

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial



**EFFECTO DE LA MELATONINA APLICADA LOCALMENTE
EN EL INTERIOR DE ALVEOLOS POST-EXTRACCIÓN DE
TERCEROS MOLARES RETENIDOS. ESTUDIO PILOTO**

**Carlos M. Cobo Vázquez
Prof. Dr. Juan López-Quiles Martínez**

Madrid, 3 de septiembre de 2013

EFFECTO DE LA MELATONINA APLICADA LOCALMENTE EN EL INTERIOR DE ALVEOS POST-EXTRACCIÓN DE TERCEROS MOLARES RETENIDOS. ESTUDIO PILOTO

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN 2012/2013

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

ÍNDICE DE LA DOCUMENTACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

	Página
1. Datos principales	3
2. Resumen	4
3. Estado actual	5
3.1. Inflamación y dolor post-extracción	5
3.2. Regeneración ósea	8
3.3. Melatonina	10
4. Justificación del estudio	17
5. Hipótesis	17
6. Objetivos	18
7. Material	18
7.1. Población y muestra	18
7.2. Recursos humanos	19
7.3. Material farmacológico	19
7.4. Material quirúrgico	20
7.5. Material para análisis de muestras	20
8. Método	21
8.1. Intervención y grupos de estudio	21
8.2. Obtención muestras	22
A. Interleuquina-6	22
B. Nitrotirosina	23
C. Evaluación radiográfica	24
8.3. Conformidad ética	25
8.4. Análisis	26
9. Resultados	27
10. Discusión	28
11. Conclusiones	33
12. Declaración autores	33
13. Bibliografía	34
14. Tablas y figuras	52
15. Anexos	56
15.1. Hoja de información a los participantes	56
15.2. Consentimientos informados para participantes	58

AGRADECIMIENTOS

A los directores de la presente investigación, el Dr. Juan López-Quiles Martínez y la Dra. Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil; al Dr. Ricardo Ortega Aranegui; a la Dra. Cristina Cobo Vázquez.

1. DATOS PRINCIPALES

- **Título:** EFECTO DE LA MELATONINA APLICADA LOCALMENTE EN EL INTERIOR DE ALVEOLOS POST-EXTRACCIÓN DE TERCEROS MOLARES RETENIDOS. ESTUDIO PILOTO

- **Investigador Principal:**

Carlos Manuel Cobo Vázquez

- **Directores de la Investigación:**

Juan López-Quiles Martínez

Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil

- **Datos de contacto:** 91 394 1964

608 61 28 38

- **Centro donde se realiza la investigación:**

Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial. Facultad de Odontología.
Universidad Complutense de Madrid

2. RESUMEN

La inflamación y el dolor son problemas frecuentes que sufre el paciente y a los que debe hacer frente el profesional tras la realización de tratamientos quirúrgicos. Por otra parte la ausencia de densidad ósea suficiente es la principal limitación a la hora de realizar tratamientos implantológicos exitosos reduciendo los tiempos de espera. La exodoncia quirúrgica de los terceros molares inferiores retenidos es un modelo característico en el que se produce inflamación y dolor tempranos, seguido de un proceso de curación ósea del lecho alveolar de varios meses de duración. Varios estudios han demostrado las propiedades antiinflamatorias y analgésicas tempranas de la melatonina, así como su efecto osteogénico y osteodiferenciador, reduciendo el periodo de curación. Por este motivo se realiza el presente ensayo clínico aleatorizado, a triple ciego, unicéntrico, empleando un diseño a boca-partida en el Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. Se estudiaron 10 pacientes con indicación de extracción quirúrgica de ambos terceros molares inferiores. Se aplicaron 3 mg de melatonina en uno de los alveolos post-extracción de forma aleatorizada por ordenador frente a un placebo. Para determinar las propiedades antiinflamatorias y analgésicas se analizaron muestras de suero sanguíneo mediante pruebas de enzimoanálisis independientes cuantificando las concentraciones de interleuquina-6 y nitrotirosina. La cuantificación de las propiedades osteogénicas se realizó mediante la medición de la densidad ósea radiográfica (número de unidades Hounsfield por área) en cortes panorámicos y seccionales obtenidos por escáner digital. Las muestras fueron codificadas (a=lado de melatonina previo; b=lado de control previo; A=lado de melatonina posterior; B=lado de control posterior), de modo que el paciente, el cirujano y el evaluador externo desconocieron el lado de aplicación de la melatonina. La concentración de interleuquina-6 tras la aplicación de melatonina fue de $361,32 \pm 235,22$ pg/ml, mientras que tras la aplicación del placebo fue de $262,58 \pm 233,92$ pg/ml. El análisis estadístico de las concentraciones de nitrotirosina no pudo realizarse ya que los valores de densidad óptica obtenidos se encontraban por debajo de la curva patrón de detectabilidad ($< 0,001$ nM). La densidad ósea en los cortes panorámicos a nivel del alveolo tras la aplicación de melatonina fue de $561,98 \pm 105,92$ UH, mientras que tras la aplicación del placebo fue de $598,82 \pm 209,03$ UH. En los cortes seccionales, la densidad ósea en la región alveolar fue de $377,42 \pm 125,67$ UH tras la aplicación de melatonina y de $347,56 \pm 97,02$ UH en el lado control. En el presente estudio no existen diferencias entre la aplicación de melatonina y placebo en cuanto a la concentración de IL-6. Tampoco se hallaron diferencias en cuanto a densidad ósea en los cortes panorámicos ni seccionales en función del tratamiento. Por tanto, no se encontraron diferencias entre la aplicación de melatonina y placebo en el alveolo post-extracción de los cordales inferiores retenidos.

3. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

3.1. Inflamación y dolor postextracción

La exodoncia de los terceros molares es la intervención más frecuente en cirugía oral¹ y es reconocida comúnmente por los pacientes como una experiencia desagradable por el curso del postoperatorio^{2,3,4}. Las reacciones tisulares que se producen en el postoperatorio dan lugar a la aparición de inflamación, dolor y trismo. La aparición de dolor y trismo postoperatorios está íntimamente relacionada con el proceso inflamatorio normal en todo acto quirúrgico, y suponen una causa frecuente de baja laboral^{5,6}.

La inflamación, el dolor y el trismo son consideradas las complicaciones inmediatas más frecuentes durante los 3 primeros días tras la intervención, afectando a todos los pacientes sometidos a este tipo de tratamientos, aunque con diferente severidad. Según Malkawi y cols en el 50,5% de los pacientes se producen de forma leve, y en el 26,6% alcanzan un grado moderado. A partir de los 7 días el 57,2% de los pacientes no presentan ninguna complicación, aunque un 14,1% aún presenta dolor leve y trismo⁷.

La severidad de estas complicaciones habituales puede variar en función de unos factores relacionados con el paciente, con el cordal y con el acto quirúrgico.

Se ha asociado una mayor frecuencia y severidad en pacientes de mayor edad. Los sujetos en torno a los 35 años registran mayor inflamación y trismo^{8,9,10,11}, y refieren mayor dolor^{8,9} debido, entre otros motivos, a la presencia de un hueso más duro y menos flexible. Varios estudios han demostrado la mayor frecuencia de complicaciones inmediatas en mujeres debido al menor tamaño de su mandíbula, un campo quirúrgico limitado, el estado hormonal y una mayor densidad ósea que hacen que la intervención quirúrgica sea más difícil y traumática^{7,12,13,14}. Además presentan un riesgo de alveolitis seca 5 veces mayor que los varones¹⁴. Otros factores que pueden modificar el grado del proceso inflamatorio son la altura, la constitución y un mayor índice de masa corporal, el grupo étnico, la higiene bucal, los hábitos tabáquicos y la ingesta de medicamentos como anticonceptivos orales.

En relación con el diente y la zona quirúrgica debe considerarse su situación y posición, la curvatura de sus raíces, la densidad ósea, la relación con estructuras anatómicas nobles y la existencia de patología asociada como infección, quistes o tumores. Los cordales retenidos en posición distoangular y horizontal se asocian con un mayor grado de inflamación, dolor y trismo, ya que condicionan una mayor dificultad de la técnica quirúrgica^{15,16,17}. También se registran más complicaciones en situaciones de pericoronaritis previa⁷.

Finalmente, influye en el proceso inflamatorio el tipo y la extensión de las incisiones, la técnica y el material de sutura, la experiencia del cirujano, la duración de la intervención, el número de molares exodonciados así como el consumo previo de fármacos¹¹. Se ha observado un aumento en la severidad de la inflamación y el dolor en actos quirúrgicos de mayor duración, por lo que se considera un indicador de la dificultad quirúrgica, aunque en el tiempo de la intervención influyen otras condiciones individuales y locales^{14,16}. El tiempo medio de intervención quirúrgica registrado varía

debido a las diferentes definiciones del tiempo del acto quirúrgico, la experiencia del cirujano y el requerimiento de técnicas adicionales. Algunos autores registran duraciones que varían desde los 11,03 minutos¹⁸, 21,92 minutos¹⁹, 22,63 minutos¹¹ y los 25,00 minutos²⁰ desde el inicio de la incisión hasta final de la sutura. También se asocia un mayor tiempo de intervención a un requerimiento de analgésicos superior durante las primeras 48 horas^{11,21,22}.

Para hacer frente a estas complicaciones se emplea frecuentemente la terapéutica farmacológica por vía oral, que requiere unas pautas laboriosas y obliga a considerar el estado de salud y la medicación del paciente, con unos resultados moderados en cuanto a la disminución del proceso inflamatorio y el tratamiento del dolor. Por otra parte, la pauta farmacológica más frecuente en este tipo de intervenciones supone una preocupación al Sistema Nacional de Salud por su elevado coste. Se han propuesto medidas como la dispensación en unidosis de fármacos como el paracetamol y el ibuprofeno desde el 1 de enero de 2011 (Real Decreto 8/2010), aunque esta medida apenas ha sido adoptada y no ha tenido el impacto esperado en cuanto al coste medio de estos tratamientos. Posteriormente, el Real Decreto-ley 16/2012, de 20 de abril, de medidas urgentes para garantizar la sostenibilidad del Sistema Nacional de Salud y mejorar la calidad y seguridad de sus prestaciones, contempló la modificación de la Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. El BOE-A-2012-10952 excluye de los medicamentos financiados por el Sistema Nacional de Sanidad algunos tan frecuentes como el ibuprofeno, el paracetamol o el diclofenaco (BOE núm 197, a 17 agosto 2012, pág 59181-59191).

Se ha propuesto que tras la realización de una herida quirúrgica tiene lugar un proceso inflamatorio, seguido de una liberación secuencial de mediadores procedentes de los vasos sanguíneos, de los mastocitos y de otros tipos celulares. En primer lugar aparece histamina y serotonina, seguida inmediatamente después de bradiquinina, y posteriormente de prostaglandinas y otros eicosanoides. El acúmulo de exudado rico en proteínas, como las prostaglandinas y otros mediadores inflamatorios, da lugar al proceso inflamatorio, que produce el espasmo de las fibras musculares produciendo trismo⁵. Existen estudios⁶ que han demostrado la relación de la bradiquinina intradérmica, intraarterial e intraperitoneal con la aparición de dolor. También han demostrado la función de las prostaglandinas (PGE₂) como potenciadoras del efecto de la bradiquinina. El gran aumento de interleuquinas (IL-1, IL-6, IL-8 e IL-17) procedentes de tipos celulares en la zona lesionada desencadena la producción de los primeros síntomas derivados de la inflamación²³, provocados en su mayoría por la IL-6^{24,25}. En humanos se ha podido constatar que la IL-6 se libera en gran cantidad en el sitio de la herida quirúrgica y está en relación con la severidad de la cirugía y, por lo tanto, con la magnitud de la lesión de los tejidos^{26,27}.

El dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable producida por un daño tisular y de grado variable según la severidad del mismo^{28,29}. La percepción del dolor tiene lugar mediante la estimulación de los terminales nerviosos periféricos llamados nociceptores. La conducción de la información sobre el daño mecánico, químico o térmico se realiza a través de fibras A δ y C hasta el sistema nervioso central. En el sistema nervioso central la información recibida es modulada en función de las experiencias previas, el estado de ánimo y salud del individuo y su

propio umbral del dolor. Esto hace que la percepción del dolor sea un hecho muy complejo y subjetivo^{6,29}. Sin embargo, el dolor postoperatorio también es proporcional a la magnitud de la cirugía, siendo mayor en las primeras horas tras la intervención y disminuyendo progresivamente después, al igual que los niveles de IL-6 séricos^{30,31,25}. La IL-6 desempeña un papel importante en el reclutamiento de leucocitos durante la fase de inflamación aguda, como se ha explicado anteriormente^{25,32}. En estudios *in vitro* se ha demostrado que la secreción de esta interleuquina es inducida por otros mediadores inflamatorios como la IL-1, el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la PGE₂, y que esta interleuquina a su vez provoca la liberación de quimiocinas como la IL-8^{25,33,34}, que también participa en el dolor inflamatorio^{25,35}, aunque aún no están claros estos mecanismos. De este modo la IL-6 posee efectos hiperalgésicos y de modulación del dolor^{25,36}. Además, la IL-6 actúa como un mensajero de información de la severidad del dolor e inflamación desde la periferia al sistema nervioso central^{25,37}. Otras interleuquinas, como la IL-17, desempeñan un papel en el proceso inflamatorio y en la reabsorción ósea, induciendo por otra parte la secreción de otras citoquinas inflamatorias. También la IL-6 estimula la reabsorción ósea y parece implicada en las etapas iniciales de la osteoclastogénesis³⁸.

El óxido nítrico (NO) es una molécula producida intracelularmente por la actividad catabólica de la enzima óxido nítrico-sintasa (NOS), que convierte la L-arginina en L-citrulina, relacionándose con las fases iniciales del dolor³⁹. También se ha demostrado su participación en la respuesta inflamatoria^{40,41}. Esta enzima está presente en tres isoformas: neural (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). La isoforma nNOS está presente principalmente en dolores neuropáticos y a nivel espinal, mientras que la iNOS está regulada por la inflamación tisular y se relaciona con el dolor en tejidos inflamados, siendo la más abundante en las fases iniciales del dolor y la inflamación⁴². Este aumento de iNOS en la zona lesionada es producido por citocinas y endotoxinas de diversos tipos de células, especialmente macrófagos, elevando la producción de NO. Sin embargo, las isoformas constitutivas (nNOS e eNOS) también pueden activarse en respuesta a estímulos inflamatorios y de este modo participar en la reacción inflamatoria⁴³.

El papel que ejerce el NO en el dolor no es simple, su presencia produce una vasodilatación inicial que incrementa el aporte vascular y la permeabilidad en la región dañada, aumentando la presencia de mediadores de la inflamación^{44,45,46,47,48,49}. En una fase más tardía, la señal inflamatoria puede magnificarse mediante la producción de moléculas como el factor nuclear kappa Beta (NF- κ β), y otras citoquinas como el TNF- α , el interferón- γ y varias interleuquinas (IL-1 e IL-8). Éstos promoverían la transcripción de la iNOS, generándose grandes cantidades de NO, mayor vasodilatación y edema. El NO puede sufrir procesos de transformación a productos altamente reactivos capaces de inducir daño celular^{48,50}. Además, la presencia de NO puede ser modulada también por el tipo de lecho vascular implicado en la reacción y la interacción con múltiples mediadores como estrógenos, ciclooxigenasa-2 (COX-2) y prostaglandinas^{51,52}.

Sin embargo, hoy en día existe controversia en cuanto al papel del NO en la respuesta inflamatoria y el dolor. Algunos autores encuentran elevadas concentraciones de NO en respuestas inflamatorias agudas y otros defienden su papel antiinflamatorio^{53, 54}. A

su vez, otros estudios sugieren que la liberación de NO desempeña un papel analgésico periférico en las fases iniciales⁴².

La determinación del NO es difícil debido a su corta vida media y a su rápida degradación en nitratos y nitritos. Por esta razón, la medida de la producción del radical NO se realiza mediante la determinación de productos finales del NO, nitratos y nitritos en suero. Esta determinación permite detectar cambios más tempranos y pequeños⁵⁵. La nitrotirosina (NT) es un producto estable del iNOS y se considera un indicador fiable del estrés oxidativo y nitrosativo producido por estos radicales libres.

Las máximas diferencias de los niveles de derivados del NO en muestras de suero obtenidas del lecho quirúrgico del tercer molar inferior se han observado a los 60 minutos de la intervención, existiendo diferencias significativas en el intervalo comprendido entre los 40 y los 100 minutos posteriores a la intervención⁴².

3.2. Regeneración ósea

La pérdida dental ha supuesto un problema funcional, estético y psicológico para los pacientes, que solicitaban un tratamiento no removible que reemplazara al diente. En 1965 Brånemark colocó el primer implante dental a un paciente, encontrando como principal limitación frente a otros tratamientos el tiempo de espera para su carga funcional⁵⁶. El primer estudio del tiempo de espera necesario para poder cargar el implante determinaba un periodo de espera de 3 a 6 meses⁵⁷. Desde entonces se ha intentado reducir al máximo el tiempo requerido para cargar los implantes y de este modo hacerlos funcionales, siendo en la actualidad una de las principales demandas por parte de los pacientes. En 1979 Lederman introdujo por primera vez la carga inmediata, aunque durante el primer año fracasaron el 81% de los implantes. Se ha determinado que el tiempo de espera adecuado para rehabilitar los implantes depende del momento en que se produzca la osteointegración⁵⁸.

Este periodo depende de múltiples factores relacionados con el implante, el hueso del paciente y el procedimiento quirúrgico. En 1985, Thomas y Cook estudiaron 12 parámetros que influían en la osteointegración, concluyendo que la calidad ósea era el más determinante⁵⁹. Se publicaron entonces varios estudios que relacionan la calidad ósea de la región receptora del implante con un mayor éxito de los mismos y la posibilidad de una carga más precoz^{60,61,62,63}. Schnitman y cols (1990) determinaron que la calidad ósea era un factor más importante que la longitud del implante para lograr la supervivencia del mismo, aunque fue Misch (2008) el primer autor en establecer diferentes tiempos de osteointegración en función de la calidad del hueso⁶⁴. Balshi y Wolfinger (1997) relacionaron la supervivencia del implante con el tipo de hueso, logrando la supervivencia de todos los implantes con carga prematura independientemente de la cantidad de hueso, la localización del implante o el tipo de antagonista. Zubery y cols (1999) también concluyen que la calidad del hueso influye de manera determinante en el éxito de los implantes con carga inmediata, siendo el hueso tipo II según la clasificación de Leckholm y Zarb (1995) el más adecuado⁵⁸.

La mayoría de los autores emplean el término calidad ósea como sinónimo de densidad ósea, aunque conviene considerar que en la calidad ósea influyen el metabolismo óseo, el recambio celular, la mineralización, la maduración, la matriz intercelular y la vascularización además de la densidad ósea⁶⁵.

