** Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Muñoz F, Lopez-Peña M, Stephenson J, Reiter RJ. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. *Pineal Research*. 2008; 45:174–179.
- 37.** De Gortázar R, Rodríguez A, Argüelles E. Efectos moduladores de los fitoestrógenos sobre la diferenciación de osteoblastos humanos. *Mapfre Medicina*. 2005; 16(3): 174-183.
- 38.** Díaz B, Colmenero MD, Marín B. Capacidad antioxidante de la melatonina: su papel defensivo contra afecciones relacionadas con la edad *Medicina clínica*. 1998; 110(17): 668-676.
- 39.** Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ. Melatonina y Enfermedad Cardiovascular: ¿Mito o Realidad? *Rev Esp Cardiol*. 2012; 65(3): 215-218.
- 40.** Enríquez-Guevara EA, Aispuro-Hernández EV, Irasema A, Martínez-Téllez MA. Oligosacarinas Derivadas de Pared Celular: Actividad Biológica y Participación en la Respuesta de Defensa de Plantas. *Rev Mex. Fitopatol*. 2010; 28(2): 144-155.
- 41.** Esposti D, Mariani M, Demartini G, Lucini V, Fraschini F, Mancina MJ. Modulation of melatonin secretion by acetyl-L-carnitine in adult and old rats. *Pineal Res*. 1994; 17(3): 132-136.
- 42.** Fernández-Tresguerres I, Alobera MA, Del Canto M, Blanco L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006; 11:47-51.

- 43.** Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radical stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. Clin Invest. 1990; 85(3): 32-639.
- 44.** Gay G, Debaud JC.: Genetic study on indole-3 acetic acid production by ectomycorrhizal Hebeloma species: inter- and intraspecific variability in homo- and dikaryotic mycelia. A M B. 1987; 26: 141-146.
- 45.** Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, Karbownik M, Manchester LC, Cuzzocrea S, Fulia F, Barberi I. Individual and synergistic actions of melaton: Studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferoxamine in liver homogenates. J Pharm Pharmacol 2001; 53:1393-1401.
- 46.** Girgert R, Hanf V, Emons G, Gründker C. Membrane-bound melatonin receptor MT1 down-regulates estrogen responsive genes in breast cancer cells. Pineal Res. 2009; 47(1): 23–31.
- 47.** Gómez-Moreno G, Cutando-Soriano A, Arana C, Galindo P, Bolaños J, Acuña- Castroviejo D, Wang HL. Melatonin expresión in periodontal disease. J Periodontal Res. 2007; 42(6): 536-40.
- 48.** Gómez-Moreno G, Guardia J, Ferrera MJ, Cutando A, Reiter RJ. Melatonin in diseases of the oral cavity. Oral Dis. 2012; 16(3): 242-247.
- 49.** Gómez-Moreno G, Aguilar-Salvatierra A, Boquete-Castro A, Guardia J, Piattelli A, Perrotti V, Delgado-Ruiz R, Calvo-Guirado JL. Outcomes of Topical Applications of Melatonin in Implant Dentistry: A Systematic Review. Implant Dent. 2012; 14(2): 226-235.

- 50.** González-García R, Naval-Gías L, Muñoz-Guerra MF, Sastre-Pérez J, Rodríguez- Campo FJ, Gil-Díez-Usandizaga JL. Preprosthetic and implantological surgery in patients with severe maxillary atrophy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005, 10:343-54.

- 51.** Guerrero JM, Carrillo-Vico A, Lardone PJ. La melatonina. *J I C*. 2007; 373(1): 30-38.

- 52.** Gupta S, Afaq F and Mukhtar H: Involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. *Oncogene* 2002; 21: 3727-3738.

- 53.** Guskuma MH, Hochuli-Vieira E, Pereira FP, Rangel-Garcia Junior I, Okamoto R, Okamoto T, Magro-Filho O. Bone regeneration in surgically created defects filled with autogenous bone: an epifluorescence: an epifluorescence microscopy analysis in rats. *J Appl Oral Sci*. 2010; 18(4): 346-530.

- 54.** Hakanson DO, Penny R, Bergstrom WH. Calcemic Responses to Photic and Pharmacologic Manipulation of Serum Melatonin. *Pediatric Research*. 1987; 22(4), 414–416.

- 55.** 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. *Pineal Res*. 1992; 12(2): 79–83.

- 56.** Halleen JM, Raisanen S, Salo JJ et al. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate- resistant acid phosphatase. *Biol Chem*. 1999; 274(33): 22907–22910.

