

TÁRIK OCON BRAGA POLO

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO NA
INTERFACE OSSO/IMPLANTE EM RATOS
PINEALECTOMIZADOS – ANÁLISE
HISTOLÓGICA, IMUNOISTOQUÍMICA,
HISTOMÉTRICA, BIOMECÂNICA E POR
MICROCT**

Araçatuba – SP

2016

TÁRIK OCON BRAGA POLO

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO NA
INTERFACE OSSO/IMPLANTE EM RATOS
PINEALECTOMIZADOS – ANÁLISE
HISTOLÓGICA, IMUNOISTOQUIMICA,
HISTOMÉTRICA, BIOMECÂNICA E POR
MICROCT**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial)

Orientadora: Prof^a. Ass. Dr^a. Roberta Okamoto

Coorientadora: Prof^a. Ass. Dr^a. Dóris Hissako Sumida

Araçatuba – SP

2016

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P778a

Polo, Tárík Ocon Braga.

Avaliação do reparo ósseo na interface osso/ implante em ratos pinealectomizados : análise histológica, imunoistoquímica, histométrica, biomecânica e por microct / Tárík Ocon Braga Polo. - Araçatuba, 2016
63 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Roberta Okamoto

Coorientadora: Profa. Dóris Hissako Sumida

1. Melatonina 2. Glândula pineal 3. Implantes dentários
4. Transtornos cronobiológicos 5. Transtornos do sono do ritmo circadiano I. T.

Black D7
CDD 617.64

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Eu dedico esta conquista aos amores da minha vida, aos meus alicerces como pessoa e homem. Aqueles que fundamentam a minha história: **a minha família.**

Ao meu papai (José Wilson Polo), meu herói, um homem especial, um exemplo de vida a ser seguido. O senhor nos ensinou as maiores dádivas deste mundo: a honestidade e o amor a Deus sobre todas as coisas. Sempre defendeu a seus filhos com muito amor e dedicação. Se hoje eu possuo dignidade e conheço o caminho da verdade é devido ao seu exemplo. Eu te amo meu pai e te amarei por toda a minha vida, com todas as minhas forças.

À minha mamãe (**Silvana Montanari Ocon Braga Polo**), pela educação, o amor e o carinho que sempre dedicou a mim. A senhora é sinônimo de bondade e amor ao próximo. Tudo o que eu disser neste momento ou por toda a minha vida, não retribui o que tens feito por mim. Eu te amo incondicionalmente mãe.

À minha irmã (**Renata Ocon Braga Polo**), que sempre esteve próxima e que participa das minhas conquistas. Você é muito mais que uma irmã, é minha amiga e uma referência. Sou grato por tê-la comigo. Deus abençoe tudo o que você se propor a fazer e que a paz, o amor estejam sempre com você, com o Mateus e com o Bernardo. Te amo minha irmã querida.

À minha noiva (**Mariane Machado Curbete**), que é a minha companheira de todas as horas, que esteve nos melhores e nos piores momentos também. Você é o meu equilíbrio, o meu norte, a minha alegria e a minha maior força. Peço a Deus que ilumine nosso relacionamento para que a alegria e felicidade nos acompanhem pra sempre e que nunca nos falte à luz. Eu te amo incondicionalmente.



AGRADECIMENTOS

ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, que com certeza me iluminou e permitiu que eu pudesse crescer. Foi com grande dificuldade que caminhei até aqui, a luta não é fácil, e só Deus sabe verdadeiramente as dificuldades que cada um enfrenta em seus caminhos. Foi Deus que me deu bons amigos, boas escolhas, força para aguentar os momentos difíceis e coragem para continuar em frente sempre. Obrigado senhor por me iluminar tanto assim, sem sua ajuda sempre, não daria sequer um passo a diante.

À minha orientadora, Profa. Ass. Dra. Roberta Okamoto. Com certeza, o maior presente que tive na pós-graduação foi poder trabalhar com a senhora. A senhora proporcionou oportunidades que me levaram ao crescimento. Sou eternamente grato primeiramente pela oportunidade da convivência com a senhora, além do privilégio de aprender dia-a-dia, na pesquisa, no trabalho em equipe, ou no meu crescimento enquanto pessoa. Nunca vou me esquecer da sua compreensão e ajuda constante. Deus abençoe a senhora sempre. Receba minha gratidão eterna!