Desde el momento que se realiza la extracción de un diente se produce un proceso de remodelación destinado a la curación del lecho óseo⁶⁶. Existen varios autores que estudian la cronología de este proceso en relación a la densidad ósea, aunque difieren en su metodología. La mayoría de autores emplean análisis histológicos y morfométricos o la microtomografía computerizada (microTC) en estudios *in vitro*. Sin embargo, los primeros requieren la obtención de muestras de forma invasiva, con los problemas éticos que plantea y la microTC supone un elevado coste económico y su análisis aporta información descriptiva^{61,62,63,64}. Otras pruebas de diagnóstico por imagen como la absorciometría de rayos-X de energía dual (DEXA) o la resonancia magnética no aportan información adicional a otras tecnologías más precisas⁶⁷. Por otra parte, las clasificaciones tradicionales (Lekholm y Zarb, 1995) basadas en radiografías convencionales no detectan cambios inferiores a un 40% de mineralización y no son tan precisas en situaciones en las que la calidad ósea es crítica, como en la carga precoz de implantes^{65,66}. Otras clasificaciones propuestas en función de la sensación táctil durante la preparación del lecho implantológico relacionadas con clasificaciones tradicionales, como la de Lekholm y Zarb⁶⁸ y la de Misch⁶⁹, solo permitían distinguir huesos extremadamente densos o blandos⁶⁵, y son considerados métodos subjetivos en la planificación preoperatoria⁷⁰.

La utilización de la tomografía computerizada (TC) propuesta por Schwartz et al en 1987 para determinar la calidad ósea preoperatoria fue extendida como un método de elevada precisión y poco invasivo^{71,72}. Varios autores emplean estas pruebas para determinar la densidad ósea mediante la clasificación por varios observadores en escalas categóricas ordinales. Destaca la dificultad de elegir un método para medir la formación ósea de forma objetiva y con una precisión adecuada⁷³.

La cuantificación de la densidad ósea en Unidades Hounsfield (UH) surgió como una medida objetiva y precisa⁷⁴. Varios autores calibraron la relación entre la densidad mineral ósea y las UH para poder emplear la TC como método diagnóstico previo^{75,76,77,78}. Las UH son una unidad de medida de densidad ósea basada en una escala lineal definida por dos valores, el mínimo de densidad (-1.000 UH) correspondiente a la densidad del aire, y el valor de 0 UH equivalente a la densidad del agua pura^{70,79,80}. Un método de utilización de las UH, conocido como Radiografía de Sustracción Cuantitativa se basa en la medición de un número de áreas consideradas Regiones de Interés (RI) dentro del alveolo, y su comparación con el mismo número de áreas medidas en el hueso adyacente, denominadas Regiones de Control (RC). Estas mediciones se realizan evitando zonas anatómicas que pueden alterar la densidad de la imagen como la fosa submandibular, la línea oblicua externa y el conducto del nervio dentario inferior^{66,81}. Este método tiene como ventajas la medición directa de la imagen sin ningún tipo de conversión que pudiera alterar su magnificación y densidad original, además de permitir el cálculo de la media a partir de un gran número de valores.

El desarrollo de la Tomografía Computerizada de Haz Cónico (CBCT) supone la aparición una prueba de alta resolución^{82,83,84,85}, con una dosis de radiación menor^{86,87} y menores costes que la TC convencional⁷⁵. A pesar de ello presenta una serie de limitaciones, como la radiación dispersa, su rango dinámico limitado de

detectores de área de rayos-X⁸⁸, la falta de fiabilidad para detectar finas trabéculas y los artefactos de endurecimiento del haz estrecho⁸⁹.

Se ha demostrado que los valores de densidad ósea en UH registrados en la TC se relacionan de forma estable con los valores obtenidos en CBCT^{88,90,91,92} a pesar de presentar diferencias según el equipo^{75,90}. De este modo, al no existir otro tipo de unidad estándar calibrada todavía para la CBCT se han adoptado las UH como una medida fiable⁷⁵. Se ha observado también la correlación entre la densidad ósea medida con CBCT y la registrada mediante el *gold standard*, el análisis histomorfométrico y con microTC⁹³, lo que demuestra la fiabilidad de las UH obtenidas mediante CBCT como una medida objetiva de densidad ósea.

Desde entonces sólo una pequeña cantidad de estudios han relacionado la estabilidad de los implantes con esta unidad de densidad ósea empleando TC^{94,95,96}, y en menor número con CBCT⁷⁵.

Estos estudios encontraron una relación directa entre la densidad ósea de la región esponjosa (en UH) medida en TC y el espesor de hueso cortical con la estabilidad primaria del implante tanto durante su inserción como al cargarlos⁹⁶. Esta relación lineal entre valores de amortiguación y valores de UH en la colocación de implantes, sugiere que el estudio preoperatorio del espesor cortical y las UH de hueso trabecular son métodos fiables para predecir la estabilidad del implante^{88,96}. También se ha encontrado relación entre la densidad ósea empleando CBCT y el coeficiente de estabilidad del implante en modelos de fémur in vitro^{75,97}.

3.3. Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) puede definirse de forma general como una hormona con acciones paracrinas, autocrinas y antioxidantes que ejerce varias acciones dependientes e independientes de sus receptores^{98,99}. Sus primeros efectos fueron descritos en 1917 por McCord y Allen, pero no fue hasta 1958 cuando fue aislada e identificada por Lerner, Case y Takahashi⁹⁹.

Esta molécula es sintetizada principalmente en la glándula pineal hasta los 30 años de edad, momento en el que disminuye su producción de forma notable. Su síntesis está regulada por el ritmo circadiano de ciclos de luz y oscuridad del entorno mediante el núcleo supraquiasmático a través del tramo retinohipotalámico. La producción de melatonina está determinada genéticamente y varía entre individuos, pudiendo alcanzar los 200 pg/ml durante la fase de oscuridad, siendo su nivel basal diurno de unos 10 pg/ml. Además es sintetizada en otras regiones del organismo como la retina, el tracto gastrointestinal, la piel, la médula ósea y los linfocitos¹⁰⁰.

Sin embargo la melatonina no se almacena en el organismo, sino que se difunde por la sangre y el fluido cerebroespinal. A partir de la circulación sanguínea difunde pasivamente a la saliva y a la cavidad oral^{99,101,102}. Su concentración en saliva alcanza el 15-33% de la concentración plasmática, ya que cerca del 70% de la melatonina plasmática está ligada a la albúmina impidiendo su difusión a la saliva. La melatonina puede obtenerse de las semillas y las hojas de un buen número de plantas a concentraciones superiores a las halladas en el plasma humano durante los ciclos nocturnos, resultando su obtención más simple.

Una de las principales características físico-químicas de la melatonina es su elevada capacidad de difusión ya que es una molécula muy lipofílica. Esta propiedad permite a la melatonina atravesar todas las barreras morfofisiológicas y penetrar en todas las células y espacios celulares^{100,103}. Además tiene un potencial redox muy elevado, de 0,74 V, lo que determina una actividad antioxidante muy superior a la de otros antioxidantes conocidos^{98,104,105}.

La melatonina actúa de forma endocrina como reguladora del tiempo biológico interno del individuo, por lo que ha sido empleada para el tratamiento de desórdenes del sueño como el insomnio o el *jet-lag*^{100,106}. También regula los ritmos estacionales, siendo la molécula responsable del ciclo de reproducción sexual estacional por sus propiedades fotoperiódicas¹⁰⁴. Se ha determinado una producción alterada de melatonina en mujeres en estados premenopáusicos y postmenopáusicos y con el uso de píldoras anticonceptivas¹⁰⁷.

Se ha demostrado la eficacia de la melatonina en el tratamiento de enfermedades producidas por la presencia de radicales libres^{108,109} como en la lesión por isquemia o reperfusión en varios órganos, la exposición a drogas tóxicas, metales pesados o fármacos¹¹⁰, la acción de toxinas bacterianas, la amiloidosis, la enfermedad de Alzheimer¹¹¹, el Parkinson^{112,113,114,115}, situaciones de sepsis en recién nacidos¹¹⁶ e incluso en el envejecimiento¹⁰⁰. También ha demostrado ser beneficiosa en el eritema de la piel debido a la exposición a la radiación ultravioleta¹¹⁷, y otras enfermedades en las que la presencia de radicales libres produce un daño celular^{118,119}. Existe acuerdo generalizado en que melatonina es una molécula no tóxica. Produce señales antiapoptóticas intensas incluso en situaciones de isquemia y tiene propiedades citoprotectoras que han sido descritas para el tratamiento de alteraciones neurodegenerativas. Además estimula el sistema inmune y tiene propiedades oncosupresoras que aún hoy en día suponen un extenso campo de investigación¹⁰⁰.

La melatonina ya ha sido empleada con éxito después de intervenciones radicales de cirugía oral debido a su acción antioxidante y los efectos estimulantes y protectores de las enzimas intracelulares implicadas en el proceso de curación^{99,120}. También se ha demostrado que regula funciones no relacionadas con el sistema endocrino y desempeña un papel importante en la modulación del dolor. Se han propuesto varios mecanismos por los que ejerce esta función, relacionados con los receptores de membrana, los receptores del núcleo, y mediante la captación de radicales libres de forma independiente de receptores¹⁰⁴.

Sin embargo, actualmente existe controversia en cuanto a los mecanismos de acción específicos de la melatonina y la relación de los receptores con sus funciones.

Los mecanismos por los que la melatonina ejerce un papel antioxidante son múltiples y complejos. Por una parte neutraliza directamente un gran número de reactivos a base de oxígeno y nitrógeno tóxicos^{121,122,123}. También actúa de manera indirecta, estimulando la síntesis de otro importante antioxidante intracelular, el glutatión (GSH)^{104,124,125}, y promueve su reciclaje enzimático a nivel celular^{126,127}. Además, conserva la integridad funcional de otras enzimas antioxidantes. Finalmente reduce la generación de nuevos radicales libres en la mitocondria mediante la mejora

de la fosforilación oxidativa^{99,128}. Sin embargo, la protección antioxidante de la melatonina se basa principalmente en la acción mediante receptores¹⁰⁰.

La melatonina presenta afinidad por cuatro receptores, dos de ellos a nivel de la membrana celular y los otros dos en el núcleo de las células^{104,129}.

Los receptores de membrana MT1 y MT2 presentan diferente afinidad por la melatonina, siendo mayor por el primero^{104,130}. Los receptores MT1 y MT2 se localizan en los órganos y células periféricas. Estos receptores son los mediadores de las principales acciones de la melatonina^{131,132} como los efectos cronobiológicos en el SNC y el ritmo circadiano, y contribuyen a varias acciones inmunológicas y al control vasomotor¹³³. La activación de los receptores de melatonina MT1 y MT2 desempeña un papel importante en su efecto antiinflamatorio y antinociceptivo¹³⁴ en el dolor inflamatorio^{135,136} y neuropático¹³⁷. El MT1 parece mediar la vasoconstricción principalmente, mientras que el MT2 causa principalmente vasodilatación. Recientemente se ha descrito un tercer sitio de unión, inicialmente descrito como MT3, de estructura similar a la quinona reductasa¹³⁸. Las quinona reductasas participan en la protección contra el estrés oxidativo¹³⁹. Sin embargo, no todos los autores apoyan la idea de que los receptores MT3 y QR2 sean la misma molécula^{99,125}.

Los receptores nucleares de hormonas retinoides (RZR α y RZR β) presentan afinidad por la melatonina a concentraciones muy bajas, de rango nanomolar^{104,140}. Ambos receptores se encuentran en el SNC y en el sistema nervioso periférico, asociándose con el proceso de diferenciación celular y regulación de la respuesta inmune¹⁴¹. El receptor RZR α se encuentra implicado en las reacciones inflamatorias, regulando la exposición del mediador inflamatorio lipooxigenasa-5 (LOX-5) en los linfocitos B¹⁴². También la regulación de la producción de IL-2 e IL-6 por las células inmunitarias mononucleares parece ser mediada a través de este mecanismo^{123,143}. El receptor RZR β se encuentra exclusivamente en regiones nerviosas sensitivas como el asta dorsal de la médula espinal¹⁴⁴, pero no en regiones relacionadas con el control motor, por lo que parece tener relación con los efectos de la melatonina en la modulación del dolor. La melatonina también se une aunque con menor afinidad a la calmodulina^{100,145}.

Propiedades antiinflamatorias

El aumento de radicales oxidantes como las especies reactivas de oxígeno da lugar al estrés oxidativo que produce un daño celular mediante peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas o daño en el ADN, que juega un papel causal o adyuvante en casi todas las patologías humanas, incluyendo el cáncer y la neurodegeneración, y está implicada en el envejecimiento y patologías inflamatorias crónicas. Las especies reactivas de oxígeno participan en diferentes procesos celulares involucrados en respuestas fisiológicas (como promover la supervivencia celular, la proliferación y la diferenciación) y respuestas patológicas (como la muerte celular por apoptosis o necrosis) según su dosis¹⁴⁶.

Los fenómenos oxidativos juegan un papel clave en la señalización y la gestión de la fase inicial de la inflamación. La activación de los neutrófilos genera una reacción oxidativa que dirige la toxicidad hacia los microbios invasores¹⁴⁷; la generación de ROS en el tejido dañado produce un gradiente de concentración que dirige el

reclutamiento de leucocitos al sitio de la lesión tisular¹⁴⁸. Por otra parte, la maduración ROS induce la producción de monocitos^{149,150} y promueve la adhesión a las células endoteliales que permiten la diapédesis. La generación de especies reactivas de oxígeno también activa las vías de señalización intracelulares inflamatorias que conducen a la liberación de los mediadores inflamatorios, incluyendo citoquinas^{151,152}. Una característica temprana de la respuesta inflamatoria es la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 por los macrófagos activados. Estas citoquinas son consideradas biomarcadores séricos de la inflamación¹⁵³. Por lo tanto, los productos de la oxidación pueden promover y dirigir la respuesta inflamatoria en diferentes tejidos y pueden estimular las vías de señalización desencadenadas por condiciones inflamatorias¹⁵⁴.

Una estrategia terapéutica antiinflamatoria eficiente requiere antioxidantes como la melatonina para detener este proceso y para reducir la carga de los mediadores de la inflamación en el sitio de la inflamación mediante la inhibición de iNOS y mecanismos directos¹⁵⁴.

Aunque la mayor parte de las investigaciones defiende la aplicación de la melatonina como antiinflamatorio en distintos modelos de estudio, algunos autores proponen que la melatonina exacerba la respuesta inflamatoria en determinados estados de los sujetos expuestos.

Varios estudios han confirmado la actividad antiinflamatoria producida por la melatonina en situaciones de inflamación aguda y respuesta inmune exacerbada^{155,156,157}. La melatonina parece reducir la infiltración de neutrófilos y los niveles de mediadores de la inflamación^{158,159,160}, neutralizando la producción exacerbada de mediadores inflamatorios, principalmente citoquinas^{104,123,153,161}. La melatonina actúa estimulada por lipopolisacáridos mediante un mecanismo de atenuación de la activación de NF- κ B^{104,162,163,164} en linfocitos y macrófagos^{165,166}. De este modo inhibe la producción de prostaglandinas, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10^{167,168,169}.

Algunos estudios en cirugía oral apoyan la utilidad de la melatonina como antiinflamatorio y protector frente a infecciones. Aunque su acción estaría amplificada cuando los radicales libres de NO consecuencia del daño tisular ya están presentes en la zona lesionada¹²⁴. Además, la aplicación de 2 mg en el alveolo postextracción favorece la curación tisular por las propiedades de esta molécula^{154,170}.

Por el contrario, otros estudios han demostrado que la administración exógena de melatonina por encima de los niveles basales del organismo estimula el sistema inmune^{110,167} aumentando la proliferación de linfocitos T¹⁷¹, células NK^{172,173} y granulocitos, y la respuesta de anticuerpos^{107,174}. La activación de los linfocitos T aumenta la liberación de citoquinas inflamatorias como el interferón- γ , TNF- α , IL-1, IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-12^{175,176,177,178,179,180,181}. Además se ha propuesto que induce la producción de NO¹⁸².

Esta estimulación del sistema inmune e inflamatorio dependiente de la concentración de melatonina^{183,184} sería responsable de la respuesta inflamatoria¹⁵⁴ y la defensa del organismo frente a infecciones bacterianas y virales^{182,185}.

El resultado de estos estudios muestra que, en general, la melatonina podría actuar estimulando el sistema inmune en condiciones basales o estados de inmunosupresión, para una respuesta inmune temprana más eficaz. Sin embargo, en presencia de una respuesta inmune o inflamatoria exacerbada, la melatonina podría ejercer una regulación negativa actuando como antiinflamatorio. Por lo tanto, la melatonina podría considerarse una molécula pleiotrópica con efectos variados y complejos sobre el sistema inmune e inflamatorio.

Estas acciones inmunomoduladoras y antiinflamatorias de la melatonina se han estudiado con éxito en varios modelos experimentales existiendo acuerdo general en que la melatonina puede ser aplicada con efectos secundarios insignificantes¹⁵³.

Propiedades antinociceptivas

Estudios recientes sugieren que los radicales libres y especies reactivas están implicados significativamente en una variedad de condiciones de dolor, incluyendo el dolor neuropático e inflamatorio. Existe evidencia de que la producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno se acumulan en el lugar de la inflamación y contribuyen al daño tisular^{123,156,161,186}. Dado que el radical hidroxilo es el radical de oxígeno más nocivo conocido, la inducción de la glutatión peroxidasa podría ser un importante mecanismo mediante el cual la melatonina ejerce sus potentes efectos neuroprotectores.

Se han publicado diversos estudios acerca de los efectos de la melatonina sobre el dolor, relacionando niveles más altos en plasma de esta molécula con una menor percepción del dolor durante las fases de mayor síntesis^{123,187,188}. Varios estudios han empleado diferentes modelos de dolor agudo demostrado que la administración sistémica de melatonina tiene efectos antinociceptivos potentes y de larga duración^{187,189,190,191,192,193}. Por otra parte actúa inhibiendo el dolor neurogénico de forma parcial pero significativa¹⁹⁴.

Varios estudios han observado que los efectos antinociceptivos de la melatonina son reversibles por antagonistas de los opiáceos^{187,195,196,197,198} y aumentan el efecto de otros fármacos antinociceptivos y analgésicos^{199,200,201,202}. Sus efectos se producen independiente de si su utilización es previa al estímulo nocivo²⁰³ o posterior¹⁶⁴ y de la vía de administración^{189,204,205,206}. Además, estos efectos analgésicos son proporcionalmente dependientes de la dosis administrada¹⁹⁷. El máximo efecto antinociceptivo de la melatonina se ha observado a los 60 minutos de su administración a dosis elevadas (60 mg/Kg y 120 mg/kg) de forma sistémica, aunque estos efectos fueron apreciables desde los 30 minutos de su inyección hasta los 120 minutos posteriores²⁰⁷.

Aunque los mecanismos exactos por los que la melatonina produce efectos analgésicos no se conocen, se ha demostrado la presencia de receptores de melatonina MT1 y MT2 a nivel del asta dorsal de la médula espinal y en varias regiones cerebrales^{208,209,210,211}. Otros estudios sugieren un mecanismo de actuación a través del sistema opioide²⁰⁷. En el dolor inflamatorio producido en heridas quirúrgicas, el mecanismo analgésico principal de la melatonina parece ser la inhibición de la producción de la isoformas iNOS, reduciendo la activación del NF-κB¹²⁴, la expresión

de COX-2 y prostaglandinas y el reclutamiento de células polimorfonucleares en el lugar del daño tisular^{156,198,210,212,213,214,215,216, 217,218,219}.