- 57.**Heersche JNM. Mesenchymal stem cells and their involvement in bone remodeling, repair, and regeneration. En: Zarb G, Leckholm U, Albrektsson T, Tenenbaum H, editores. Aging, Osteoporosis, and Dental Implants. Carol Stream. Illinois: Quintessence Publishing Co.; 2002; 11(1): 17-23.
- 58.**Heijnen, C. G., Haenen, G. R., Oostveen, R. M., Stalpers, E. M., Bast,A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. Free Radic Res. 2002; 36(5): 575-81.
- 59.**Hevia D, Sainz RM, Blanco D et al. Melatonin uptake in prostate cancer cells: intracellular transport versus simple passive diffusion. Pineal Res. 2008; 45:247- 257.
- 60.**Hirose T, Smith RJ, Jetten AM. ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun. 1994; 205 (3): 1976–1983.
- 61.**Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F, Benítez-King G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. Pineal Res. 1994; 17(2): 55–62.
- 62.**Imbesi M, Arslan AD, Yildiz S. Sharma R, Gavin D, Tun N, Manev H, Uz T.The melatonin receptor MT1 is required for the differential regulatory actions of melatonin on neuronal clock gene expression in striatal neurons in vitro. Pineal Res. 2009; 46 (1): 87–94.
- 63.**Infante-Cossio P, Gutiérrez-Pérez JL, Torres-Lagares D, García-Perla García A, González-Padilla JD. Relleno de cavidades óseas en cirugía maxilofacial con materiales autólogos. Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac. 2007; 29(1): 7-19.

64. Ito K, Minegishi T, Takayama T, Tamura T, Yamada Y, Sato S. Effects of ipriflavone on augmented bone using a guided bone regeneration procedure. *Clinical Oral Implants Research* 2007; 18(1): 60–68.
65. Jeon H, Kang H, Jung H, Kang Y, Lim C, Kim Y, Park E.: Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *J Ethnopharmacol.* 2008.4; 115 (1): 82-8
66. Jeong YJ, Choi YJ, Kwon HM, Kang SW, Park HS, Lee M, Kang YH. Differential inhibition of oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells treated with different flavonoids. *Br J Nutr.* 2005; 93(5): 581-91.
67. Johannot, L., Somerset, S. M.: Age-related variations in flavonoid intake and sources in the Australian population. *Public Health Nutr.* 2006; 9(08): 1045-54.
68. Kim SH, Shin JW, Park SA. Chemical, structural properties and osteoconductive effectiveness of bone block derived from porcine cancellous bone. *Biomed Mater Res. Appl Biomater.* 2004; 68(2): 69-74.
69. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB y Bernard GW. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. *Journal of periodontology.* 1996; 67(11): 1170-1175.
70. Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A.: Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76(3): 560.

- 71.** Knight DK, Shapka SN y Amsden BG. Structure, depolymerization, and cytocompatibility evaluation of glycol chitosan. *J B M R. Part A.* 2007; 83(3): 787-798.
- 72.** Kojima, K., Okamoto, Y., Kojima, K., Miyatake, K., Fujise, H., Shigemasa, Y., & Minami, S. Effects of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing *J V M S.* 2004; 66(12), 1595-1598.
- 73.** Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KHW. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J B M R,* 2002; 17(7): 1219–1229.
- 74.** Kung S, Devlin H, Fu E, Ho KY, Liang SY, Hsieh YD. The osteoinductive effect of chitosan-collagen composites around pure titanium implants surfaces in rats. *J P R.* 2011; 46(1): 126–133.
- 75.** La VD, Tanabe S, Grenier D. Naringenin inhibits human osteoclastogenesis and osteoclastic bone resorption. *J P R.* 2009; 44(2): 193– 198.
- 76.** Lacey DL, Timms E, Tan H.L., Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998; 93(2):165-76.
- 77.** Lafita J, Pineda J, Fuentes C, Martínez JP. Osteoporosis secundarias. *A S S N S.* 2003; 26(3): 53-62.

- 78.**Li BB, Yu SF, Meng XM. The beneficial effect of genistein on mandible bone metabolism in ovariectomized rats. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2003; 38(5): 336-8.
- 79.**Macías M, Escames G, León J. Calreticulin–melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem.* 2003; 270(5): 832–840.
- 80.**Maestre-Ferrín L, Boronat-López A, Peñarrocha-Diago M, Peñarrocha- Diago M. Augmentation procedures for deficient edentulous ridges, using onlay autologous grafts: An update . *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009; 14(8): 402-407.
- 81.**Mak P, Leung YK, Tang WY, Harwood C, Ho SM. Apigenin suppresses cancer cell growth through ERbeta. *Neoplasia.* 2006; 8(11): 896-904.
- 82.**Maki K, Nishida I, Kimura M. The effect of oral ipriflavone on the rat mandible during growth. *E J Orto.* 2005; 27(1): 27- 31.
- 83.**Maldonado MD, Murillo-Cabezas F, Terron MP et al. The potential of melatonin in reducing morbidity–mortality after craniocerebral trauma. *Pineal Res.* 2007; 42(1): 1–11.
- 84.**Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5): 727-47.
- 85.**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.