Ao Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior. Definitivamente, ser Mestre é o seu dom. Mestre, no maior significado da palavra. Serenidade, humildade e paciência são características marcantes que o faz um ser humano especial. Aprendo com o senhor sempre. Muito obrigado por confiar em mim e nunca se esqueça de que a sua presença é fundamental para nós. Por toda a minha vida serei grato pela oportunidade que o senhor me deu de convivência e aprendizado, desde a graduação até a defesa. Meu muito obrigado e receba meu carinho!

À minha coorientadora, Profa. Ass. Dra. Dóris Hissako Sumida. Agradeço imensamente pela confiança e paciência comigo ao me coorientar e por contribuir

diretamente para execução deste trabalho. Por me proporcionar aprendizado e partilhar do privilégio da sua convivência. Você é um exemplo de competência, garra e coragem. Obrigado por tudo e que Deus o abençoe!

Ao Professor Leonardo Perez Faverani, por sua disponibilidade e comprometimento integral em ajudar nesta pesquisa e em todos os momentos desde o começo da minha vida acadêmica desde quando aluno de iniciação científica. E especialmente, por seu respeito e carinho no trato com os alunos. Mesmo tão ocupado sempre me atendeu prontamente. Léo saiba que lhe tenho com profundo carinho, respeito, admiração e amizade. Que Deus o ilumine sempre, para que continue essa pessoa admirável.

Ao professor Ronaldo C. Mariano, por aceitar com prontidão o convite para participar da banca examinadora. Agradeço de coração a atenção e disponibilidade.

Aos Professores da Disciplina da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial Dr. Osvaldo Magro Filho, Michel Saad Neto, Alessandra Marcondes Aranega, Daniela Ponzoni, Ana Paula Farnezi Bassi, Francisley Ávila Campos e ao ilustríssimo Professor Tetuo Okamoto (*in memoriam*), pelo carinho, coleguismo, auxílio, exemplo e amizade desfrutada em nosso departamento. Recebam o meu carinho e admiração.

Ao Diretor e Professor Wilson Roberto Poi, pelo maior exemplo do “Ser Professor”. Muito obrigado por fazer parte da minha formação e me fazer descobrir o professor que está em mim, suas aulas são inspiradoras.

Aos professores da Disciplina de Clínica Integrada (Sônia Regina Panzarini Barioni, Denise Pedrini e Celso Sonoda), por serem os maiores exemplos de professores. Pela disposição e empenho com o crescimento da nossa faculdade. Pelo

cuidado no trato com os alunos da graduação e da pós-graduação. Vocês são mestres por excelência. Recebam minha eterna gratidão, carinho e admiração neste momento.

Ao “Andrezinho” (André Luis da Silva Fabris). Por ser um amigo indescritível. Em todos os momentos dessa fase pude contar com você. Seja na faculdade ou fora dela. Agradeço a você e desejo muitas alegrias para você e seus familiares!

À “Sassá” (Sabrina Ferreira), pelo imenso carinho e respeito que existe entre nós. Você assim fez diferença na minha graduação e na minha pós-graduação, sempre companheira, sempre solicita e com grande amizade em todos os momentos só contribuiu com o meu bem estar. Agradeço a Deus por ter conhecido você. Você é um exemplo de profissional, aluna de pós-graduação e amiga. Deus a abençoe e que a sua vida! Jamais quero perder contato com você!!

Ao “Bill” (Willian Ricardo Pires), pela amizade, parceria e alegria que você irradia. Receba meu carinho!

Ao “Cris” (Cristian Statkievicz), pela amizade, companheirismo e pelos momentos de alegria que dividimos. Receba meu carinho!

Aos alunos da graduação e iniciação científica, pela oportunidade em compartilharmos informações, aprendizado, brincadeiras, e muito trabalho. Sem vocês tudo seria mais difícil e chato. Vocês representam a continuidade do caminho aberto!

Quando vejo o interesse de vocês no que fazemos, tudo ganha mais sentido!

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado durante os primeiros meses do curso. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro e com isso, permitir que fosse possível a realização do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo 2014/11920-6), indispensável para a realização deste estudo e minha sobrevivência na pós-graduação.