Existe evidencia de los efectos de disminución de la iNOS en modelos de inflamación y sepsis tratados con melatonina^{209,220,221}. La melatonina contrarresta el aumento de iNOS mitocondrial, la peroxidación lipídica y los cambios en el estado redox del glutation (GSH / GSSG)^{222,223,224}. Estos estudios demuestran el papel de la iNOS en el daño celular en condiciones de inflamación severa²²⁵. Aunque los efectos de la melatonina antioxidantes también parecen comprender la inhibición de la nNOS^{165,226,227,228,229,230}, hay poca información disponible sobre el papel de esta isoforma en la protección de las mitocondrias. Se sabe que la acción de la melatonina sobre la nNOS se produce en las células corticales del cerebelo y del cuerpo estriado^{230,231}.

Tomados en conjunto, los resultados en la literatura proporcionan una evidencia clara del potencial de la melatonina como un fármaco complementario de la terapia durante el dolor, especialmente cuando un componente inflamatorio está involucrado^{104,198}. Sin embargo algunos autores proponen la utilización de derivados con una vida media mayor²⁰⁹.

Propiedades osteogénicas

Varios estudios han documentado que la melatonina es un mediador importante en la formación de hueso y la estimulación del metabolismo óseo^{174,232,233}.

A concentraciones micromolares, la melatonina estimula la proliferación y la síntesis de fibras de colágeno de tipo I en osteoblastos humanos in vitro^{234,235}. Por otra parte, en cultivos de preosteoblastos promueve de manera dosis-dependiente el desarrollo de sialoproteína ósea y de otros marcadores óseos proteicos, incluyendo la fosfatasa alcalina, la osteopontina, y osteocalcina; y reduce su período de diferenciación en osteoblastos de 21 días a 12 días. Esta reacción parece estar mediada por los receptores de membrana²³⁶.

Los osteoclastos reabsorben la matriz extracelular por diversos mecanismos, incluyendo la producción de especies reactivas de oxígeno que producen daño oxidativo en las moléculas estructurales de la matriz, como el colágeno o el ácido hialurónico²³⁸. La melatonina, debido a sus propiedades antioxidantes y su capacidad para captar los radicales libres²³⁹, interfiere en la función del osteoclasto y de ese modo inhibe la reabsorción ósea de forma directa²⁴⁰. Otro mecanismo por el que actúa sobre los osteoclastos es la supresión de la reabsorción mediante la reducción del receptor RANKL. De esta manera se ha demostrado que la melatonina a dosis farmacológicas aumenta la masa ósea^{174,241}, mostrando un efecto osteogénico²⁴⁰.

Además, la melatonina actúa formando hueso nuevo y abundantes trabéculas óseas según varios estudios animales^{170,174,234,237,242}. Estudios aplicados a implantes osteointegrados han observado una diferenciación de osteoblastos más temprana provocada por la melatonina, lo que produjo un aumento en la proliferación de osteoblastos, acelerando la síntesis y mineralización de la matriz osteoide tras 2 semanas¹⁷⁴ y 4 semanas²³⁴, así como un aumento significativo de la anchura y longitud de hueso cortical^{237,242}. Este rápido incremento en la formación ósea indica que la

melatonina actúa durante la remodelación ósea a dos niveles simultáneamente^{237,242,243}. En análisis histológico, la aplicación local de 3 mg de melatonina ha demostrado aumentar la formación trabecular al estimular directamente los osteoblastos a partir del endostio^{235,244}.

Otra investigación determinó que tras la aplicación de 5 mg de melatonina se observaba un leve aumento de la densidad radiológica a los 15 días, sin fenómenos inflamatorios relevantes a nivel macroscópico. A los 45 días aprecia una completa curación ósea cortical en TC y una estructura ósea normal al estudio microscópico. A los 60 días no se encuentran diferencias con el hueso no tratado ni en pruebas de imagen ni microscópicas, comportándose como un agente biomimético, con propiedades antiinflamatorias y osteogénicas²⁴⁵.

La melatonina parece contribuir a la neoformación de hueso ya que estimula la diferenciación de preosteoblastos, que son transportados desde la médula ósea al lecho alveolar a través del sistema vascular. Por otra parte, estimula la expresión génica de ciertas proteínas de la matriz ósea y estimula la actividad de los osteoblastos^{234,246}.

Los resultados de los estudios previos proporcionan evidencia concluyente de que el tratamiento con melatonina por sí sola podría conducir a un aumento en volumen y densidad de hueso in vivo²⁴⁷.

Algunos estudios han demostrado que puede administrarse melatonina a altas dosis con muy baja toxicidad aguda y escasos efectos adversos¹⁹⁰. Además, se ha demostrado que no requiere consideraciones de seguridad en su aplicación a desórdenes del sueño^{106,248}. Por lo tanto, el valor clínico de la melatonina está demostrado. Sus efectos beneficiosos deben seguir siendo estudiados en ensayos clínicos en humanos ya que hay evidencia de su seguridad y eficacia en un gran número de estudios in vitro y animales¹⁰⁴.

Considerando los resultados beneficiosos de la melatonina obtenidos en los estudios previos, investigados mediante diferentes modelos de estudio y mediante de evaluación diversos, resulta recomendable la presente investigación de sus propiedades antiinflamatorias, antinociceptivas y osteogénicas en pacientes. Ésta fue aplicada de forma local en presentación farmacológica de gel, debido a su fácil manipulación y aplicación en el alveolo, además de favorecer su absorción. La evaluación de las propiedades antiinflamatorias y analgésicas se realizó mediante ensayos de inmunoanálisis, mientras que las propiedades osteogénicas se evaluaron mediante la densidad ósea cuantificada en CBCT.

La presente investigación aporta la cuantificación de las propiedades antiinflamatorias y analgésicas en un conocido modelo de inflamación y dolor en pacientes. Además, evalúa la formación ósea de la melatonina mediante una técnica de cuantificación podría ser aplicada a la cirugía bucal, especialmente en intervenciones en las que se prevea gran inflamación y dolor postoperatorio temprano y en la reducción del periodo de espera para la colocación de implantes.

4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La inflamación y el dolor son problemas frecuentes que sufre el paciente y a los que debe hacer frente el profesional tras la realización de tratamientos quirúrgicos. Por otra parte la ausencia de densidad ósea suficiente es la principal limitación a la hora de realizar tratamientos implantológicos exitosos reduciendo los tiempos de espera.

Existe evidencia científica suficiente acerca de la utilidad y seguridad de la melatonina como antiinflamatorio y analgésico en situaciones de dolor inflamatorio y como osteodiferenciador y osteogénico temprano.

Por estos motivos se plantea realizar este estudio clínico piloto aleatorizado de fase IV. La finalidad de este estudio es evaluar los efectos demostrados de la melatonina en el alveolo postextracción de pacientes que requieran la exodoncia de los terceros molares inferiores.

La difusión de los resultados de esta investigación permitiría ofrecer una alternativa terapéutica más eficaz, sencilla y económica con elevada tasa de éxito que logre una disminución de la inflamación y el dolor postoperatorio temprano y que permita reducir el tiempo necesario para que el tejido óseo alcance una densidad adecuada para la colocación de implantes. La aplicación única de melatonina local en la misma sesión que las extracciones permitiría la reducción de costes farmacéuticos así como el tiempo de recuperación del paciente. En el caso de sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas los pacientes beneficiarios serían aquellos sometidos a extracciones quirúrgicas, principalmente entre los 16 y los 35 años. Las propiedades osteogénicas beneficiarían a aquella población que requiera la colocación de implantes osteointegrados postextracción con un menor tiempo de espera.

5. HIPÓTESIS

La inflamación y el dolor son las principales complicaciones en la mayoría de las intervenciones quirúrgicas en cirugía bucal.

Existe una creciente demanda por parte de los pacientes de reducción del periodo de espera para la carga funcional de los implantes osteointegrados.

Varios estudios han demostrado que la melatonina tiene propiedades antiinflamatorias y analgésicas a corto plazo. Además, por su potencial osteogénico tempranas podría mejorar las condiciones locales del tejido óseo, en especial la densidad ósea, que es el factor más importante para una adecuada osteointegración.

Basados en lo anterior, formulamos la siguiente hipótesis principal:

La melatonina aplicada localmente en el alveolo postextracción produce diferencias favorables en el postoperatorio inmediato en cuanto a antiinflamación, analgesia y osteogénesis temprana local con respecto al proceso de curación natural del lecho quirúrgico.

6. OBJETIVOS

Determinar si existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de interleuquina-6 en función de aplicar melatonina local frente al control.

Valorar si existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de nitrotirosina después de aplicar melatonina local frente al control.

Contrastar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las densidades óseas después de la extracción del tercer molar en función de aplicar melatonina local o un placebo.

Valorar la aparición de complicaciones asociadas a la melatonina en el postoperatorio.

7. MATERIAL

7.1. POBLACIÓN Y MUESTRA

A. Población

Los sujetos que participaron en el estudio son pacientes seleccionados Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid entre marzo y mayo de 2013. Los casos son aquellos pacientes con indicación de extraer ambos cordales inferiores, en estado de salud (Categoría I y II de la American Society of Anesthesiologists [ASA]), de ambos sexos, de edades comprendidas entre 16 y 35 años.

Criterios de inclusión

- Pacientes de ambos sexos con indicación de extraer ambos cordales inferiores.
- Edades comprendidas entre 16 y 35 años.
- Estado de salud (Categoría I y II de la ASA).
- Sin antecedentes ni enfermedades metabólicas o sistémicas que afecten al hueso o al proceso de curación del área quirúrgica, como es el caso de la diabetes o la osteogénesis imperfecta.
- No padecer enfermedades autoinmunes.
- No presentar enfermedad periodontal ni patología local quística o tumoral en la región de los cordales inferiores.
- Cordales inferiores retenidos en una posición y situación similar en ambos lados para estandarizar la muestra.
- Cumplir con los criterios de inclusión y aceptar firmar el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Consumo de tabaco.
- Uso de medicamentos anticonceptivos u hormonales.
- Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia
- Desórdenes crónicos, y antecedentes de alergia o efectos adversos asociados a los medicamentos que se emplearon.
- Presencia de inflamación aguda o infección en el día de la intervención.
- Tiempo de intervención de cada exodoncia superior a 30 minutos.
- Pacientes que rechazaran participar en el estudio, que no desearan firmar el consentimiento informado y aquellos que no permitieran el seguimiento así como la recogida de muestras.

B. Muestra

Fueron incluidos y estudiados 10 individuos con indicación de extraer ambos cordales inferiores, en estado de salud (Categoría I y II de la ASA) que acudieron al Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

Cada individuo fue su propio control según el diseño a boca-partida para evitar sesgos.

7.2. RECURSOS HUMANOS

Para la ejecución del proyecto de Investigación se requirió el siguiente personal cualificado:

Un cirujano maxilofacial del Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid con experiencia en el diagnóstico y tratamiento de cordales inferiores retenidos.

Un licenciado bioquímico del Servicio de Análisis Clínicos de la Universidad Complutense de Madrid que sea capaz de procesar y analizar las muestras de sangre obtenidas según las técnicas de laboratorio indicadas para los parámetros bioquímicos establecidos.

Un licenciado radiólogo del Servicio de Radiodiagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid con experiencia en la obtención y procesamiento de imágenes mediante escáner digital.

Un Analista de Datos Especialista en Bioestadística para la aplicación de fórmulas estadísticas adecuadas a los datos obtenidos asegurando los objetivos del estudio.

7.3. MATERIAL FARMACOLÓGICO

Melatonina pura sin excipientes: 3 mg de melatonina / 2ml de gel hidroxietilcelulosa 2% (10 jeringas unidosis), *Farmacia La Botica de Argensola (Madrid, España)*.

2ml de gel de hidroxietilcelulosa 2% (10 jeringas unidosis), *La Botica de Argensola (Madrid, España)*.

Carpules de anestesia: articaína 4% con adrenalina 1:100.000.

7.4. MATERIAL QUIRÚRGICO

Jeringas metálicas de tipo carpule de anestesia y agujas desechables.

Sindesmótomos y bisturíes tipo Bard-Parker con hojas del nº 15.

Pieza de mano recta con irrigación de suero salino y fresas nº 8 de fisura de tungsteno, fresas quirúrgicas de Lindemann y fresas redondas de acero. Aspiradores quirúrgicos.

Fórceps de cordales inferiores y elevadores de tipo Winter de ambos lados y botadores rectos.

Separadores tipo Langenbeck, tijeras rectas y curvas de corte, pinzas de Adson, pinzas mosquito curvas y portaagujas de Mayo.

Aguja de sutura premontada atraumática e hilo de seda monofilamento 3/0 en aguja semicircular 3/8.

7.5. MATERIAL PARA EL ANÁLISIS DE MUESTRAS

Jeringas estériles Injekt® de polipropileno/ polietileno de 5ml con agujas (40 unidades).

Tubos BD Vacutainer® estériles de 13x75mm x 2 ml con un activador del coágulo pulverizado (sílice, polivinilpirrolidona PVP y L-720) (100/sp, 1000/cs) (REF: 368492).

Human IL-6 ELISA BLK 4-213 and BLK 4-231TEN Kit 79010055 (Laboratorios LETI, Barcelona, España).

Nytrotirosin ELISA Kit K7824 (Laboratorios LETI, Barcelona, España).
Placas de Costar de 96 pocillos.

Pipetas graduadas de 5 y 10 ml, y puntas.

Tubos Eppendorf.

Centrifugadora Zentrifugen.Universal 320 R.

Congelador Nuair -85°C Ultralow freezer.

Lector de placas ELISA Ivymen System 2100-C.

Escáner digital de haz cónico tipo i-CAT Next Generation® (Imaging Sciences International, Inc.Hatfield, Pennsylvania, EEUU) Cone Beam 3-D Dental modelo 17-19.

Programa i-CAT Vision® Imaging Sciences International versión 1.8.

Programa de ordenador SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 21.0, SPSS Inc., Chicago, Ill., USA).

8. MÉTODOS

8.1. INTERVENCIÓN Y GRUPOS DE ESTUDIO

Se comenzó realizando la historia clínica empleada en el Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología. Se procedió al consentimiento informado de los pacientes de la intervención quirúrgica así como de la aplicación de melatonina y de la obtención de muestras de sangre e imágenes digitales.

Se obtuvo un escáner digital previo el mismo día de la intervención quirúrgica. La exodoncia de ambos cordales se realizó bajo anestesia troncular convencional de los nervios dentario inferior, lingual y bucal. El procedimiento quirúrgico siguió en todos los casos la secuencia habitual. El acceso quirúrgico se realizó mediante una incisión festoneada lineal y el despegamiento de un colgajo mucoperióstico. La ostectomía fue realizada con una fresa redonda bajo irrigación. Se realizó la odontosección cuando fue necesario y tras la extracción del molar se trató el alveolo. La aplicación de la melatonina en al alveolo se realizó de forma aleatorizada por ordenador, asignando un código diferente a la melatonina y al placebo que desconocían el paciente, el cirujano y durante el análisis de los datos. A continuación se suturó con seda monofilamento 3/0 en aguja semicircular 3/8 premontada. El tiempo de operación fue cronometrado considerado desde el comienzo de la incisión hasta la finalización de la sutura.

En todos los pacientes se prescribió la misma terapia antibiótica, antiinflamatoria, analgésica y gastroprotectora, consistente en: Amoxicilina 750 mg 1 comprimido/8 horas (7 días), Diclofenaco 50 mg 1 comprimido/8 horas (3 días), Metamizol 575 mg 1 comprimido/8 horas (alternativo, en caso de dolor), Omeprazol 20 mg 1 comprimido/24 horas (7 días).

A los 7 días se revisó el proceso de curación y se procedió a la retirada de sutura. A los 60 días se realizó el segundo escáner digital.

A todos los pacientes se les facilitó un teléfono de contacto 24 horas para controlar el estado postoperatorio y su evolución. La valoración de la percepción de inflamación y dolor subjetiva por parte del paciente se realizó mediante la comunicación diaria con el paciente. Además se registró la aparición de eventos adversos durante un periodo temporal de dos meses tras la exodoncia.

Cálculo del tamaño muestral

Dado que no existen estudios pilotos sobre este tema con las mismas características técnicas de análisis y diseño, no fue posible emplear la fórmula estipulada para el cálculo del tamaño muestral. Las cifras se eligieron con el asesoramiento de un estadístico biomédico y según la disponibilidad de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión durante el periodo temporal establecido.

8.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La primera muestra de sangre se obtuvo por extracción directa inmediatamente a la exodoncia del molar de su lecho en ambos lados. La segunda muestra de sangre se obtuvo por extracción directa del lecho quirúrgico 60 minutos después de haber finalizado la intervención.

La sangre se extrajo mediante jeringa estéril Injekt® de polipropileno/ polietileno de 5ml con aguja. La muestra fue almacenada en tubos BD Vacutainer® estériles de 13x75mm x 2 ml, con un activador del coágulo pulverizado (sílice, polivinilpirrolidona PVP y L-720) (100/sp, 1000/cs) (REF: 368492) y se dejó reposar durante un intervalo de 60 a 90 minutos.

Las muestras fueron transportadas inmediatamente tras su obtención al Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. Las muestras de sangre no fueron tratadas con ningún aditivo, de manera que 60-90 minutos después de su obtención fue centrifugada la muestra a 3500 rpm durante 15 minutos (Zentrifugen.Universal 320 R) para obtener el suero. El suero fue alicuotado en tubos Eppendorf para luego almacenarlos en el congelador a -80 °C (Nuair -85°C Ultralow freezer), hasta el momento de las determinaciones bioquímicas.

Las muestras se colocaron a temperatura ambiente en el momento que se procedió a realizar las determinaciones siguiendo las instrucciones del kit empleado.

Se realizó la lectura de las determinaciones mediante el lector de ELISA (Ivymen System 2100-C).

A. Interleuquina-6

La IL-6 es una citoquina multifuncional que regula la respuesta inmune, las reacciones de la fase aguda y la hematopoyesis y puede desempeñar un papel central en los mecanismos de defensa del huésped. La IL-6 normalmente no está producida por células normales pero su expresión se produce fácilmente por una variedad de citoquinas, lipopolisacáridos o infecciones virales. La IL-6 es una citoquina pleotrófica producida por una variedad de células. Actúa en una amplia variedad de tejidos, ejerciendo inducción al crecimiento, inhibición del crecimiento y diferenciación según la naturaleza de las células dianas.

La obtención de valores elevados IL-6 en suero está relacionada con situaciones patológicas como infección bacteriana o viral, local en fase aguda, alteraciones del sistema inmune (anormalidad de células policlonales-B o enfermedades autoinmunes), enfermedades proliferativas (como psoriasis o glomerulonefritis proliferativa mesangial), enfermedades neoplásicas (mieloma múltiple, discrasias de células-B, linfoma de Lennert, enfermedad de Castleman, carcinoma de células renales y otros tumores). Sin embargo, su principal relación es con una respuesta inflamatoria en fase aguda, como en traumas tisulares, quemaduras, artritis inflamatoria o artritis traumática, siendo útil como factor de predicción del curso de curación del paciente.