- 86.** Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichelli F, Crovace A, Cancedda R. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofacial. Res.* 2005;(4) 8: 277–284.
- 87.** Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, Quarto R. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterial.* 2006; (17) 27: 3230–3237.
- 88.** Mattioli-Belmonte M, Gigante A, Muzzarelli RA, Politano R, De Benedittis A, Specchia N, Buffa A, Biagini G, Greco F. N, N-dicarboxymethyl chitosan as delivery agent for bone morphogenetic protein in the repair of articular cartilage. *Med Biol Eng Comput.* 1999; 37(1): 130-134.
- 89.** Mikán JF, Oliveros D. Osteoclastogénesis y enfermedades óseas. Grupo de Biotecnología en Salud, Facultad de Medicina, Universidad Militar Nueva Granada. *Rev. Fac. Med.* 2007; 15(2): 261-270
- 90.** Minegishi T, Kawamoto K, Yamada Y, Oshikawa M, Kishida M, Sato S, Ito K. Effects of ipriflavone on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvaria. *J Oral Sci.* 2002; 44(1): 7-11.
- 91.** Myhrstad, MC., Myhrstad MC., Carlsen H., Dahl LI., Ebihara K., Glemmestad L., Haffner K., Moskaug J., Blomhoff R.: Bilberry extracts induce gene expression through the electrophile response element. *Nutr. Cancer.* 2006; 54(1): 94 – 101.
- 92.** Jolanta K, Mirko X. Weinhold, Jorg Thöming and Piotr Stepnowski. Biomedical activity of chitin/chitosan based materials- influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation. *Polymers* 2011; 3(4): 1875-1901.

- 93.** Moore WR, Graves SE y Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *J Surg* 2003; 71(6): 354–361.
- 94.** Muñoz-Torres M, De la Higuera M, Fernández D. Avances en el conocimiento de la biología del osteoclasto: el sistema osteoprotegerina-ligando del RANK. *Med Clin (Barc)*. 2004; 122(2): 75-77.
- 95.** Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *Bone Miner Res*. 1993; 8:505–510. DOI: 10.1002/jbmr.5650081315. *Journal of Bone and Mineral Research Supplement: Journal of Bone and Mineral Research*. 1993; 2(8): 505-510.
- 96.** Nakade O, Koyama H, Arijji H, Yajimi A, Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *Pineal Res*. 1999; 27(2): 106-110.
- 97.** Nakamura H, Ukai T, Yoshimura A, Kozuka Y, Yoshioka H, Yoshinaga Y, Abe, Y, Hara Y. Green tea catechin inhibits lipopolysaccharide-induced bone resorption in vivo. *J Perio Res*. 2010; 45(1): 23–30.
- 98.** Nannmark U, Sennerby L. The bone tissue responses to prehydrated and collagenated cortico-cancellous porcine bone grafts: A study in rabbit maxillary defects. *Clin Implant Dent Related Res*. 2008; 10(4): 264-270.
- 99.** Nasr H, Ichelmann-Reidy ML, Yukna R. Bone and bone substitutes. *Periodontology*. National Center for Biotechnology Information. *Med J Armed Forces India*. 2012 Jan; 68(1): 42–47.
- 100.** Oda T, Sawaki Y, Ueda M. Experimental alveolar ridge augmentation by distraction osteogenesis using a simple device that permits secondary implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15:95-102.

- 101.** Oktay E, Demiralp B, Senel S, Cevdet A, Eratalay K y Akincibay H. Effects of platelet-rich plasma and chitosan combination on bone regeneration in experimental rabbit cranial defects. *J Oral Implant.* 2010; 36(3): 175-184.

- 102.** Olate S, De Olivera G, Jaimes M, Barbosa J. Reparación ósea en procedimientos de reconstrucción y colocación de implantes. *Int. J. Morphol.* 2007, 25(3): 649-57.

- 103.** Oporto VG, Fuentes FR, Álvarez CH, Borie EE. Recuperación de la morfología y fisiología maxilomandibular: Biomateriales en regeneración ósea. *Int. J. Morphol.* 2008, 26(4): 853-859.