Ao Laboratório de caracterização e avaliação de resposta biológica, na pessoa do Prof. Dr. Élcio Marcantônio Júnior, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pela facilitação das microtomografias computadorizadas e da utilização do EXAKT para cortes de peças calcificadas.

Ao Prof./Pesq. Alexandre Freire e a Prof^a. Dr^a Ana Claudia Rossi Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP- UNICAMP, por nos auxiliar com as análises de MicroCT.



AGRADECIMENTOS



AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do diretor **Prof. Titular Wilson Roberto Poi** pela oportunidade de realização dos cursos de Graduação, Mestrado. A cada dia admiro mais esta universidade, pela união e grande esforço para que a tríade fundamental da instituição representada pelo ensino, pesquisa e extensão universitária seja o maior lema desta casa. Agradeço de coração por permitir que estes sonhos se concretizem em minha vida.

À Profa. Adj. Maria José Hitomi Nagata, pela competência e afinho em que conduziu da nossa pós-graduação. Estendo os meus sinceros agradecimentos ao vice-coordenador, o **Prof. Adj. Celso Koogi Sonoda**, um exemplo de professor e ser humano. Aprendo muito com a sua serenidade e humildade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” com o atual Coordenador **Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso**.

Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP pela disponibilidade e paciência em todas as etapas do doutorado. Pelo trabalho honesto e sempre ágil.

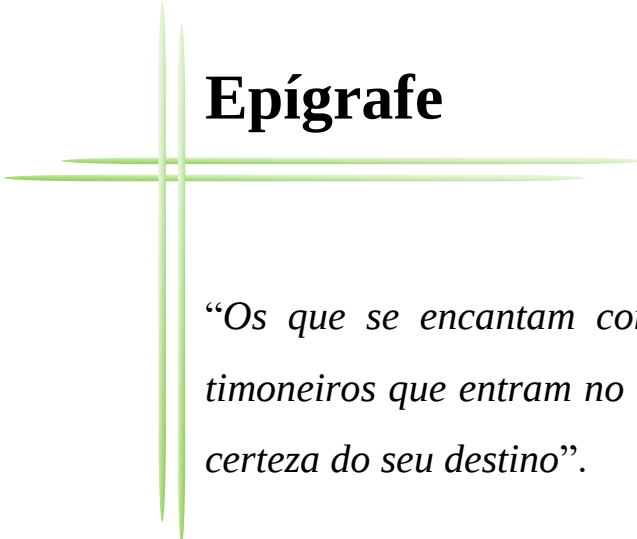
Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pela prontidão em nos atender e carinho.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada (Dirce, Gilmar, Odair, Tina, Paulo Gratão, Renato, Joilson e Marco). Muito obrigado pelo carinho e respeito.

Aos colegas da pós-graduação da área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (Gustavo Momesso, Pedro Henrique, Igor Putini, João Paulo, Éric Neiva, Carulina, Juliana Zorzi, Júlio César, Rafael); e da Implantodontia (Carol, Geraldo Griza, Maria del Pilar, Giovana Francisconi, Juceleia Maciel e Rodrigo Pereira). Aprendi muito a cada momento com cada um de vocês. Obrigado pelo auxílio constante na minha vida e na pós-graduação.

Aos pacientes, pela credibilidade e confiança depositadas a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as habilidades cirúrgicas e, como sempre estaremos em nossas vidas, aprendendo constantemente. Minha eterna gratidão.





Epígrafe

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

(Leonardo da Vinci)