Para la determinación de concentración de IL-6 se elaboró una curva de predictibilidad empleando el Búffer de Lavado según las indicaciones del fabricante (Reagents for Human IL-6 ELISA BLK 4-213 and BLK 4-231TEN). Se prepararon las diluciones estándar con el Búffer de Ensayo (100 microl) por duplicado en los micropocillos obteniendo una concentración de 200 pg/ml del estándar. Se pipeteó la muestra en siete micropocillos de 225 microl diluyendo progresivamente la concentración para obtener la curva patrón de concentración de IL-6. A continuación se aplicó el agente colorimétrico según las proporciones del fabricante.

El análisis de las muestras se realizó añadiendo 100 microl del Buffer de Ensayo (1X) a los micropocillos control y 50 microl a los micropocillos de muestra. Se preparó el Conjugado de Biotina y se añadieron 50 microl a todos los pocillos, dejándolos incubar durante 2 horas a 18-25 °C. Se preparó el HRP-Estreptavidina. Se vaciaron y lavaron los micropocillos cuatro veces con Buffer de Lavado. Se añadieron 100 microl de Solución de Sustrato TMB a todos los pocillos y se dejaron incubar durante 10 minutos a 18-25 °C. Finalmente se añadieron 100 microl de Solución de Detención a cada pocillo. Se realizó la lectura de las densidades ópticas obtenidas a una intensidad colorimétrica de 450 nm.

El rango de detectabilidad para este kit es de concentraciones de 100 pg/ml- 0 pg/ml, y de una densidad óptica de 1.848 nm- 0.086 nm a una longitud de onda de 450 nm.

Los resultados de las concentraciones séricas de interleuquina-6 se expresan en su media \pm desviación estándar en pg/ml.

B. Nitrotirosina (NT)

La nitrotirosina es una forma derivada de la reacción de la isoforma iNOS con superóxido, dando lugar a peroxinitrito. Éste reacciona con la tirosina produciendo esta forma nitrada. La acumulación de nitrotirosina está asociada a procesos inflamatorios (arterioesclerosis, infarto de miocardio, vasculopatía diabética, hipertensión o alteraciones cardíacas coronarias). Un número creciente de publicaciones han asociado el acúmulo de nitrotirosina con alteraciones neurológicas (Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, accidentes cerebrovasculares). Con el tratamiento de estas alteraciones los niveles de tirosinas nitradas han demostrado disminuir, por lo que la NT ha comenzado a ser considerada un marcador de estrés nitrosativo.

Durante el proceso inflamatorio se encuentran grandes cantidades de óxido nítrico liberado de la L-arginina. Esta reacción está catalizada por la enzima NO-sintasa. Otras causas de aumento de la producción de NO son la exposición a agentes químicos o metales pesados, fármacos, nicotina, o estrés físico y psicológico así como esfuerzo físico con consumo de oxígeno aumentado.

En altas concentraciones el NO que no se encuentra capturado por la superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD) reacciona con el anión superóxido para formar peroxinitrito. El peroxinitrito está implicado como una de las principales especies oxidantes en varias patologías y se conoce que es citotóxico, produciendo estrés nitrosativo.

El peroxinitrito es altamente reactivo y muestra gran afinidad a los aminoácidos aromáticos como al anillo fenólico de la tirosina. La nitración de la tirosina en general es un proceso natural dentro de la modificación proteica post-tranlacional.

La NT es un producto estable y se considera relacionado con la producción de peroxinitrito, y su acumulación en células y tejidos es un marcador del estrés oxidativo y el estrés nitrosativo respectivamente.

Para la determinación de NT se pipetaron 50 microl de suero en un vial reactivo de 1,5ml, se le añadieron 200 microl del búffer de ensayo (ASYBUF). La mezcla se realizó sin dilución de la muestra de suero, ya que se obtuvieron valores inferiores a los detectables.

El ensayo emplea una técnica de sándwich con dos anticuerpos policlonales enfrentados a las proteínas nitradas. Los estándares, los controles y las muestras diluidas para la determinación de nitrotirosina se añadieron en los pocillos de una placa de microensayo y se recubrieron con anticuerpo anti-nitrotirosina policlonal. Durante el primer paso de incubación, las proteínas nitradas son unidas por el anticuerpo primario inmovilizado. Entonces, un anticuerpo anti-nitrotirosina policlonal conjugado con peroxidasa se añade a cada pocillo de microensayo y se forma un "sándwich" de anticuerpo primario- proteína nitrada y peroxidasa conjugada. Se utilizó tetrametilbencidina (TMB) como sustrato de peroxidasa. Finalmente, se añadió una solución ácida de detención para terminar la reacción. El color varía de azul a amarillo. La intensidad de amarillo es directamente proporcional a la concentración de nitrotirosina. Se generó una curva de dosis-respuesta de las unidades de absorbancia óptica (densidad óptica, OD a 450 nm) frente a la concentración estándar utilizando los valores obtenidos del estándar.

Se calculó una curva de predictibilidad punto por punto según el algoritmo de 4-parámetros para la densidad óptica de la nitrotirosina.

Este análisis presenta como limitación que las muestras con concentraciones de nitrotirosina inferiores a los valores de la curva estándar (Rango de detectabilidad: 48nM-1522 nM) no pueden ser diluidos en búffer de ensayo y reevaluados ya que los valores siempre quedarán por debajo de la curva estándar.

Los resultados de las concentraciones séricas de nitrotirosina se expresan en su media \pm desviación estándar en nM.

C. Evaluación radiográfica

Para obtener las imágenes tridimensionales del área quirúrgica se empleó un escáner digital de haz cónico tipo i-CAT Next Generation® (Imaging Sciences International, Inc. Hatfield, Pennsylvania, EEUU) Cone Beam 3-D Dental modelo 17-19. El equipo empleado está dotado con un sensor de panel plano de silicio amorfo con centelleador de CsI (20x25cm), funcionando con un generador de alta frecuencia. Posee un campo de visión (Cephalometric) de 17cm (h) x 23cm (d) con un tamaño de los vóxeles de 0,4 mm, 0,3 mm, 0,25 mm, 0,2 mm y 0,125 mm. Este equipo emplea una forma de reconstrucción en cilindro con una radiación entre 4 y 42 veces menor que con un equipo de tomografía computerizada convencional.

El escáner mediante tecnología CBCT obtiene cortes de hasta 0,2 mm de elevado contraste, sin distorsión ni magnificación a escala 1:1. Las imágenes fueron obtenidas programando el equipo a 120 kV, 5 mA y con un tiempo de exposición de 8,9 segundos, con el paciente en posición sentada. Se realizaron cortes panorámicos y seccionales antes y después de las exodoncias.

Para el procesamiento y análisis de las imágenes se utilizó el programa i-CAT Vision® Imaging Sciences International versión 1.8, que permite obtener una imagen dinámica del escáner y comparar las densidades óseas mediante la cuantificación de las Unidades Hounsfield por área (UH).

En la imagen del corte panorámico obtenido previamente a las exodoncias se realizó la medición de 10 áreas del tercer molar inferior consideradas regiones de interés y de 10 áreas de hueso en la región distal al cordal, considerada región de control. Las mediciones se realizaron en ambos lados, evitando corticales y la superposición de estructuras anatómicas como el conducto dentario inferior, la línea oblicua externa y la fosa submandibular. Además, se seleccionaron 10 cortes seccionales de cada lado de la región del cordal inferior, en los que se midieron 5 áreas del molar exodonciado, y 5 áreas de la región ósea distal.

Se realizaron las mismas mediciones en la imagen panorámica y los cortes seccionales obtenidos en el escáner posterior a las exodoncias.

Se estableció un grosor de los cortes seccionales de 1,60 mm, y las áreas de medición empleadas fueron todas de 3,60 mm². Esta área fue elegida para registrar un número adecuado de zonas representativas evitando la superposición de las estructuras mencionadas.

Los resultados de la densidad ósea se expresan en UH (media \pm desviación estándar).

8.3. CONFORMIDAD ÉTICA

Para asegurar la conformidad ético-legal del proyecto se seguirán los requisitos exigidos por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos de la Comunidad de Madrid, de acuerdo a lo establecido en la Declaración de Helsinki (Asamblea Médica Mundial), y cumpliendo con los requisitos establecidos por la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética. La aplicación de melatonina local en el alveolo, así como la obtención de las muestras hematológicas y radiológicas fue autorizada de modo explícito por el paciente. Aprobado por el CEIC Hospital Clínico San Carlos en su reunión del día 06/06/2012, acta 6.1/12.

La melatonina ya se encuentra a la venta en España en dosis de 1,3; 1,8; 2,5 y 5 mg en presentación en cápsulas y líquida y sin receta para el tratamiento de desórdenes del sueño, habiendo sido ampliamente demostrada su eficacia así como su seguridad en pacientes. En este estudio la presentación farmacológica de la melatonina fue en forma de gel, debido a su fácil manipulación y aplicación en el alveolo, además de favorecer su absorción.

La información fue codificada asignando a cada paciente un número de caso de forma que los miembros del equipo de investigación no obtuvieran información del paciente.

La melatonina y el placebo fueron codificados mediante una letra, de modo que el paciente, el cirujano y el equipo de investigación no pudieran distinguir la melatonina de placebo.

La obtención de las muestras de sangre no supone ninguna molestia adicional, ya que las cantidades extraídas normalmente para los análisis médicos así como para las donaciones es el doble del total de sangre que obtendremos. Además, estas extracciones se realizaron bajo el efecto de la anestesia local necesaria para el tratamiento de la exodoncia.

La captación de imágenes mediante escáner digital se realizó con el sistema i-CAT. Este equipo permite obtener imágenes tridimensionales con una radiación entre 4 y 42 veces menor que con un equipo de tomografía computerizada convencional, aportando una seguridad diagnóstica en la prevención de complicaciones quirúrgicas.

8.4. ANÁLISIS

El procesamiento y obtención de resultados de las muestras de sangre fue realizado en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

La obtención y análisis de las imágenes digitales fue realizada en el Servicio de Radiodiagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

El procesamiento estadístico de los resultados obtenidos fue realizado por un Analista de Datos Especialista en Bioestadística.

Los datos fueron analizados usando el programa de ordenador SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 21.0, SPSS Inc., Chicago, Ill., USA).

Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov a dos colas para determinar el tipo de distribución de los datos resultantes del análisis de sangre. Al demostrar que puede aceptarse la normalidad de la muestra se aplicó una prueba T para muestras relacionadas. Se consideró un valor estadísticamente significativo de $p < 0,05$.

El análisis estadístico de la densidad ósea se realizó aplicando una prueba de Shapiro-Wilk al tener una muestra pequeña. Al demostrar que puede aceptarse la normalidad de la muestra se aplicó una prueba T para muestras relacionadas para las comparaciones. Se consideró un valor estadísticamente significativo de $p < 0,05$.

Variables

Las variables independientes estudiadas son las características en las que difieren los objetos de estudio, pudiendo concretar como tales el lado caso, tratado con melatonina, en comparación con el control, tratado con un placebo.

Las variables dependientes son aquellas cuyo comportamiento es explicado o pronosticado por una o más variables independientes, pudiendo considerar como variables independientes la concentración de interleuquina-6 y nitrotirosina determinada en las muestras de sangre, así como la densidad ósea determinada en las pruebas de diagnóstico por imagen.

9. RESULTADOS

Se estudiaron 10 pacientes, que incluyeron 9 mujeres y 1 varón, con una media de edad de $22,60 \pm 2,17$ años. Las muestras fueron codificadas de la siguiente manera: “a” lado de melatonina previo, “b” lado de control previo, “A” lado de melatonina posterior, “B” lado de control posterior. El tiempo de intervención quirúrgica no superó en ningún caso los 30 minutos, por lo que ningún paciente fue excluido de la muestra por este criterio (Tabla I).

Las muestras 5B y 10B no pudieron ser analizadas mediante la técnica de ELISA al obtenerse tras su centrifugación una muestra defectuosa.

El estudio descriptivo y de normalidad de las muestras de IL-6 determina el comportamiento normal de la muestra a pesar de un valor atípico en las muestras previas a la aplicación del placebo.

Las concentraciones medias de IL-6 antes de la aplicación del tratamiento fueron de $11,17 \pm 11,03$ pg/ml y $15,03 \pm 21,92$ pg/ml del lado de aplicación de melatonina y placebo respectivamente. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos, por lo que se acepta que las concentraciones de IL-6 previas son iguales en ambos lados (Tabla II).

La concentración de IL-6 tras la aplicación de melatonina fue de $361,32 \pm 235,22$ pg/ml, mientras que tras la aplicación del placebo fue de $262,58 \pm 233,92$ pg/ml. No existen diferencias entre la aplicación de melatonina y placebo en cuanto a la concentración de IL-6. Sin embargo sí existen diferencias significativas en cuanto a las concentraciones de IL-6 previas y posteriores a la aplicación de melatonina y de placebo (Figura 1)

El análisis estadístico de las concentraciones de NT no pudo realizarse ya que los valores de densidad óptica obtenidos en la mayoría de las muestras se encontraban por debajo de la curva patrón de detectabilidad. El límite inferior de detección está establecido en concentraciones $< 0,001$ nM, por lo que los valores de NT de las muestras son insignificantes (Figura 2).

En el estudio de la densidad ósea a los 60 días, un paciente tuvo que ser excluido de la muestra al presentar una reacción alérgica al Metamizol que no había comunicado en su historia clínica por desconocimiento. Además, recibió tratamiento quirúrgico bucal de la región intervenida por una complicación postoperatoria y no fue posible la realización del escáner mandibular en la fecha establecida. A pesar de ser excluido de la muestra del estudio radiográfico, se realizó el seguimiento del paciente y se describen los eventos adversos que existieron.

El estudio descriptivo y de normalidad de las muestras de UH en los cortes panorámicos y en los cortes seccionales determina el comportamiento normal de la muestra.

En los cortes panorámicos no existen diferencias significativas en la región ósea distal en los cortes panorámicos previamente ($a=609,39 \pm 173,28$ UH; $b=620,59 \pm 177,36$ UH) y tras la extracción ($A=631,40 \pm 91,08$ UH; y $B=684,66 \pm 115,50$ UH). Tampoco se encontraron diferencias de densidad en la región del cordal antes de la aplicación del

tratamiento (a=1135,20 ±169,78 UH; b=1244,01± 209,03 UH). La densidad ósea a nivel del alveolo tras la aplicación de melatonina fue de 561,98±105,92 UH, mientras que tras la aplicación del placebo fue de 598,82±209,03 UH. No existen diferencias entre ambos lados tras el tratamiento (Tabla III, Figura 3).

En los cortes seccionales la densidad media en la región del cordal antes de la aplicación del tratamiento (a=1634,38 ± 273,24 UH; b=1673,18 ± 180,23 UH) no obtuvo diferencias significativas. No se encontraron diferencias en la región ósea distal antes de la aplicación del tratamiento (a=358,36 ±143,29 UH; b=322,44 ± 124,62 UH), y posteriormente (A=466,56 ± 213,74 UH; B=434,47 ± 188,87 UH), ni entre lados. La densidad ósea en la región del cordal tras la aplicación del tratamiento (A=377,42 ±125,67 UH; B=347,56±97,02 UH) no presenta diferencias estadísticamente significativas. Por tanto, no existen diferencias entre la aplicación de melatonina y placebo en cuanto a densidad ósea en los cortes panorámicos ni seccionales. Sin embargo sí existen diferencias significativas en cuanto a la densidad ósea previa y posterior a las exodoncias (Figura 4).

10. DISCUSIÓN

En el presente estudio el tiempo de intervención quirúrgica es similar al de otros autores que registran el tiempo desde el comienzo de la incisión hasta el final de la sutura. En nuestro caso, además, el tiempo incluye la obtención de la muestra de sangre del alveolo inmediatamente tras la exodoncia del cordal y antes de aplicar el tratamiento. Sin embargo, la posición mesioangular de los cordales retenidos es la más frecuente⁷, y la que se asocia con tiempos de intervención de menor duración y un menor número de complicaciones¹¹.

La obtención de las muestras de sangre del alveolo en cantidad suficiente no es siempre sencilla debido las diferencias interindividuales en el sangrado y al menor trauma quirúrgico en la exodoncia de cordales mesioangulados en pacientes jóvenes. A pesar de lograr obtener una cantidad suficiente para su procesamiento y análisis en todas las muestras, hubo dos muestras posteriores a la aplicación del gel placebo cuyo plasma no pudo analizarse por tener una consistencia oleosa. Esto pudo deberse al escaso sangrado local, que mezclado con el gel, dio lugar a la obtención de una muestra imposible de procesar.

Algunos autores han concluido el significado de la IL-6 en producción de los primeros síntomas derivados de la inflamación^{23,24}. Se ha encontrado en gran cantidad en el sitio de la herida quirúrgica, en relación con la severidad de la cirugía y, por lo tanto, con la magnitud de la lesión de los tejidos^{26,27}. Además, actúa como un mensajero de información de la severidad del dolor e inflamación desde la periferia al sistema nervioso central^{25,37} y estimula la reabsorción ósea, actuando en las etapas iniciales de la osteoclastogénesis³⁸.

La concentración media de IL-6 antes de la aplicación del tratamiento fue de 11,17±11,03 pg/ml y 15,03±21,92 pg/ml. Por tanto, aceptamos que las concentraciones de IL-6 previas son iguales en ambos lados, correspondiendo con un estado preinflamatorio.

Varios estudios muestran que la melatonina, en situaciones de respuesta inmune o inflamatoria aguda como un trauma quirúrgico, actúa como antiinflamatorio neutralizando la producción de IL-6^{104,123,153,155,156,157,158,159,160,161, 165,166,167,168,169}. Mientras, otros autores proponen que estimula el sistema inmune en condiciones basales o estados de inmunosupresión, para una respuesta inmune temprana más eficaz^{110,175,176,177,178,179,180,181,182}.

La concentración de IL-6 hallada tras la aplicación de melatonina y placebo fue de 361,32±235,22 pg/ml y 262,58±233,92 pg/ml respectivamente, no encontrando diferencias significativas entre su aplicación o la del placebo. Por lo que en nuestro estudio no se puede afirmar que la melatonina influya en la concentración de IL-6, en relación con el proceso inflamatorio de forma temprana. Sí se encontró un aumento significativo de la concentración de IL-6, relacionado con el proceso inflamatorio habitual, ya que no existieron diferencias entre el fármaco y el placebo. Una posible explicación, según algunos autores, es que el mayor efecto de la melatonina tiene lugar cuando los mediadores inflamatorios ya se encuentran aumentados en la región dañada^{124,154,170}. Por esta razón podría ser que las concentraciones del IL-6 halladas a los 60 minutos de su aplicación aún no se hubieran visto afectadas por la presencia de melatonina. Otro factor relacionado con su efecto, según acuerdan varios autores, es la dosis aplicada^{183,197,239}. Sin embargo se han descrito efectos antiinflamatorios y analgésicos aplicando localmente dosis de 5 mg²⁴⁵, 2 mg^{154,170,174} e incluso dosis micromolares^{155,156,157}.