- 104.** Orsini G, Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Piattelli A. Histologic and ultrastructural analysis of regenerated bone in maxillary sinus augmentation using a porcine bone-derived biomaterial. *Periodontol.* 2006; 77(12): 1984-1990.

- 105.** Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Nowak M, Swietochowska E, Marek B, Gorski J, Kajdaniuk D, Wolkowska K. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats. *Endo Regul.* 2003; 37 (4): 211-224.

- 106.** Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol.* 2006; 85:335-53.

- 107.** Park JA, Ha SK, Kang TH, Oh MS, Cho MH, Lee SY, Park JH, Kim SY. Protective effect of apigenin on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Life Sci.* 2008; 20(82): 25-26; 1217-1223.

- 108.** Park Y, Kim J, Lee KH, Ku JY, Lee Y, Min SJ. Immobilization of bone morphogenetic protein 2 on a nanofibrous chitosan membrane for enhanced guided bone regeneration. *Bio Appl Biochem.* 2006; 43(1): 17-24.
- 109.** Pato J, Jiménez A, Monsalve L, Segura JJ, Velasco E. Regeneración ósea guiada con implante unitario con nanosuperficie y betafosfato tricálcico. *Avances en Periodoncia.* 2010;22(3):127-134.
- 110.** Piatelli M, Favero GA, Scarano A, et al. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long- term report of 20 cases in humans. *Int Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14 (3): 835- 840.
- 111.** Quevedo L. Sarzosa M. Olivos V. Distraccion Osteogenica delesqueleto facial. *ICOR.* 2015; 28: 4-15.
- 112.** 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. *Pineal Res.* 2006; 40:332–342.
- 113.** Ramírez-Fernández MP, Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, Maté-Sánchez del Val JE, Gómez-Moreno G, Guardia J. Experimental model of bone response to xenografts of bovine origin (Endobon): a radiological and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22(7): 727-34.
- 114.** Ravi Kumar MNV, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Sashiwa H y Domb AJ. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. National Institute of Pharmaceutical Education and Research. *Chemical Reviews.* 2004; 104(12): 6.017-6.084.

- 115.** Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Qi W. Melatonin as a pharmacological agent against damage to lipids and DNA. *West Pharscol Soc* 1998; 41: 229-36
- 116.** Riancho JA, Gutiérrez GE. Factores reguladores de la resorción ósea. *Rev Meta Óseo y Mineral*. 2003; 1(2): 51-66.
- 117.** Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog pol S*. 2006; 31(7): 603-632.
- 118.** Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *Biol Chem*. 1999; 274(31): 22041–22047.
- 119.** Royano P, Damián S. Efecto de la administración de melatonina y triptófano sobre los ritmos de actividad-reposo, función fagocítica y metabolismo oxidativo en *Streptopelia risoria*: modificaciones con la edad [Tesis]. Badajoz: Universidad de Extremadura. [Tesis]. 2013.
- 120.** Sánchez M, González RM, Marsán V y Macías AC. Asociación entre el estrés y las enfermedades infecciosas, autoinmunes, neoplásicas y cardiovasculares. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2006;22(3): 51-66.
- 121.** Sánchez A, Sibaja M, Vega Baudrit y Madrigal S. Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomédicas. *Revista iberoamericana de Polímeros*. 2007;8(4): 242-269.
- 122.** Shigeru K, Toru Y, Kawamoto M, Yuki N. Effects of N S A I D s on Differentiation and Function of Human and Murine Osteoclasts—Crucial Human Osteoclastology'. *Pharmaceutical*. 2010; 3(5): 1394-1410.

- 123.** Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P, Simmen BR, Gay RE, Gay S. Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 2523–2530.
- 124.** Shin SY, Park HN, Kim KH, Lee MH, Choi YS, Park YJ y Chung CP. Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration. *J perio.* 2005; 76(10): 1778-1784.
- 125.** Siddiqui JA, Swarnkar G, Sharan K, Chakravarti B, Sharma G, Rawat P, Kumar M, Khan FM, Pierroz D, Maurya R, Chattopadhyay N. 8,8"-Biapigeninyl stimulates osteoblast functions and inhibits osteoclast and adipocyte functions: Osteoprotective action of 8,8"-biapigeninyl in ovariectomized mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 29 (2): 256-267.
- 126.** Simko F, Paulis L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment. *Pineal Res.* 2007; 42(4): 319–322.
- 127.** Simon Z, Watson PA. Biomimetic dental implants—new ways to enhance osseointegration. *Can Dent Assoc.* 2002; 68(5): 286-288.
- 128.** Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* 1997. 18; 89(2): 309-319.
- 129.** Sukmanskii OI. Isoflavones and calcified tissues. *Usp Fiziol Nauk.* 2002; 33(2): 83-94.