LISTAS

Lista de Figuras

- Figura 1** Sequência cirúrgica para pinealectomia: **(a)** Após a tricotomia e antisepsia da região a ser acessada para a realização do procedimento cirúrgico de pinealectomia, foi utilizado um aparelho estereotáxico para estabilizar a cabeça do rato, **(b)** Foi realizada uma incisão longitudinal com cerca de 2cm sobre a sutura sagital, **(c)** deslocamento do retalho e pericrânio para exposição da região do lambda (intersecção das suturas sagital e lambdoide), **(d)** Foi realizada uma osteotomia com uma trefina de 4,5mm na região, **(e)** para obtenção de acesso direto a glândula Pineal abaixo do seio venoso da dura-máter, **(f)** Foi removida a porção óssea trefinada da região lambdoide e foi mantida em solução salina até o momento do seu reposicionamento, **(g)** a glândula Pineal foi removida e identificada por animal, **(h)** Foi reposicionada a porção óssea que havia sido removida. 48
- Figura 2** Sequência cirúrgica para instalação do implante na tíbia: **(a)** tricotomia da região anterolateral da tíbia, **(b)** antisepsia com PVPI degermante, **(c)** incisão de aproximadamente 3 cm de comprimento na região de metáfise tibial esquerda e direita, **(d)** o musculo gastrocnêmico e o periósteo foi descolado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para receber os implantes com o auxílio de uma fresa lança acoplada a um contra-ângulo de implante conectado a um motor elétrico, foi realizada loja cirúrgica sob irrigação abundante com soro fisiológico, **(e)** loja cirúrgica criada foi realizada com fresa start de 1,4mm de diâmetro, **(f)** instalação do implante com auxílio de uma chave digital quadrada, **(g)** Sutura por planos com fio de Vycril 4-0, **(h)** sutura com pontos simples interrompidos em pele com fio de nylon 4-0. 49
- Figura 3** **(a)** Administração por via oral um volume de 0,2 ml de melatonina na proporção de 5mg/kg para o grupo PNXm. **(b)** No grupo PNX, foi administrado por via oral um volume de 0,2ml de solução salina. 49
- Figura 4** Demarcação da ROI no software CTAnalyzer. O quadro vermelho mostra uma aproximação para melhor visualização da área retangular correspondendo aos vales entre a 3ª e a 5ª rosca do implante. 50
- Figura 5** Conversão das imagens em escala de cinza. A imagem mostra a ROI após a conversão em escalas de cinza com os intervalos de valores correspondentes ao osso esponjoso. As áreas em branco correspondem à estrutura óssea. 50
- Figura 6** Cortes histológicos pela técnica de inclusão em resina do sistema exakt na coloração de Azul de Stevenel e vermelho de alizarina. (CO) Grupo Control, (PNX) Grupo pinealectomizado e (PNXm) Grupo pinealectomizados tratado com melatonina. 51
- Figura 7** Cortes histológicos pela técnica de inclusão em parafina com imunomarcação para (TRAP).(100x) 51
- Figura 8** Cortes histológicos pela técnica de inclusão em parafina com imunomarcação para (OPG) (100x) 51
-

Figura 9	Cortes histológicos pela técnica de inclusão em parafina com imunomarcção para (RANK-L) (100x).	52
Figura 10	Cortes histológicos pela técnica de inclusão em parafina com imunomarcção para (OC).(100x)	52
Figura 11	Na análise Biomecânica os dados passaram no teste de normalidade (Shapiro-Wilk) ($P = 0.266$), após passar pelo pós-teste de Tukey, as comparações entre os grupos só não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos PNx e PNxm com ($P = 0.500$). Na comparação dos grupos CONTR com PNxm e CONTR com PNx os resultados foram significativos com ($P < 0.050$).	52
Figura 12	a) Na análise de ELCOI houve diferença na comparação dos grupos com PNxm ($P = 0.001$ / Tukey test); b) Na análise de AON, não houve diferença estatisticamente significativa ($P = 0,716$ Kruskal-Wallis).	53
Figura 13	Parâmetros para análise microtomográfica (a) BV.TV $p = 0,933$; (b) Tr.N $p = 0,933$; (c) Tb.Th $p = 0,933$; (d) Tb.Sp $p = 0,200$. Não houve diferença estatística.	53

Lista de tabelas

TABELA 1	Organograma de grupos experimentais e análises onde cada tíbia foi considerada uma unidade amostral, como exemplificado no quadro	46
TABELA 2	Análise estatística da histometria de Extensão linear de Contato Osso Implante (ELCOI)	47
TABELA 3	Escores atribuídos à análise imunoistoquímica:	47
TABELA 4	Dados submetidos à análise estatística para análise biomecânica de contra torque:	47