En nuestro estudio, la cuantificación de un producto estable del NO como es la nitrotirosina, resultó en la mayoría de los casos en valores inferiores a los detectables (<0,001 nM) tanto en las muestras obtenidas antes como en las posteriores a la aplicación de melatonina y placebo. Aunque no es posible establecer conclusiones, de estos hallazgos se deduce que los valores de productos de degradación oxidativa y nitrosativa inmediatamente después de las extracciones aún no son lo suficientemente elevados como para ser detectables, de acuerdo con otros estudios en extracción de cordales, donde no fueron detectables⁴². Varios estudios corroboran la aparición del pico máximo de NO y del dolor producido por el estrés oxidativo a los 60 minutos del trauma tisular^{42,198,199,207}, apreciando en este momento las máximas diferencias producidas por la administración de analgésicos. En modelo animal también se ha encontrado un efecto antinociceptivo máximo de la melatonina a los 60 minutos de su administración a dosis elevadas (60 mg/Kg y 120 mg/kg) de forma sistémica, aunque sus efectos son apreciables desde los 30 minutos hasta los 120 minutos posteriores²⁰⁷. Debido al mecanismo de acción de la melatonina, algunos autores proponen la administración de melatonina 30 minutos antes del estímulo nociceptivo, logrando bloquear parcialmente la acción de las isoformas iNOS así como otros mediadores del estrés oxidativo^{198,199}. Sin embargo, como ya hemos mencionado, se propone también que el máximo efecto de la melatonina sería apreciable en presencia de concentraciones aumentadas de mediadores inflamatorios y nociceptivos en la región dañada¹²⁴. Los valores obtenidos en nuestro estudio sugieren una presencia indetectable de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno a los 60 minutos de la intervención en ambos lados, por tanto la aplicación de melatonina local no tendría influencia en la presencia de NO a los 60 minutos.

En el estudio de la densidad ósea, un paciente tuvo que ser excluido de la muestra al presentar una reacción alérgica que no había comunicado en su historia clínica por desconocimiento. Además, recibió tratamiento quirúrgico bucal de la región intervenida por una complicación postoperatoria y no fue posible la realización del escáner mandibular en la fecha establecida. A pesar de ser excluido de la muestra del estudio radiográfico, se realizó el seguimiento del paciente y se describen los eventos adversos que existieron. La exclusión de este paciente supuso que la totalidad de los pacientes de la muestra fueran mujeres.

Los primeros estudios sobre el tiempo de curación alveolar postexodoncia consideraban un tiempo de 4-6 meses para el hueso mandibular⁶⁶. Posteriormente, se determinó que los cambios más significativos tenían lugar entre el tercer y el 6º mes²⁷³. Otro estudio observó que, a los 2 meses, la densidad ósea era menor que el valor medio de la densidad, indicando una insuficiente regeneración ósea⁶⁶. Sin embargo, otros estudios cuantitativos de la densidad ósea concluyen que la mayor pérdida ósea tiene lugar durante los 2 primeros meses^{88,90,91,92}. Se han descrito las propiedades favorables de 5 mg de melatonina local en el aumento de la densidad radiológica a los 15 días, logrando neoformación de la cortical en un 89,72% y del defecto óseo del 91,98%. A los 60 días no se diferencia del hueso no tratado, alcanzando un 98,35% de grosor cortical neoformado y un 99,03% de longitud del defecto cubierto²⁴⁵. Otros estudios también han descrito efectos osteogénicos empleando dosis de 5 mg^{234,237,242}, 3 mg²⁴⁴, y 1,2mg^{170,174} en su aplicación implantológica.

En el presente estudio se evalúa el efecto osteogénico de la melatonina y su utilidad en la aceleración de la regeneración ósea, logrando una densidad ósea adecuada para la colocación y carga de implantes, en el periodo que el hueso sufre mayor remodelación. Cabe señalar que un factor importante en la cantidad de rayos X que recibe la película radiográfica es la característica física de la sustancia que se esté radiografiando. Cualquier incremento en la densidad, el número atómico y el espesor de la sustancia, determinará un aumento en su absorción de rayos X y por tanto una disminución de su densidad radiológica. Esto significa que un aumento en la formación de hueso se reflejará como un aumento en la radioopacidad de la región radiografiada⁶⁶, ya que la melatonina es radiotransparente tanto en radiografía convencional como en escáner digital y estudios de tomografía computerizada²⁴⁵.

En el estudio de los cortes panorámicos y seccionales no se encontraron diferencias en la densidad ósea de la región del cordal entre ambos lados y tampoco de la región ósea distal antes de la aplicación del tratamiento, confirmando la igualdad previa de ambos lados. Comparando la densidad ósea de la región distal en los cortes panorámicos y seccionales no se encontraron diferencias significativas, como cabía esperar, al ser una región ósea que apenas fue manipulada durante las intervenciones quirúrgicas. Sin embargo sí existieron diferencias en la región del cordal antes de las exodoncias y a los 60 días tanto en los cortes panorámicos como en los seccionales, ya que la densidad previa adquiere valores superiores por la presencia de esmalte y dentina del cordal, con una mayor densidad radiográfica que el hueso.

Varios autores observan que la densidad ósea es menor en pacientes de menor edad y en mujeres^{70,79,80}. Teniendo en cuenta esta diferencia, los valores que obtuvimos en los cortes panorámicos en las regiones distales son comparables a los obtenidos por

otros autores, que oscilan entre $546,9 \pm 209,7 \text{UH}^{88}$ y $676,2 \pm 244,4 \text{UH}^{70}$, aunque en mujeres de la 5ª década de la vida.

La densidad ósea en la región alveolar en los cortes panorámicos tras la aplicación de melatonina fue de $561,98 \pm 105,92 \text{UH}$, mientras que tras la aplicación del placebo fue de $598,82 \pm 209,03 \text{UH}$. Según algunos autores, la densidad ósea en la región mandibular posterior adquiere valores de $628,2 \pm 209,2 \text{UH}^{88}$, 669UH^{79} y $715,8 \pm 190 \text{UH}^{70}$. Los resultados obtenidos en el presente estudio después de la aplicación de melatonina en la región distal ($631,40 \pm 91,08 \text{UH}$) son similares considerando la diferencia de edad de la muestra. Sin embargo, la densidad ósea tras la aplicación de melatonina en la región alveolar ($561,98 \pm 105,92 \text{UH}$) no alcanza los valores que indiquen una densidad ósea adecuada.

La medición de densidad en las regiones alveolares en los cortes seccionales fue de $377,42 \pm 125,67 \text{UH}$ tras la aplicación de la melatonina y de $347,56 \pm 97,02 \text{UH}$ con el placebo. Estos valores son muy inferiores a los obtenidos en los cortes de la misma región en otro estudio ($524,3 \pm 169,5 \text{UH}$) de pacientes con una edad media de $51,56 \pm 13,78$ años⁹³.

En el presente estudio no existen diferencias entre la aplicación de melatonina y placebo en cuanto a densidad ósea a los dos meses en los cortes panorámicos y seccionales, sin embargo la densidad ósea alcanzada en ambos alveolos es muy similar a la densidad de la región ósea distal del mismo lado. En base a estos resultados concluimos que no existen diferencias entre la aplicación de melatonina y placebo en cuanto a la densidad ósea. Por tanto, según este estudio, la melatonina no aporta un beneficio en la densidad ósea a los 60 días. A pesar de ello, se aprecia que la densidad ósea alveolar a los 2 meses es muy similar a la registrada en la zona ósea distal.

La información obtenida en cuanto a la percepción de la inflamación y el dolor por el paciente es empleada para analizar de forma descriptiva factores subjetivos relacionados con la aplicación de melatonina. Durante las primeras 4-10 horas, 5 pacientes comunicaron presentar mayor inflamación en el lado en el que se aplicó melatonina en relación con el lado opuesto. Los otros 5 pacientes refirieron mayor inflamación en el lado en el que se había aplicado el placebo, aunque tan solo 2 de ellos lo apreciaron durante las primeras 4-10 horas. Los otros 3 pacientes apreciaron las diferencias a partir de las 48 horas. La percepción de la inflamación no siempre estuvo en relación con el dolor. En 3 pacientes se registró un dolor mayor, de severidad variable, en el lado tratado con melatonina en las primeras 4 horas, mientras que 3 pacientes describieron esta percepción aumentada en el lado de control (2 pacientes a las 10 horas y uno a las 48 horas). La toma de analgésicos fue finalizada debido a la ausencia de dolor por 6 pacientes durante las primeras 48 horas, siendo de 1 comprimido el caso que menor analgesia requirió.

En el transcurso del postoperatorio se registraron las complicaciones y se adoptó la actitud terapéutica habitual en cada caso para lograr su resolución de forma eficaz. A partir del tercer día dos pacientes refirieron mareos, que fueron disminuyendo progresivamente hasta desaparecer en un máximo de cuatro días desde su aparición. En este periodo tuvo lugar una disestesia del hemilabio inferior del lado tratado con

melatonina. Se pautó Hidroxil-B12-B6-B1®, logrando su resolución a los 3 días, por lo que se excluye una etiología infecciosa o traumática, considerando la causa inflamatoria como la más probable. También un paciente registró fiebre de 39 °C, aunque su origen bucal fue descartado. Otro paciente presentó una alveolitis en el lado de aplicación de melatonina, requiriendo un cambio de pauta antibiótica a Amoxicilina 875 mg+125 mg ácido clavulánico: 1 comprimido/8horas (8 días). A los 36 días presentó una inflamación severa creciente de causa no infecciosa, debido al un trauma del periostio que se produjo la paciente, que fue resuelta en 10 días.

Finalmente, un paciente mostró una reacción alérgica, no referida en la historia clínica, con edema palpebral debida al Metamizol 575 mg a las 10 horas de la intervención. Se procedió a la sustitución de la terapia analgésica y el paciente acudió al servicio de urgencias. Este mismo paciente, a los 35 días, acudió con inflamación creciente, trismo y dolor nocturno en el lado donde se aplicó melatonina, al servicio de urgencias de Gesundheit Nord, Ambulanz Bremen GmbH (Alemania), donde fue diagnosticado de “absceso paramandibular de origen 38” y se le realizó un drenaje quirúrgico y pauta antibiótica (Ciprofloxacino 500 mg), antiinflamatoria (Ibuprofeno 600 mg), analgésica (Paracetamol 650 mg) y antiséptica (Clorhexidina 0,2%). Debido a esta intervención quirúrgica de la zona de tratamiento el paciente fue excluido del estudio de la densidad ósea.

A pesar de las complicaciones registradas, la distribución de las mismas no permite determinar su relación con la aplicación de melatonina. Por otra parte, en cuanto a las complicaciones tardías, en un caso se demostró una etiología traumática producida por el propio paciente, y al no requerir tratamiento quirúrgico pudo ser mantenido en el estudio. Mientras tanto, en el paciente excluido del estudio radiológico, cabe la posibilidad de que no siguiera las pautas postextracción de forma adecuada, ya que refirió que del tratamiento pautado en urgencias solo siguió el referente al analgésico.

La presente investigación presenta una serie de limitaciones. En primer lugar, al tratarse de un estudio piloto, la muestra de pacientes no es suficiente para establecer conclusiones con una evidencia suficiente. Además, el número de medidas se vio reducido debido a la exclusión de muestras por diversos motivos. Por otra parte, según proponen algunos autores, los resultados obtenidos mediante el equipo de diagnóstico por imagen solo son comparables con aquellos estudios que utilicen el mismo equipo^{90,253}. Las regiones medidas son determinadas de forma manual por el operador, por lo que podrían existir errores en la realización de la medición⁶⁶.

Debido a la discrepancia de los resultados obtenidos con respecto a los estudios previos parece recomendable la realización de estudios posteriores en modelos de exodoncia de cordales que evalúen marcadores de inflamación y dolor, así como parámetros de densidad ósea, con un mayor seguimiento en el tiempo para ampliar la evidencia científica existente y con una mayor dosis.

Según nuestro conocimiento, esta es la primera investigación sobre la aplicación local de la melatonina en pacientes que cuantifica sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas empleando métodos objetivos directos. Además, proponemos la utilización de la cuantificación de las UH determinadas en CBCT como

un método sencillo, objetivo y preciso, con menor radiación para el paciente, para la evaluación de la densidad ósea.

11. CONCLUSIONES

1. No existen diferencias estadísticamente significativas entre la aplicación de melatonina y la aplicación de un placebo en cuanto a las concentraciones de interleuquina-6 y la densidad ósea.
2. No existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de interleuquina-6 tras la aplicación de melatonina frente al control.
3. No se pueden determinar diferencias entre los niveles de nitrotirosina antes y después de aplicar melatonina o un placebo.
4. No existen diferencias estadísticamente significativas entre la aplicación de melatonina y placebo en cuanto a la densidad ósea, por lo que debemos concluir que el tratamiento no es influyente.
5. No es posible establecer una relación causal de la melatonina con las complicaciones sucedidas durante el postoperatorio.
6. Son necesarias más investigaciones con una metodología adecuada, ampliando la muestra y aplicando mayores dosis de melatonina.

12. DECLARACIÓN AUTORES

No existió remuneración económica a los sujetos participantes en el estudio. No existió remuneración económica a los investigadores. Esta investigación ha sido financiada en su totalidad de forma particular, y los investigadores declaran que no existe conflicto de intereses.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Shepherd JP and Brickley M. Surgical removal of third molars. *BMJ* 1994,309:620.
2. Mercier P and Precious D. Risks and benefits of removal of impacted third molars: a critical review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1992,21:17.
3. Dhariwal DK, Goodey R and Shepherd JR. Trends in oral surgery in England and Wales. *Br Dent J* 2002,192:639.
4. Chukwuneke F and Onyejiaka N. Management of postoperative morbidity after third molar surgery: a review of the literature. *Niger J Med* 2007,16:107.
5. Schultze-Mosgau S, Schmelzeisen JC, Frolich JC et al. Use of ibuprofen and methylprednisolone for the prevention of pain and swelling after removal of impacted third molars. *J Oral Maxillofac Surg* 1995,53:2.
6. Cotran RS, Kumar V and Collins T. Robbins pathologic basis disease. W. B. Sanders Company, Philadelphia 1999,6:50.
7. Malkawi Z, Al-Omiri MK and Khraisat A. Risk indicators of postoperative complications following surgical extraction of lower third molars. *Med Princ Prac* 2011,20:321.
8. Bruce RA, Frederickson GC and Small GS. Age of patients and morbidity associated with mandibular third molar surgery. *J Am Dent Assoc* 1980,101:240.
9. De Boer M, Raghoobar GM, Stegenga B et al. Complications after mandibular third molar extraction. *Quintessence Int* 1995,26:779.
10. Capuzzi P, Montebugnoli L, Vaccaro MA. Extraction of impacted third molars, a longitudinal prospective study on factors that affect postoperative recovery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994,77:341.
11. Bello SA, Adeyemo WL, Bamgbose BO et al. Effect of age, impaction types and operative time on inflammatory tissue reactions following lower third molar surgery. *Head and Face Medicine* 2011,7:8.
12. Monaco G, Staffolani C, Gatto MR et al. Antibiotic therapy in impacted third molar surgery. *Eur J Oral Sci* 1999,107:437.
13. Blondeau F and Daniel NG. Extraction of impacted mandibular third molars: postoperative complications and their risk factors. *J Can Dent Assoc* 2007,73:325a.
14. Benediktsdóttir JS, Wenzel A, Petersen JK et al. Mandibular third molar removal: risk indicators for extended operation time, postoperative pain, and complications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004,97:438.
15. Chiapasco M, De Cicco L and Marroneh K. Side effects and complications associated with third molar surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993,73:412.
16. Gbotolorun OM, Arotiba GT and Ladeinde AL. Assessment of factors associated with surgical difficulty in impacted mandibular third molar extraction. *J Oral Maxillofac Surg* 2007,65:1977.

17. Peterson LJ, Ellis E, Hupp JR et al. Contemporary oral and maxillofacial surgery. Mosby, St Louis 1993,2:225.
18. Lopez-Carriches C, Rafael GF, Jose MM, Manuel DF. Influence of smoking upon the post operative course of lower third molar surgery. Med Oral Pathol Oral Cir Bucal 2006,11:56-60.
19. Rakprasitkul S and Pairuchives V. Mandibular third molar surgery with primary closure and tubedrain. Int J Oral Maxillofac Surg 1997,26:187.
20. Saglam AA. Effect of tube drain with primary closure technique on postoperative trismus and swelling after removal of fully impacted mandibular third molars. Quintessence Int 2003,34:143-147.
21. García GA, Sampedro FH, Rey JH et al. Trismus and pain after removal of impacted third lower third molars. J Oral Maxillofac Surg 1997,55:1223.
22. Pederson A: Inter-relationship of complaints after removal of impacted third molars. Int J Oral Maxillofac Surg 1985,14:241-247.
23. Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B et al. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. J Oral Pathol Med 2009,38:605.
24. De Jongh RF, Vissers KC, Meert TF, Booij LHDJ, De Deyne CS, Heylen RJ. The role of interleukin-6 in nociception and pain. Anesth Analg. 2003,96:1096-1103.
25. Wang XM, Hamza M, Wu TX and Dionne RA. Up-regulation of IL-6, IL-8 and CCL2 gene expression after acute inflammation: correlation to clinical pain. Pain 2009,142(3):275-83.
26. Holzheimer RG and Steinmetz W. Local and systemic concentrations of pro- and anti- inflammatory cytokines in human wounds. Eur J Med Res 2000,18:347.
27. Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ et al. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. Clin Sci 1990,79:161.
28. Haefeli M and Elfering A. Pain assessment. Eur Spine J 2006,15:S17.
29. Seymour RA, Meechan JG and Blair GS. An investigation into post operative pain after third molar surgery under local analgesia. Br J Oral Maxillofac Surg 1985,23:410.
30. Wang XM, Wu TX, Hamza M, Ramsay ES, Wahl SM, Dionne RA. Rofecoxib modulates multiple gene expression pathways in a clinical model of acute inflammatory pain. Pain. 2007,128:136-147.
31. Wang XM, Wu TX, Lee YS, Dionne RA. Rofecoxib regulates the expression of genes related to the matrix metalloproteinase pathway in humans: implication for the adverse effects of cyclooxygenase-2 inhibitors. Clin. Pharmacol. Ther. 2006,79:303-315.
32. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA. IL-6 and its soluble receptor

- orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 2001,14:705-714.
33. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997,6:315-325.
 34. Suganuma MM. Discrete roles of cytokines, TNF-alpha, IL-1, IL-6 in tumor promotion and cell transformation. *Int J Oncol.* 2002, 20:131-136.
 35. Verri JWA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacol Therap.* 2006,112:116-138.
 36. De Jong RF, Vissers KC, Meert TF et al. The role of interleukin-6 in nociception and pain. *Anesth Analg* 2003,96:1096.
 37. Oka Y, Ibuki T, Matsumura K, Namba M, Yamazaki Y, Poole S, Tanaka Y, Kobayashi S. Interleukin-6 is a candidate molecule that transmits inflammatory information to the CNS. *Neuroscience.* 2007,145:530-538.
 38. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006,11:E151-7.
 39. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H and Noilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation&Allergy* 2005,4(4):471-9.
 40. Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L and Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007,51:443-52.
 41. Kawachi S, Cockrell A, Laroux FS, Gray L, Granger DN, van der Heyde HC, Grisham MB. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of VCAM-1 expression in gut inflammation. *Am J Physiol*1999,277(3 Pt 1):G572-6.
 42. Hamza H, Wang XM, Wu T et al. Nitric oxide is negatively correlated to pain during acute inflammation. *Mol Pain* 2010,6:55.
 43. Towler, P.K., Bennett, G.S., Moore, P.K., Neurogenic oedema and vasodilatation: effect of a selective neuronal NO inhibitor. *Brain, S.D.Neuroreport.* 1998,9(7):1513-8.
 44. Alfieri A.B. y Cubeddu L.X. Nitric Oxide and NK1-Tachynin receptors in Cyclophosphamide -induced cystitis, in rats. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics* 2002,95(2):824-829.
 45. Alfieri A.B., Malavé A. y Cubeddu L.X. Nitric Oxide synthase and Cyclophosphamideinduced cystitis in rats. *Naunyn-Schiedemberg's Arch. Pharmacol* 2001,363(3):353-357.
 46. Alfieri A.B. y Cubeddu L.X. Oxido nítrico y sustancia P: papel en la cistitis inducida por ciclofosfamida. *Archivos Venezolanos de Farmacología Clínica y Terapéutica* 2001,20(1):44-50.
 47. Whittle BJ. Nitric oxide in physiology and pathology. *Histochem J* 1995, 27(10):727-37.