- 130.** Suzuki N, Somei M, Seki A, Reiter RJ, Hattori A. Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. *Pineal Res.* 2008; 45(3): 229–234.
- 131.** Takechi M, Tatehara S, Satomura K, Fujisawa K, Nagayama M. Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. *Mater Sci Mater Med.* 2008; 19: 2949–2952.
- 132.** Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ, Endocr J. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine.* 1993; 1: 52–60.
- 133.** Tan DX, Manchester LC, Terron Mp. One molecule, many derives: a never ending interaction of melatonin with reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Pineal Res.* 2007; 42 (1): 28-42.
- 134.** Tan DX, Reiter RJ, Manchester CL, Yan M, El-Sawi M, Sainz RM. 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.
- 135.** 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.
- 136.** Tortolini P, Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos. Different alternatives of bone grafts. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral.* Madrid. 2012; 24(3): 133-138.

- 137.** Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem* 2007; 104: 466-479.
- 138.** Velez, MA, Henao, N. Preservación de Alveolo previo a la colocación de implantes. Revisión de literatura [Tesis]. Medellín: Universidad CES; 2009.
- 139.** Wei H, Tye L, Bresnick E, Birt DF. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Res* 1990; 50: 499–502.
- 140.** Witt-Enderby PA, Radio NM, Doctor JS, Davis VL. Therapeutic treatments potentially mediated by melatonin receptors: potential clinical uses in the prevention of osteoporosis, cancer and as an adjuvant therapy. *Pineal Res.* 2006; 41(4): 297–305.
- 141.** Yamamoto HA, Tang HW. Preventive effect of melatonin against cyanide-induced seizures and lipid peroxidation in mice. *Neurosci Lett* 1996; 207(2): 89-92.
- 142.** Yeo YJ, Jeon DW, Kim CS et al. Effects of chitosan nonwoven membrane on periodontal healing of surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. *Journal of Biomedical Material Research B: Applied Biomaterial.* 2005; 72(1): 86- 93.
- 143.** Zhang X, Wang G, Gurley EC, Zhou H. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. *PLoS One.* 2014; 9(9):e107072

Anexos



MELATONINA

Fórmula
PM
Nº CAS:

NºLote/Batch Nº:	0805054
NºAnálisis/Analysis Nº:	0824474
Próximo Control Analítico/Retest:	11/2010

INCI

Características Polvo blanco a beige.

Description: White to slightly beige powder.

ENSAYOS / TESTS	ESPECIFICACIONES / SPECIFICATIONS	RESULTADOS / RESULTS	METODO / METHOD
Identificación <i>Identification</i>	IR/HPLC	Conforme <i>Positive</i>	A0133457
Aspecto de la disolución <i>Appearance of solution</i>	Clara e incolora	Conforme <i>Conforms</i>	A0233457
Punto de fusión <i>Melting point</i>	116.0 - 119.0 °C	116.0 - 119.0 °C	ATN33457
Agua <i>Water content</i>	< 0.5 %	0.13 %	A0933457
Metales pesados <i>Heavy metals</i>	< 10 ppm	< 10 ppm	A1233457
Cenizas sulfúricas <i>Sulphated ash</i>	< 0.1 %	0.07 %	A1333457
Riqueza <i>Assay</i>	> 99.0 %	99.65 %	A1033457

OBSERVACIONES Cumple especificaciones.

REMARKS: Complies with specifications.

CONSERVACIÓN En envase bien cerrado
STORAGE: In a well-closed container

Anna Codina / Directora Técnica

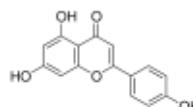
3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaldrich.comEmail USA: techserv@sial.comOutside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:
Apigenin - ≥97% (TLC), from parsley, powder

Product Number: A3145
CAS Number: 520-36-5
MDL: MFCD00006831
Formula: C₁₅H₁₀O₅
Formula Weight: 270.24 g/mol
Storage Temperature: -20 °C



TEST	Specification
Appearance (Color)	Yellow to Brown
Appearance (Form)	Powder
Solubility (Color)	Yellow to Brown
Solubility (Turbidity)	Clear
50 mg/mL, 1M KOH	
Proton NMR spectrum	Conforms to Structure
Purity (TLC)	≥ 97 %

Specification: PRD.1.ZQ5.10000043537

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