48. Szabó C, Dawson VL. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 1998,19(7):287-98.
49. Schmidt HHHW, nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher K-E, Klein MM. Arginine is the hysiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur. J. Parmacol* 1988,154:213-216.
50. Ridger VC, Greenacre SA, Handy RL, Halliwell B, Moore PK, Whiteman M, Brain SD. Effect of peroxynitrite on plasma extravasation, microvascular blood flow and nociception in the rat. *Br J Pharmacol*1997,122(6):1083-8.
51. Li J y Billiar TR. Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am. J. Physiol*1999,276:G1069-73.
52. Li J y Billiar TR. The role of nitric oxide in apoptosis. *Semin Perinatol* 2000,24(1):46-50.
53. Clancy RM, Abramson SB. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995,210:93–101.
54. Mok MY, Fung PCW, Ooi C, Tse HF, Wong Y, Lam YM et al. Serum nitric oxide metabolites and disease activity in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2008,27:315-22.
55. Linares-Fernández B and Alfieri AB. Changes in nitric oxide, prostaglandins and myeloperoxidase activity in acrolein-induced cystitis in rats. *Invest Clin* 2009,50:23.
56. Iasella JM, Greenwell H, Miller RL et al. Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: a clinical and histologic study in humans. *J Periodontol* 2003,74:990.
57. Bränemark P, Hansson B, Adel R, Breine U, Linström J, Hallén O et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10 years period. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1977,16:1-132.
58. Herrera-Briones FJ, Romero-Olid MN, Vallecillo-Capilla M. Puesta al día sobre implantes de carga inmediata. Revisión bibliográfica. *Med Oral* 2004,9:74-81.
59. Thomas KA, Cook S. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition.. *J Biomed Mater Res* 1985,19:875-901.
60. Yamashita-Mikami E, Tanaka M, Saturai N, Yamada K, Ohsima H, Nomura S et al. Microstructural observation with microTC and histological analysis of human alveolar bone biopsy from a planned implant site: a case report. *The Open Dentistry Journal* 2013,7:47-54.
61. Jaffin RA, Berman CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *J Periodontol* 1991,62:2-4.
62. Herrmann I, Lekholm U, Holm S, Kultje C. Evaluation of patient and implant characteristics as potential prognostic factors for oral implant failures. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005,20:220-30.
63. Malik R, Garg R, Suresh DK, Chandna S. Success or failure of a dental implant: its relationship to bone density: a case report of a failed implant. *J Contemp Dent Pract* 2010,11:E065-72.

64. Schnitman PA, Wöhrle PS, Rubenstein JE. Immediate fixed interim prostheses supported by two-stage threaded implant: Methodology and results. *J Oral Implantol* 1990,2:96-105.
65. Molly L. Bone density and primary stability in implant therapy. *Clin Oral Imp Res* 2006,17(2):124-135.
66. Haghghat A, Hekmatian E, Abdinian M et al. Radiographic evaluation of bone formation and density changes after mandibular third molar extraction: a 6 month follow up. *Dent Res J* 2011,8:1.
67. Becker W, Hujuel PP, Becker BF and Willingham H. Osteoporosis and implant failure: an exploratory case-control study. *Journal of Periodontology* 2000,71:625-631.
68. Truhlar, RS, Morris, HF and Ochi S. Stability of the bone-implant complex. Results of longitudinal testing to 60 months with the Periotest device on endosseous dental implants. *Annals of Periodontology* 2000,5: 42-55.
69. Trisi P, Rao W. Bone classification: clinical-histomorphometric comparison. *Clin Oral Implants Res* 1999,10: 1-7.
70. Turkyilmaz I, Tözüm TF and Tumer C. Bone density assessments of oral implant sites using computerized tomography. *Journal of Oral Rehabilitation* 2007,34,267-272.
71. Schwarz MS, Rothman SLG, Rhodes ML, Chafetz N. Computed tomography: Part I. Preoperative assessment of the mandible for endosseous implant surgery. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1987,2:137-141.
72. Schwarz MS, Rothman SLG, Rhodes ML, Chafetz N. Computed tomography: Part II. Preoperative assessment of the maxilla for endosseous implant surgery. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1987,2:143-148.
73. Arenaz-Búa J, Luaces-Rey R, Sironvalle-Soliva S, Patiño-Seijas B, García-Rozado A, Martín-Sastre R, Ferreras-Granados J, Lorenzo-Franco F, Vázquez-Mahía I, López-Cedrún JL. A comparative study of platelet-rich plasma, hydroxyapatite, demineralized bone matrix and autologous bone to promote bone regeneration after mandibular impacted third molar extraction. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010,15(3):e483-9.
74. Hounsfield GN. Computed medical imaging. *Science* 1980,210: 22-28.
75. Isoda K, Ayukawa Y, Tsukiyama Y, Sogo M, Matsushita Y, Koyano K. Relationship between the bone density estimated by cone-beam computed tomography and the primary stability of dental implants. *Clin. Oral Impl. Res.* 23, 2012,832-836.
76. Kalender WA, and Suess C. A new calibration phantom for quantitative computed tomography. *Medical Physics* 1987,14:863-866.
77. Nickoloff EL, Feldman F, and Atherton JV. Bone mineral assessment: new dual-energy CT approach. *Radiology* 1988,168: 223-228.
78. Hill R, Holloway L and Baldock C. A dosimetric evaluation of water equivalent phantoms for kilovoltage x-ray beams. *Physics In Medicine and Biology* 2005,50: N331-N344.

79. Norton RM, Gamble C. Bone classification: an objective scale of bone density using the computerized tomography scan. *Clin Oral Implants Res.* 2001,12:79-84.
80. Lindh C, Nilsson M, Klinge B, Petersson A. Quantitative computed tomography of trabecular bone in the mandible. *Dentomaxillofac Radiol.* 1996,25:146–150.
81. Munhoz EA, Bodanezi A, Junior OF and Granjeiro JM. Bone crestal height and bone density after third-third molar extraction and grafting: a long-term follow-up study. *Clin Oral Invest* 2011,15:123-6.
82. Kobayashi K, Shimoda S, Nakagawa Y, and Yamamoto A. Accuracy in measurement of distance using limited cone-beam computerized tomography. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2004,19: 228–231.
83. Loubele M, Maes F, Schutyser F, Marchal G, Jacobs R and Suetens P. Assessment of bone segmentation quality of cone-beam CT versus multislice spiral CT: a pilot study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 2006,102: 225–234.
84. Pinsky HM, Dyda S, Pinsky RW, Misch KA and Sarment DP. Accuracy of three-dimensional measurements using cone-beam CT. *Dentomaxillofacial Radiology* 2006,35: 410–416.
85. Loubele M, Guerrero ME, Jacobs R, Suetens P and van Steenberghe D. A comparison of jaw dimensional and quality assessments of bone characteristics with cone-beam CT, spiral tomography, and multi-slice spiral CT. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2007,22:446–454.
86. Ekestubbe A, Grondahl K, Ekholm S, Johansson PE and Grondahl HG. Low-dose tomographic techniques for dental implant planning. *The International Journal Of Oral & Maxillofacial Implants* 1996,11:650–659.
87. Loubele M, Jacobs R, Maes F, Schutyser F, Debaveye D, Bogaerts R, Coudyzer W, Vandermeulen D, van CJ, Marchal G and Suetens P. Radiation dose vs. image quality for lowdose CT protocols of the head for maxillofacial surgery and oral implant planning. *Radiation Protection Dosimetry* 2005,117: 211–216.
88. Hiasa K, Abe Y, Okazaki Y, Nogami K, Mizumachi W and Akagawa Y. Preoperative computed tomography-derived bone densities in Hounsfield Units at implant sites acquired primary stability. *ISRN Dentistry* 2011,678729:1-5
89. Yim JH, Ryu DM, Lee BS, Kwon YD. Analysis of digitalized panorama and cone beam computed tomographic image distortion for the diagnosis of dental implant surgery. *J Craniofac Surg* 2011,22: 669-73.
90. Nackaerts O, Maes F, Yan H, Souza PC, Pauwels R, and Jacobs R. Analysis of intensity variability in multislice and cone beam computed tomography. *Clinical Oral Implants Research* 2011, 22:873–879.
91. Naitoh M, Aimiya H, Hirukawa A, and Arijji E. Morphometric analysis of mandibular trabecular bone using cone beam computed tomography: an in vitro study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 2010,25:1093-1098.

92. Sogo, M. Evaluation of clinical bone quality on implant installation -reliability about hounsfield unit on NSCT and CBCT. *Journal of Japanese Society of Oral Implantology* 2009,Special Issue:119 (Abstract).
93. González-García R, Monje F. The reliability of cone-beam computed tomography to assess bone density at dental implant recipient sites: a histomorphometric analysis by micro-CT. *Clin Oral Impl Res* 2013,24:871–879.
94. Beer A, Gahleitner A, Holm A, Tschabitscher M and Homolka P. Correlation of insertion torques with bone mineral density from dental quantitative CT in the mandible. *Clin Oral Impl Res* 2003,14:616–620.
95. Ikumi N and Tsutsumi S. Assessment of correlation between computerized tomography values of the bone and cutting torque values at implant placement: a clinical study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2005,20:253–260.
96. Merheb J, Van Assche N, Coucke W, Jacobs R, Naert I, Quirynen M. Relationship between cortical bone thickness or computerized tomography-derived bone density values and implant stability. *Clin Oral Impl. Res* 2010,21:612–617.
97. Ludlow JB, Davies-Ludlow LE, Brooks SL and Howerton WB. Dosimetry of 3CBCT devices for oral and maxillofacial radiology: CB Mercuray, NewTom 3G and i-CAT. *Dentomaxillofac Radiol* 2006,35:219-26.
98. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Topics Med Chem* 2002,2:181.
99. Cutando A, Aneiros-Fernández J, López-Valverde A et al. A new perspective in oral health: potential importance and actions of melatonin receptors MT1, MT2, MT3, and RZR/ROR in the oral cavity. *Arch Oral Biol* 2011,56:944.
100. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B and Hardeland R. Melatonin. Nature's most versatile biological signal? *FEBS Journal* 2006,273:2813–2838.
101. Laakso ML, Porkka-Heiskanen T, Aliala A et al. Correlation between salivary and serum melatonin: dependence on serum melatonin levels. *J Pineal Res* 1990,9:39.
102. Srinath R, Acharya AB and Thakur SL. Salivary and gingival crevicular fluid melatonin in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2010,81:277.
103. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia- Maurino S, Reiter RJ and Guerrero JM. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J* 2004,18:537–539.
104. Ambriz-Tututi M, Rocha-González HI, Cruz SL et al. Melatonin: a hormone that modulates pain. *Life Sciences* 2009,84:489.
105. Pieri C, Moroni F, Marra M et al. Melatonin is an efficient antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr* 1995, 20:159.

106. Wade A, Downie S. Prolonged-release melatonin for the treatment of insomnia in patients over 55 years. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2008,17(10): 1567–1572.
107. Kostoglou-Athanassiou I, Athanassiou P, Treacher D, Wheeler M and Forsling M. Neurohypophysial hormone and melatonin secretion over the natural and suppressed menstrual cycle in premenopausal women. *Clin Endocrinol* 1998a,49:209–216.
108. Lopez-Burillo S, Tan DX, Rodriguez-Gallego V, Manchester LC, Mayo JC, Sainz RM and Reiter RJ. Melatonin and its derivatives cyclic 3-hydroxymelatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and 6-methoxymelatonin reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents. *J Pineal Res* 2003,34:178–184.
109. Rozov SV, Filatova EV, Orlov AA, Volkova AV, Zhloba AR, Blashko EL & Pozdeyev NV. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine is a product of melatonin oxidation in rats. *J Pineal Res* 2003,35:245–250.
110. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ and Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005,27:189-200.
111. Hardeland R, Poeggeler B, Niebergall R and Zelosko V. Oxidation of melatonin by carbonate radicals and chemiluminescence emitted during pyrrole ring cleavage. *J Pineal Res* 2003,34:17–25.
112. Hardeland R (1997) Melatonin: multiple functions in signaling and protection. In *Skin Cancer and UV Radiation* (Altmeyer P, Hoffmann K & Stucker M, eds) Springer 1997,x:186-98.
113. Hardeland R, Coto-Montes A and Poeggeler B. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol Int* 2003,20:921–962.
114. Wurtman RJ and Zhdanova I. Improvement of sleep quality by melatonin. *Lancet* 1995,346:1491.
115. Lavie P. Melatonin: role in gating nocturnal rise in sleep propensity. *J Biol Rhythms* 1997,12:657–665.
116. Zisapel N. Circadian rhythm sleep disorders: pathophysiology and potential approaches to management. *CNS Drugs* 2001,15:311–328.
117. Scheer FA, Van Montfrans GA, Van Someren EJ, Mairuhu G and Buijs RM. Daily night-time melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension. *Hypertension* 2004,43:192–197.
118. Guerrero JM and Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2002,2:167–179.
119. Esquifino AI, Pandi-Perumal SR and Cardinali DP. Circadian organization of the immune response: a role for melatonin. *Clin Appl Immunol Rev* 2004,4:423-433.
120. Armstrong SM. Melatonin and circadian control in mammals. *Experientia* 1989,45:932–938.

121. Ressmeyer AR, Mayo JC, Zelosko V, Sainz RM, Tan DX, Poeggeler B, Antolin I, Zsizsik BK, Reiter RJ and Hardeland R. Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep* 2003,8:205–213.
122. Kelly RW, Amato F and Seamark RF. N-acetyl-5- methoxy kynurenamine, a brain metabolite of melatonin, is a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1984,121:372–379.
123. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC and Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001,34:237–256.
124. Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C and Reiter RJ. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl- 5- ethoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 2005,165:139–149.
125. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD and Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995,26:497–502.
126. Ferry G, Ubeaud C, Lambert PH, Bertin S, Coge F, Chomarat P, Delagrang P, Serkiz B, Bouchet JP, Truscott RJ et al. Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan. Investigation on both indoleamine- 2,3-dioxygenase and myeloperoxidase. *Biochem J* 2005,388:205–215.
127. Poeggeler B, Thuermann S, Dose A, Schoenke M, Burkhardt S and Hardeland R. Melatonin's unique radical scavenging properties – roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J Pineal Res* 2002,33:20–30.
128. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Poeggeler B, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM and Reiter RJ. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res* 2003,34:249–259.
129. Sugden D, Davidson K, Hough KA, Teh MT. Melatonin, melatonin receptors and melanophores: a moving story. *Pigment Cell Research* 2004,17(5):454–460.
130. Dubocovich ML and Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005,27:101–110.
131. Reppert SM, Weaver DR and Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 1994,13:1177–1185.
132. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA and Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995,92:8734– 8738.
133. Dubocovich ML, Cardinali DP, Delagrang P, Krause DN, Strosberg D, Sugden D and Yocca FD. Melatonin receptors. In *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*. IUPHAR Media, 2000,2nd ed:271-7.

134. Yu CX, Zhu CB, Xu SF, Cao XD, Wu GCb. Selective MT melatonin receptor antagonist blocks melatonin-induced 2 antinociception in rats. *Neuroscience Letters* 2000b,282(3):161–164.
135. Tu Y, Sun RQ, Willis WD. Effects of intrathecal injections of melatonin analogs on capsaicin-induced secondary mechanical allodynia and hyperalgesia in rats. *Pain* 2004,109(3):340–350.
136. Wang T, Li SR, Dai X, Peng YL, Chen Q, Wang R. Effects of melatonin on orphanin FQ/ nociceptin-induced hyperalgesia in mice. *Brain Research* 2006,1085(1):43–48.
137. Ambriz-Tututi, Granados-Soto V. Oral and spinal melatonin reduces tactile allodynia in rats via activation of MT2 and opioid receptors. *Pain* 2007,132(3):273–280.
138. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrangre P, Canet E and Boutin JA. Identification of the melatonin binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 200,275:31311–31317.
139. Foster CE, Bianchet MA, Talalay P, Faig M and Amzel LM. Structures of mammalian cytosolic quinone reductases. *Free Radic Biol Med* 2000,29:241–245.
140. Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 1994,269(46):28531–28534.
141. Smirnov AN. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc)* 2001,66(1):19–26.
142. Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, Nayeri S, Schrader M, Carlberg C. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 1995,270(13):7037–7040.
143. Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC and Barlow-Walden LR. Melatonin – a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1994,738:419–420.
144. Park HT, Kim YJ, Yoon S, Kim JB, Kim JJ. Distributional characteristics of the mRNA for retinoid Z receptor beta (RZR beta), a putative nuclear melatonin receptor, in the rat brain and spinal cord. *Brain Research* 1997,747(2):332–337.
145. Benitez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res* 2006,40:1–9.
146. Yao H, Guo L, Jiang BH, Luo J, Shi X. Oxidative stress and chromium(VI) carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2008,27:77–88.
147. Bogdan C, Rölinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000,12:64–76.

148. Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 2009,459:996–9.
149. Cristofanon S, Nuccitelli S, D'Alessio M, Dicato M, Diederich M, Ghibelli L. Oxidation-dependent maturation and survival of explanted blood monocytes via Bcl-2 up-regulation. *Biochem Pharmacol* 2008,76:1533–43.
150. Rosseau S, Selhorst J, Wiechmann K, Leissner K, Maus U, Mayer K, et al. Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *Immunology* 2000,164:427–35.
151. Kim H, Hwang JS, Woo CH, Kim EY, Kim TH, Cho KJ, et al. TNF-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 is regulated by a Rac-ROS-dependent cascade in human airway epithelial cells. *Exp Mol Med* 2008,40:167–75.
152. Cristofanon S, Morceau F, Scovassi AI, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. Oxidative, multistep activation of the noncanonical NF-kappaB pathway via disulfide Bcl-3/p50 complex. *FASEB J* 2009,23:45–57.
153. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Álvarez-Sánchez N, Rodríguez-Rodríguez A and Guerrero JM. Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci* 2013,14:8638-8683.
154. Radogna F, Diederich M and Ghibelli L. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochemical Pharmacology* 2010,80:1844–1852.
155. Martinon F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol* 2010,40:616–9.
156. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabó C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *Journal of Pineal Research* 1997,23(2):106–116.
157. Costantino G, Cuzzocrea S, Mazzon E, Caputi AP. Protective effects of melatonin in zymosan-activated plasma-induced paw inflammation. *European Journal of Pharmacology* 1998,363(1):57–63.
158. Lin XJ, Mei GP, Liu J, Li YL, Zuo D, Liu SJ, Zhao TB, Lin MT. Therapeutic effects of melatonin on heatstroke-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J. Pineal Res.* 2011,50:436–444.
159. Chen CF, Wang D, Reiter RJ, Yeh DY. Oral melatonin attenuates lung inflammation and airway hyperreactivity induced by inhalation of aerosolized pancreatic fluid in rats. *J Pineal Res* 2011,50:46–53.
160. Jaworek J, Szklarczyk J, Jaworek AK, Nawrot-Porabka K, Leja-Szpak A, Bonior J, Kot M. Protective effect of melatonin on acute pancreatitis. *Int J Inflamm* 2012,173675:1–173675:8.
161. Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, Caputi AP. Regulation of prostaglandin production in carrageenan-induced pleurisy by melatonin. *Journal of Pineal Research* 1999,27(12):9–14.

162. Mohan N, Sadeghi K, Reiter RJ, Meltz ML. The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B. *Biochemistry and Molecular Biology International* 1995,37(6):1063–1070.
163. Konturek SJ, Zayachkivska O, Havryluk XO, Brzozowski T, Sliwowski Z, Pawlik M, Konturek PC, Czeńnikiewicz-Guzik M, Gzhegotsky MR, Pawlik WW. Protective influence of melatonin against acute esophageal lesions involves prostaglandins, nitric oxide and sensory nerves. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2007,58(2):361–377.
164. Raghavendra V, Agrewala JN, Kulkarni SK. Melatonin reversal of lipopolysaccharides-induced thermal and behavioral hyperalgesia in mice. *European Journal of Pharmacology* 2000,395(1):15–21.
165. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production melatonin via complex formation with calmodulin. *Journal of Cellular Biochemistry* 1997,65(3):430–442.
166. Garcia-Perganeda A, Guerrero JM, Rafii-El-Idrissi M, Paz Romero M, Pozo D, Calvo JR. Characterization of membrane melatonin receptor in mouse peritoneal macrophages: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Journal of Neuroimmunology* 1999,95(1–2):85–94.
167. Xia, M.Z., Liang, Y.L., Wang, H., Chen, X., Huang, Y.Y., Zhang, Z.H., Chen, Y.H., Zhang, C., Zhao, M., Xu, D.X., et al. Melatonin modulates tlr4-mediated inflammatory genes through myd88- and trif-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated raw264.7 cells. *J. Pineal Res* 2012,53:325–334.
168. Huang SH, Cao XJ, Wei W. Melatonin decreases tlr3-mediated inflammatory factor expression via inhibition of nf-kappa b activation in respiratory syncytial virus-infected raw264.7 macrophages. *J Pineal Res* 2008,45:93–100.
169. Hoppe JB, Frozza RL, Horn AP, Comiran RA, Bernardi A, Campos MM, Battastini AM, Salbego C. Amyloid-beta neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin: Involvement of gsk-3beta, tau and neuroinflammation. *J Pineal Res* 2010,48:230–238.
170. Cutando A, Arana C, Gomez G, Escames G, Lopez A, Ferrera MJ, et al. Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. *J Periodontol* 2007,78:576–83.
171. Ahmad R, Haldar C, Gupta S. Melatonin membrane receptor type mt1 modulates cell-mediated immunity in the seasonally breeding tropical rodent *funambulus pennanti*. *Neuroimmunomodulation* 2012,19:50–59.
172. Ahmad R, Haldar C. Photoperiodic regulation of mt1 and mt2 melatonin receptor expression in spleen and thymus of a tropical rodent *funambulus pennanti* during reproductively active and inactive phases. *Chronobiol Int* 2010,27:446–462.
173. Lahiri S, Haldar C. Response of melatonin receptor mt1 in spleen of a tropical indian rodent, *funambulus pennanti*, to natural solar insolation and different photoperiodic conditions. *Chronobiol Int* 2009,26:1559–1574.
174. Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Muñoz F, Lopez-Peña M, Stephenson J, et al. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. *J Pineal Res* 2008,45:174–9.

175. Lissoni P. The pineal gland as a central regulator of cytokine network. *Neuro Endocrinol Lett* 1999,20:343–349.
176. Gupta S, Haldar C. Physiological crosstalk between melatonin and glucocorticoid receptor modulates t-cell mediated immune responses in a wild tropical rodent, *funambulus pennanti*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013,134:23–36.
177. Drazen DL, Nelson RJ. Melatonin receptor subtype mt2 (mel 1b) and not mt1 (mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology* 2001,74:178–184.
178. Arias J, Melean E, Valero N, Pons H, Chacin-Bonilla L, Larreal Y, Bonilla E. Effect of melatonin on lymphocyte proliferation and production of interleukin-2 (il-2) and interleukin-1 beta (il-1 beta) in mice splenocytes. *Invest Clin* 2003,44:41–50.
179. Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH. Melatonin administration attenuates depressed immune functions trauma-hemorrhage. *J Surg Res* 1996,63:256–262.
180. Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM. Melatonin enhances il-2, il-6, and ifn-gamma production by human circulating cd4+ cells: A possible nuclear receptor-mediated mechanism involving t helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 1997,159:574–581.
181. Garcia-Maurino S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin activates th1 lymphocytes by increasing il-12 production. *Life Sci* 1999,65:2143–2150.
182. Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Fumagalli L and Brera G. A study of immunoendocrine strategies with pineal indoles and interleukin-2 to prevent radiotherapy-induced lymphocytopenia in cancer patients. *In Vivo* 2008,22:397–400.
183. Jimenez-Jorge S, Jimenez-Caliani AJ, Guerrero JM, Naranjo MC, Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Osuna C, Molinero P. Melatonin synthesis and melatonin-membrane receptor (mt1) expression during rat thymus development: Role of the pineal gland. *J Pineal Res* 2005,39:77–83.
184. Ahmad R, Haldar C. Melatonin and androgen receptor expression interplay modulates cell-mediated immunity in tropical rodent *funambulus pennanti*: An in vivo and in vitro study. *Scand J Immunol* 2010,71:420–430.
185. Kostoglou-Athanassiou I. Therapeutic applications of melatonin. *The Adv Endocrinol Metab* 2013,4(1):13-24.
186. Szabó C, Wong HR, Salzman AL. Pre-exposure to heat shock inhibits peroxynitrite-induced activation of poly(ADP) ribosyltransferase and protects against peroxynitrite cytotoxicity in J774 macrophages. *European Journal of Pharmacology* 1996,315(2):221–226.
187. Laikin MI, Miller CH, Stott ML, Winters WD. Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia. *Life Sci* 1981,29:2543-2551.

188. Srinivasan V, Lauterbach EC, Ho KY, Acuña-Castroviejo D, Zakaria R and Brzezinski A. Melatonin in antinociception: its therapeutic applications. *Current Neuropharmacology* 2012,10:167-178.
189. Golombek DA, Escolar E, Burin LJ, Bristo-Sanchez MG, Cardinali DP. Time dependent melatonin analgesia in mice: inhibition by opiate or benzodiazepine antagonism. *Eur. J. Pharmacol* 1991,194(1):25-30.
190. Yu CX, Weng SM, Chen CHa. Studies on the analgesic effect and physical dependence of melatonin in mice. *Chinese Journal of Drug Dependence* 1999a,8:58–60.
191. Yu CX, Wu GC, Xu SF, Chen CHa. Effect of melatonin on release of endogenous opioid peptides in rat periaqueductal gray. *Sheng Li Xue Bao* 2000a,52:207–210.
192. Yu CX, Zhu CB, Xu SF, Cao XD, Wu GCb. Selective MT melatonin receptor antagonist blocks melatonin-induced 2 antinociception in rats. *Neuroscience Letters* 2000b,282(3):161–164.
193. Naguib M, Hammond DL, Schmid III PG, Baker MT, Cutkomp J, Queral L, Smith T. Pharmacological effects of intravenous melatonin: comparative studies with thiopental and propofol. *British Journal of Anaesthesia* 2003,90(4):504–507.
194. Le Grand SM, Patumraj S, Phansuwan-Pujito P, Srikiatkachorn A. Melatonin inhibits cortical spreading depression-evoked trigeminal nociception. *Neuroreport* 2006,6(16):1709–1713.
195. Xu S, Wei W, Shen Y, Hao J, Ding C. Studies on the antiinflammatory, immunoregulatory, and analgesic actions of melatonin. *Drug Development Research* 1996,39(2):167–173.
196. Jeong JH, Choi KB, Yi BC, Chun CH, Sung KY, Sung JY, Gimm YM, Huh IH, Sohn UD. Effects of extremely low frequency magnetic fields on pain thresholds in mice: roles of melatonin and opioids. *Journal of Autonomic Pharmacology* 2000,20(4):259–264.
197. Mantovani M, Pertile R, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neuroscience Letters* 2003,343(1):1–4.
198. Esposito E, Paterniti I, Mazzon E et al. Melatonin reduces hyperalgesia associated with inflammation. *J Pineal Res* 2010,49:321.
199. Pang CS, Tsang SF, Yang JC. Effects of melatonin, morphine and diazepam on formalin-induced nociception in mice. *Life Sciences* 2001,68(8):943–951.
200. Ray M, Mediratta PK, Mahajan P, Sharma KK. Evaluation of the role of melatonin in formalin-induced pain response in mice. *Indian Journal of Medical Sciences* 2004,58(3):122–130.
201. Hernández-Pacheco A, Araiza-Saldaña CI, Granados-Soto V, Mixcoatl-Zecuatl T. Possible participation of the nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channels pathway in the peripheral antinociception of melatonin. *European Journal of Pharmacology* 2008,596(1–3):70–6.

202. Zahn PK, Lansmann T, Berger E, Speckmann EJ, Musshoff U. Gene expression and functional characterization of melatonin receptors in the spinal cord of the rat: implications for pain modulation. *J Pineal Res* 2003,35(1):24–31.
203. Ying SW, Huang ZQ. Effects of pineal body and melatonin on sensitivity to pain in mice. *Acta Pharmacologica Sinica* 1990,11(5):411–414.
204. Gomar MD, Fernández B, Castillo JL, del Aguila CM, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts pinealectomy-dependent decreases in rat brain [3H]flunitrazepam binding through an opioid mechanism. *Neurosci Lett* 1993,164(1-2):149-153.
205. Yu CX, Zhu CB, Xu SF, Cao XD, Wu GC. The analgesic effects of peripheral and central administration of melatonin in rats. *Eur J Pharmacol* 2000,403:49-53.
206. Li SR, Wang T, Wang X, Dai X, Chen Q, Li RD. Melatonin enhances antinociceptive effects of δ but not μ opioid agonist in mice. *Brain Res* 2005,1043(1-2):132-138.
207. Laste G, De Macedo IC, Rozisky JR, Da Silva FR, Caumo W and Torres ILS. Melatonin administration reduces inflammatory pain in rats. *J Pain Res* 2012;5:359-62.
208. Shin DJ, Jeong CW, Lee SH, Yoon MH. Receptors involved in the antinociception of intrathecal melatonin in formalin test rats. *Neurosci Lett* 2011,494:207–210.
209. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Spence DW, et al. Potential use of melatonergic drugs in analgesia: mechanisms of action. *Brain Res Bull* 2010,81:362–371.
210. Bilici D, Akpınar E, Kiziltunç A. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced acute local inflammation. *Pharmacol Res* 2002,46:133–139.
211. Lichtenberger LM, Romero JJ, Dial EJ, Moore JE. Naproxen-PC: a GI safe and highly effective anti-inflammatory. *Inflammopharmacology* 2008,5:17–21.
212. Lewy AJ, Emens J, Jackman A, Yuhas K. Circadian uses of melatonin in humans. *Chronobiol Int* 2006,23:403–412.
213. Yoon MH, Park HC, Kim WM, et al. Evaluation for the interaction between intrathecal melatonin and clonidine or neostigmine on formalin induced nociception. *Life Sci* 2008,83:845–850.
214. Deng WG, Tang ST, Tseng HP, Wu KK. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood* 2006,108:518–524.
215. Choi EY, Jin JY, Lee JY, Choi JI, Choi IS, Kim SJ. Melatonin inhibits Prevotella intermedia lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and interleukin-6 in murine macrophages by suppressing nf-kappa b and stat1 activity. *J. Pineal Res* 2011,50:197–206.
216. Huang SH, Cao XJ, Wei W. Melatonin decreases tlr3-mediated inflammatory factor expression via inhibition of nf-kappa b activation in respiratory syncytial virus-infected raw264.7 macrophages. *J Pineal Res* 2008,45:93–100.

217. Feng Z, Zhang JT. Melatonin reduces amyloid beta-induced apoptosis in pheochromocytoma (PC12) cells. *J. Pineal Res* 2004,37:257–266.
218. Feng Z, Chang Y, Cheng Y, Zhang BL, Qu ZW, Qin C, Zhang JT. Melatonin alleviates behavioral deficits associated with apoptosis and cholinergic system dysfunction in the APP 695 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Pineal Res* 2004,37:129–136.
219. Pei Z, Fung PC, Cheung RT. Melatonin reduces nitric oxide level during ischemia but not blood– brain barrier breakdown during reperfusion in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J. Pineal Res* 2003,34:110–118.
220. Escames G, Leon J, López LC, Acuna-Castroviejo D. Mechanisms of N-methyl-D-aspartate receptor inhibition by melatonin in the rat striatum. *Journal of Neuroendocrinology* 2004,16(11): 929–935.
221. Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* 2003,17:932–934.
222. Escames G, López LC, Ortiz F, Ros E, Acuña-Castroviejo D. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp. Gerontol.* 2006,41:1165–1173.
223. Escames G, López LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, León J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J. Pineal Res* 2006,40:71–78.
224. Escames G, López LC, Ortiz F, López A, García JA, Ros E, Acuña-Castroviejo D. Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J* 2007,274:2135–2147.
225. Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V et al. Melatonin-a pleotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol* 2011,93:350.
226. León J, Vives F, Crespo E, Camacho E, Espinosa A, Gallo MA, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Modification of nitric oxide synthase activity and neuronal response in rat striatum by melatonin and kynurenine derivatives. *J. Neuroendocrinol* 1998,10:297–302.
227. León J, Macías M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martín M, Espinosa A, Gallo MA, Acuña-Castroviejo D. Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Mol. Pharmacol* 2000,58:967–975.
228. León J, Escames G, Rodríguez MI, López LC, Tapias V, Entrena A, Camacho E, Carrión MD, Gallo MA, Espinosa A, Tan DX, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *J. Neurochem* 2006,98:2023–2033.
229. Chandrasekaran A, Ponnambalam G, Kaur C. Domoic acid-induced neurotoxicity in the hippocampus of adult rats. *Neurotox. Res* 2004,6:105–117.
230. Escames G, Khaldy H, León J, Gonzalez L, Acuña-Castroviejo D. Changes in iNOS activity, oxidative stress and melatonin levels in hypertensive patients treated with lacidipine. *J. Hypertens* 2004,22:629–635.

231. Yamamoto H, Tang H. Effects of 2-amino-7-phosphonohepatanoic acid, melatonin or NG-nitro-L-arginine on cyanide or N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in rat cortical cells. *Toxicology Letters* 1998,94(1):13–18.
232. Acuña CD, Escames G, Carazo A et al. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Top Med Chem* 2002,2:133–151.
233. Witt-Enderby PA, Radio NM, Doctor JS et al. Therapeutic treatments potentially mediated by melatonin receptors: potential clinical uses in the prevention of osteoporosis, cancer and as an adjuvant therapy. *J Pineal Res* 2006,41:297–305.
234. Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, Barone A, Cutando A, Alcaraz-Baños M, Chiva F et al. Melatonin plus porcine bone on discrete calcium deposit implant surfaces stimulates osteointegration in dental implants. *J Pineal Res* 2009,47:164–172.
235. Nakade O, Koyama H, Arijji H et al. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vivo. *J Pineal Res* 1999, 27:106.
236. Roth JA, Kim BG, Lin WL et al. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 1999, 274:22041.
237. Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, López-Marí L et al. Actions of melatonin mixed with collagenized porcine bone versus porcine only on osteointegration of dental implants. *J Pineal Res* 2010,49:356.
238. Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrangé P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* 2008,154:1182–1195.
239. Maldonado MD, Mora-Santos M, Naji L et al. Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacol Res* 2010,62:282.
240. Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V et al. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res* 2003,34:81.
241. Koyama H, Nakade O, Takada Y et al. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002,17:1219.
242. Calvo-Guirado JL, Ramírez-Fernández MP, Gómez-Moreno G, Maté-Sánchez JE, Delgado-Ruiz R, Guardia J, López-Marí L et al. Melatonin stimulates the growth of new bone around implants in the tibia of rabbits. *J Pineal Res* 2010,49:356-63.
243. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta* 1999,1472:206–214.
244. Tresguerres IF, Clemente C, Blanco L et al. Effects of local melatonin application on implant osseointegration. *Clin Implant Dent Relat Res* 2010, In press.
245. Ramírez-Fernández MP, Vicente-Ortega V, Calvo-Guirado JL, Álvarez-Sánchez N, Delgado-Ruiz RA, Maté-Sánchez de-Val JE et al. Modelo experimental de la

respuesta ósea a implantes y melatonina: estudio radiológico e histomorfométrico. X Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica 2009. Nº 1909.

246. Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J Pineal Res* 2006,40:332–342.
247. Takechi M, Tatehara S, Satomura K, Fujisawa K, Nagayama M. Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. *J Mater Sci: Mater Med* 2008,19:2949–2952.
248. Bourne RS, Mills GH, Minelli C. Melatonin therapy to improve nocturnal sleep in critically ill patients: encouraging results from a small randomised controlled trial. *Critical Care* 2008,12(2):R52, 2008.
249. Radogna F, Diederich M and Ghibelli L. Melatonin: a pleotropic molecule regulating inflammation. *Biochem Pharmacol* 2010,80:1844.
250. Histing T, Anton C, Scheuer C et al. Melatonin impairs fracture healing by suppressing RANKL-mediated bone remodeling. *J Surg Res* 2010, In press.
251. Baeza I, Fdez-Tresguerres J, Ariznavarreta C et al. Effects of growth hormone, melatonin, oestrogens and phytoestrogens on the oxidized glutathione (GSSG)/reduced glutathione (GSH) ratio and lipid peroxidation in aged ovariectomized rats. *Biogerontology* 2010,11:687.
252. Ramírez-Fernández MP, Ortega W, Calvo-Guirado JL et al. Modelo experimental de la respuesta ósea a implantes y melatonina: estudio radiológico e histomorfométrico. X Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica 2009.
253. Molteni R. Prospects and challenges of rendering tissue density in Hounsfield units for cone beam computed tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013,116:105-119.

14. TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Tiempo de intervención quirúrgica

NÚMERO DE PACIENTE	EDAD (años/meses)	TIEMPO DE INTERVENCIÓN (minutos)	
		DERECHO	IZQUIERDO
1	24/ 5	12,93	11,20
2	17/ 3	14,60	16,32
3	23/ 3	19,63	23,17
4	23/ 2	18,80	21,85
5	23/ 8	15,13	17,24
6	25/ 0	22,77	21,75
7	22/ 2	21,32	18,88
8	24/ 3	14,82	16,93
9	22/ 5	14,00	12,93
10	20/ 5	16,63	18,99

Tabla II. Concentración de IL-6 (pg/ml)

	a	A	b	B
Media	11,1662	361,3186	15,0269	262,5841
Desv. típ.	11,02627	235,22458	21,92117	233,91990
Mínimo	,81	9,55	,62	18,43
Máximo	30,14	590,31	74,10	576,87

Tabla III. Valores descriptivos de densidad ósea (UH)

	Región alveolar en corte panorámico				Región ósea distal en corte panorámico			
	a	A	b	B	a	A	b	B
Media	1135,200	561,978	1244,011	598,822	609,389	631,400	620,589	684,659
Desv. típ.	169,7818	105,9202	113,2596	209,0340	173,2774	91,0766	177,3594	115,4965
Mínimo	915,3	424,3	1047,0	391,1	428,7	498,0	371,4	525,0
Máximo	1371,1	700,1	1407,5	1029,5	908,6	741,5	954,7	928,3
	Región alveolar en corte panorámico				Región ósea distal en corte panorámico			
	a	A	b	B	a	A	b	B
Media	1634,378	377,422	1673,178	347,556	358,356	466,556	322,444	434,467
Desv. típ.	273,2394	125,6734	180,2294	97,0148	143,2897	213,7423	124,6199	188,8701
Mínimo	1347,8	158,8	1331,6	147,6	160,2	147,0	183,6	156,4
Máximo	2071,2	648,4	1940,6	475,4	569,0	889,0	514,2	812,2

Figura 1. Concentraciones de IL-6 (pg/ml)

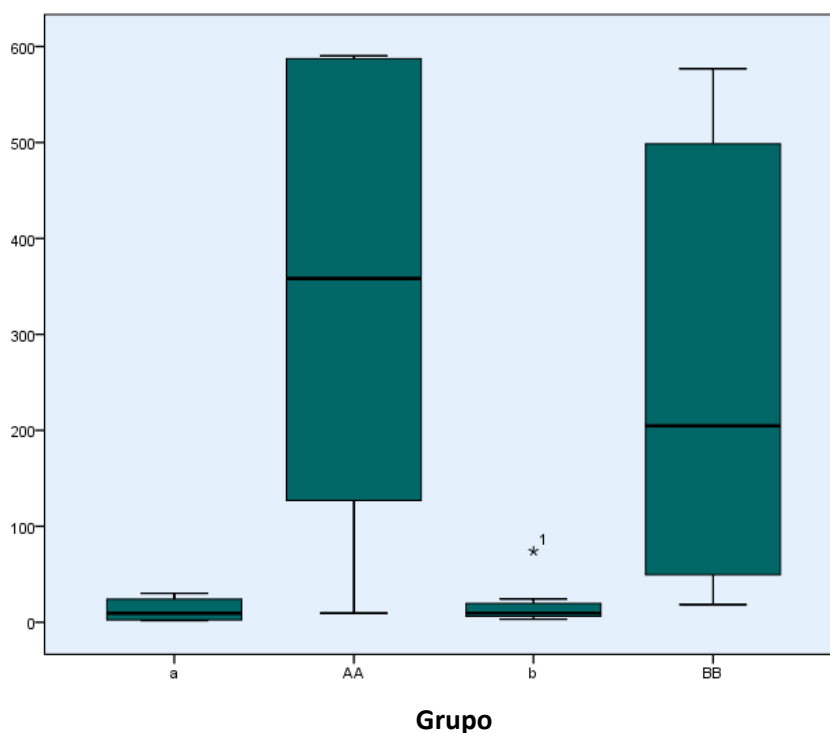


Figura 2. Curva de detectabilidad de nitrotirosina

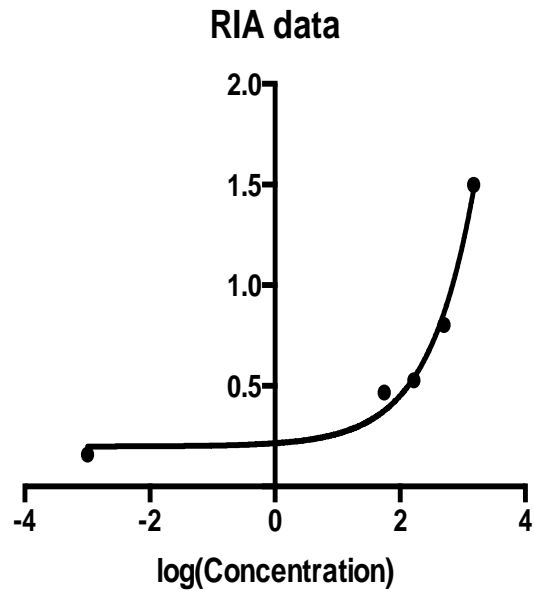


Figura 3. Densidad ósea cortes panorámicos (UH)

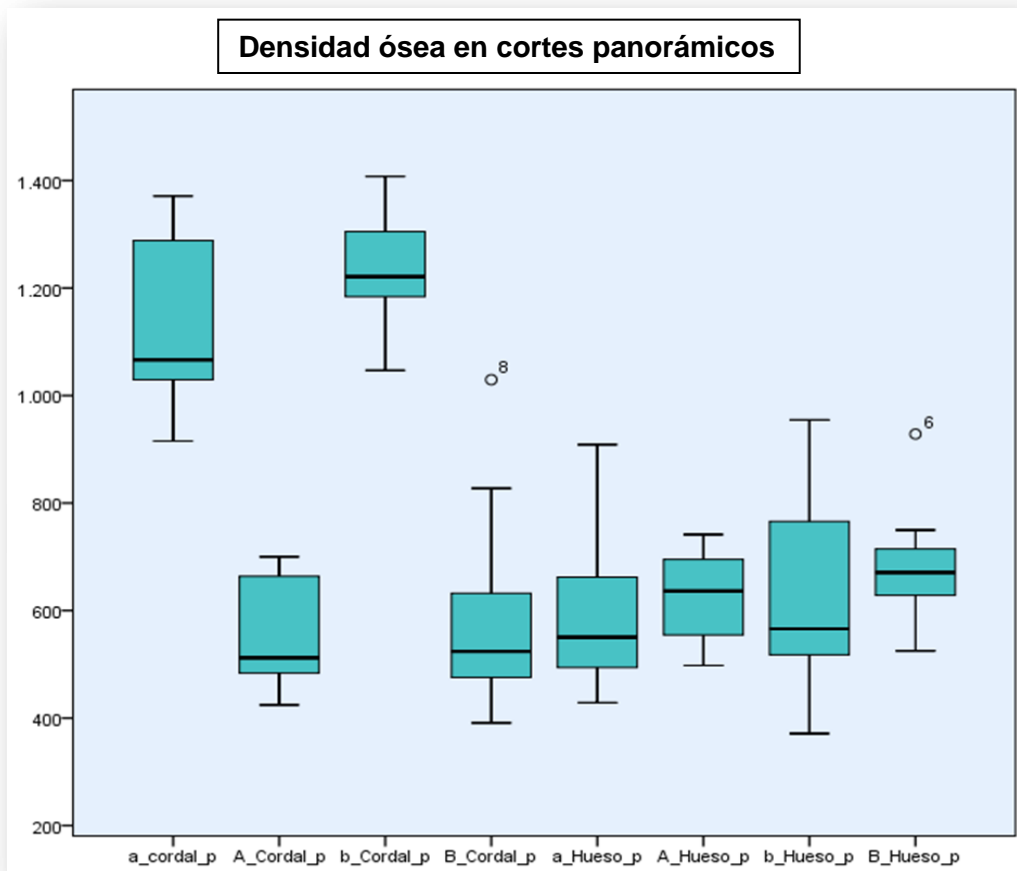
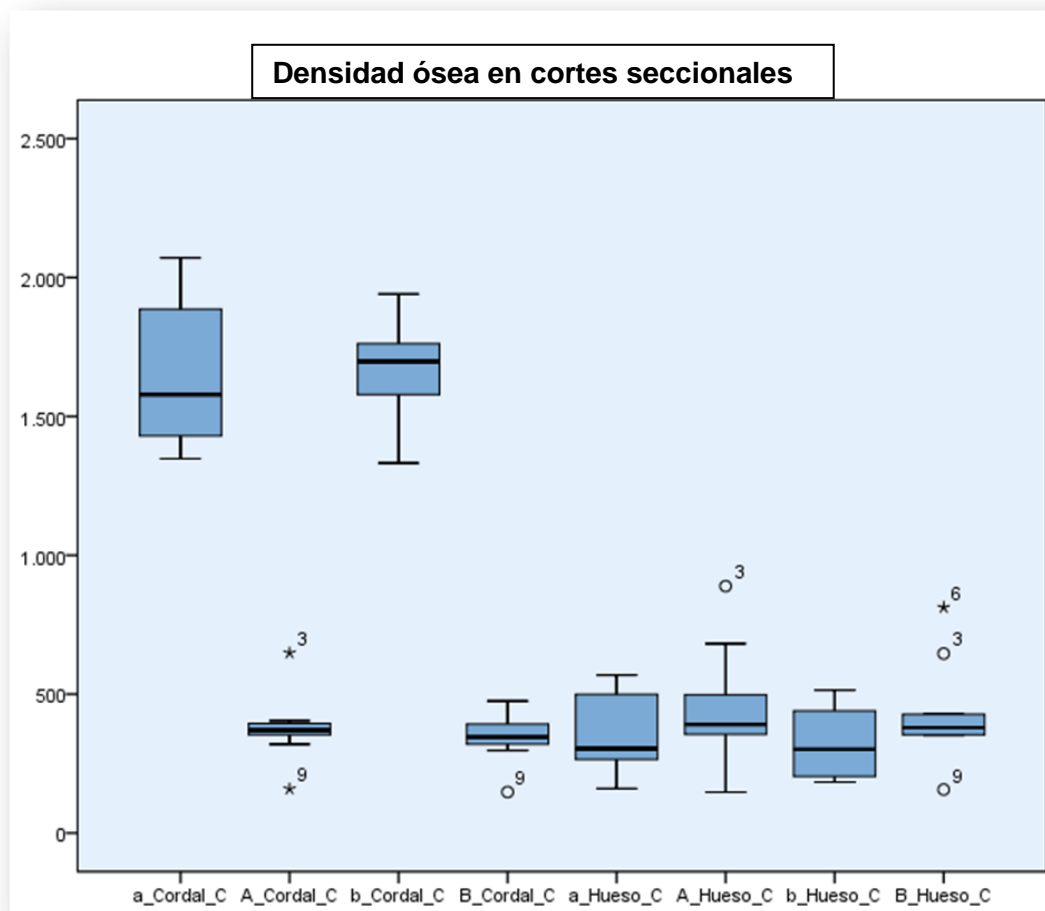


Figura 4. Densidad ósea cortes seccionales (UH)



ANEXO I

HOJA DE INFORMACIÓN PARA LOS POSIBLES PARTICIPANTES (RD 561/93)

Objetivo:

El Proyecto de Investigación "Efecto de la melatonina aplicada localmente en el interior de alveolos post-extracción de terceros molares retenidos. Estudio piloto" pretende proporcionar una alternativa efectiva en el tratamiento inmediato de la inflamación y el dolor producidos por la extracción de los terceros molares a partir de la medición de parámetros bioquímicos obtenidos de las muestras de sangre. Además se pretende demostrar su utilidad en la regeneración ósea temprana, obteniendo un hueso de volumen y densidad adecuados en un periodo de tiempo más breve mediante la comparación digitalizada de las imágenes obtenidas por escáner.

Metodología empleada:

Estudio de ensayo clínico aleatorizado en fase IV con análisis de variables biológicas. La medición de determinadas moléculas indicadoras de dolor e inflamación en sangre mediante técnicas bioquímicas de enzimoimmunoanálisis y la medición de volumen y densidad ósea mediante un sistema informático de recuento de Unidades Hounsfield obtenidas en una imagen de escáner digital, comparando las medidas con las obtenidas del lado control.

Beneficios esperados para el paciente o la sociedad:

El beneficio es la obtención de una sustancia natural que pueda ser empleada en la misma sesión quirúrgica para reducir la inflamación y el dolor desde los momentos iniciales, además de favorecer la formación de un hueso adecuado y suficiente en menor tiempo.

Incomodidades y riesgos derivados del estudio:

Será necesaria la extracción sanguínea de dos tubos de hasta 4 ml de cada alveolo, de modo que se extraerá un tubo de cada lado inmediatamente antes de la cirugía y otro tubo de cada lado a los 60 min de la cirugía.

Se requerirán también dos imágenes de escáner digital, obtenidas en dos visitas. La primera se realizará tras la extracción de los cordales, el mismo día de la intervención. La segunda se realizará a los 60 días en la revisión del proceso de curación.

La única incomodidad es la propia de acudir a la revisión, puesto que la punción para la extracción sanguínea se realizará una vez el paciente se encuentre bajo el efecto de la anestesia.

Posibles acontecimientos adversos:

Los únicos efectos adversos son los propios del acto quirúrgico de extracción de terceros molares.

La participación es de carácter voluntario, y puede retirarse del estudio en cualquier momento sin que por ello se altere la relación médico-enfermo ni se produzca perjuicio en su tratamiento.

Protección de datos:

Accederán a sus datos personales, previo consentimiento suyo, los profesionales sanitarios que procedan a la exodoncia quirúrgica de los cordales y a la extracción de la sangre en el Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial) de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid coordinados por el Dr. Carlos Cobo. Los datos recogidos en la Historia Clínica así como los resultados del estudio de las muestras de sangre y las imágenes de escáner serán separados de su identidad personal, asignando un mismo código a la Historia Clínica y a los resultados del estudio, de forma que no será posible asociarlos por el personal investigador ajeno al Departamento de Estomatología III (Cirugía y Medicina Bucofacial) de la Facultad de Odontología salvo expresa autorización.

Modo de compensación económica y tratamiento en caso de daño o lesión por su participación en el ensayo, tal como consta en la Ley del Medicamento:

No existe compensación económica.

Investigador responsable del Proyecto de Investigación y de informar al sujeto y contestar a sus dudas y preguntas, y modo de contactar con él en caso de urgencia:

El investigador responsable del Proyecto de Investigación es el Dr. Carlos Cobo Vázquez, de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. En el Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial), el investigador coordinador es el Dr. Juan López-Quiles Martínez, cuyo teléfono de contacto es el 91 394 1964.

ANEXO II

CONSENTIMIENTOS INFORMADOR PARA LOS POSIBLES PARTICIPANTES

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

D./ Dña....., de años de edad y con DNI nº....., manifiesta que ha sido informado/a por..... sobre los beneficios que podría suponer la extracción de dos muestras de un volumen máximo de 4 ml de mi sangre de cada lado para cubrir los objetivos del Proyecto de Investigación titulado **"EFECTO DE LA MELATONINA APLICADA LOCALMENTE EN EL INTERIOR DE ALVEOLOS POST-EXTRACCIÓN DE TERCEROS MOLARES RETENIDOS. ESTUDIO PILOTO"**, realizado por investigadores del Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial) de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. La finalidad de este estudio es obtener una alternativa efectiva en el tratamiento inmediato de la inflamación y el dolor producidos por la extracción de los terceros molares con utilidad en la regeneración ósea temprana, obteniendo un hueso de volumen y densidad adecuados en un periodo de tiempo más breve.

He sido informado/a de los posibles perjuicios que la extracción de cuatro muestras de hasta 4 ml de sangre puede tener sobre mi bienestar y salud, que son los atribuibles a una extracción habitual.

He sido también informado/a de que mis datos personales serán protegidos de acuerdo con lo que dispone la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Las muestras serán anonimizadas y los datos clínicos necesarios me serán preguntados en el momento de la extracción y autorizo que sean consultados en mi Historia Clínica por el Médico del Equipo Investigador del Centro de Salud. Sólo se accederá a la parte de la Historia clínica cuyos datos sean relevantes para el estudio, y en cualquier caso, los Médicos del Equipo Investigador se comprometen a guardar la más estricta confidencialidad.

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a que esta extracción tenga lugar y sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

Madrid, a de de 2013.

Fdo. D/Dña
(paciente)

Fdo. D/ Dña
(Tutor, en el caso de Incapacidad)

Facultativo

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

D./ Dña....., de años de edad y con DNI nº....., manifiesta que ha sido informado/a por..... sobre los beneficios que podría suponer la realización de dos escáners digitales para cubrir los objetivos del Proyecto de Investigación titulado **"EFECTO DE LA MELATONINA APLICADA LOCALMENTE EN EL INTERIOR DE ALVEOLOS POST-EXTRACCIÓN DE TERCEROS MOLARES RETENIDOS. ESTUDIO PILOTO"**, realizado por investigadores del Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial) de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. La finalidad de este estudio es obtener una alternativa efectiva en el tratamiento inmediato de la inflamación y el dolor producidos por la extracción de los terceros molares con utilidad en la regeneración ósea temprana, obteniendo un hueso de volumen y densidad adecuados en un periodo de tiempo más breve.

He sido informado/a de los posibles perjuicios que realización de dos escáners digitales puede tener sobre mi bienestar y salud, que son los atribuibles a una exploración habitual.

He sido también informado/a de que mis datos personales serán protegidos de acuerdo con lo que dispone la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Las imágenes serán anonimizadas y los datos clínicos necesarios me serán preguntados en el momento de la extracción y autorizo que sean consultados en mi Historia Clínica por el Médico del Equipo Investigador del Centro de Salud. Sólo se accederá a la parte de la Historia clínica cuyos datos sean relevantes para el estudio, y en cualquier caso, los Médicos del Equipo Investigador se comprometen a guardar la más estricta confidencialidad.

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a que esta prueba tenga lugar y sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

Madrid, a de de 2013.

Fdo. D/Dña
(paciente)

Fdo. D/ Dña
(Tutor, en el caso de Incapacidad)

Facultativo