Lista de Abreviaturas

CO	=	Controle
PNX	=	Pinelectomia
PNXm	=	Pinelectomia Tratado com melatonina
ROI	=	Região de interesse do objeto
mg/kg	=	Miligrama por quilograma
p.c.	=	Peso Corpóreo
i.m	=	Intra-Muscular
UI	=	Unidades Internacionais
mL	=	Mili-Litros
mm	=	Milímetros
µm	=	Micrometros
p	=	unidade de relevância estatística
N/cm	=	Newtons por centímetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 1º Tempo cirúrgico (pinelectomia):	24
3.2 2º Tempo cirúrgico (instalação de implantes):	25
3.3 Tratamento com melatonina	27
3.4 Eutanásia.....	27
3.5 Análises.....	27
3.5.1 Grupo A: Tíbias Descalcificadas	27
3.5.2 Grupo B: Tíbias calcificadas	29
3.5.3 Grupo C	31
3.5.4 Grupo D	31
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Análise Histológica	33
4.2 Análise Imunistoquímica	33
4.3 Análise Biomecânica	34
4.4 Análises Histométrica.....	34
4.5 Análise Microtomográfica	35
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	40



Avaliação do reparo ósseo na interface osso/implante em ratos pinealectomizados – análise histológica, histométrica, imunoistoquímica, biomecânica e por microCT

**Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico Journal of Pineal Research*



Polo, T.O.B. Avaliação do reparo ósseo na interface osso/implante em ratos pinealectomizados – análise histológica, imunoistoquímica, histométrica, biomecânica e por microct. ARAÇATUBA: UNESP – Univ. Estadual Paulista. 2016

RESUMO: O presente estudo teve como objetivo investigar a interface osso / implante em ratos pinealectomizados tratados com melatonina. Métodos: 30 ratos, machos, adultos foram divididos em 3 grupos: controle (CO), pinealectomizados (PNX) e pinealectomizado com melatonina (PNXm). Após 30 dias da Pinealectomia, um implante foi instalado em cada tíbia e a eutanásia foi realizada aos 42 dias. As amostras foram submetidas a histomorfométrica (ELCOI e AON), biomecânica (de torque reverso), microtomografia e análise imunoistoquímica. Os dados quantitativos foram submetidos à análise estatística ($P < 0,05$). Para os resultados histométricos, valores ELCOI para PNX foram menores quando comparados com PNXm ($P = 0,0393$), enquanto AON não mostrou diferença entre os grupos ($P = 0,761$). Os valores de torque reverso não mostraram diferença entre os grupos PNX e PNXm ($P = 0,5000$), e as interações CO vs PNXm, e CO vs PNX mostraram diferença significativa ($P < 0,05$). Os parâmetros volumétricas BV/TV ($P = 0,933$); Tr.N ($P = 0,933$); Tb.Th ($P = 0,933$), Tb.Sp ($P = 0,200$) não apresentaram diferença estatística. A imunomarcagem para OPG, RANKL, TRAP e osteocalcina mostrou similaridade entre os grupos, apesar da PNXm parece assemelhar-se às condições fisiológicas (CO). Portanto, a melatonina melhorou a remodelação óssea na região peri-implante em ratos pinealectomizados.

Palavras Chave: Melatonina, Glândula Pineal, Implantes Dentários, Tíbia, Transtornos Cronobiológicos e Transtornos do Sono do Ritmo Circadiano.

Polo, T.O.B. Bone repair evaluation in bone/implant interface in pinealectomized rats - Histological, immunohistochemistry, histometric, biomechanics and microCT analysis. ARACATUBA: UNESP – Univ. Estadual Paulista. 2016

ABSTRACT: This study aimed to investigate the interface bone/implant in pinealectomized rats treated with melatonin. 30 rats, male, adults were divided into 3 groups: control (CO), pinealectomized (PNX) and pinealectomized with melatonin (PNXm). After 30 days of the pinealectomy, one implant was installed on each tibia and euthanasia was performed at 42 days. The samples were submitted to histometric (BIC and NB), biomechanical (reverse torque), microtomography and immunohistochemical analysis. The quantitative data were subjected to statistical analysis ($P < 0.05$). For the histometric results, BIC values to PNX were lower when compared to PNXm ($P = 0.0393$), whereas NB did not showed difference among the groups ($P = 0.761$). Reverse torque did not show difference between the groups PNX and PNXm ($P = 0.5000$), and the interactions CO vs PNXm, and CO vs PNX showed significantly difference ($P < 0.05$). The volumetric parameters BV/TV ($P = 0.933$); Tr.N ($P = 0.933$); Tb.Th ($P = 0.933$), Tb.Sp ($P = 0.200$) did not present statistical difference. The immunolabeling for OPG, RANKL, TRAP and osteocalcin showed similarity among the groups, despite the PNXm it seems to resemble to physiological conditions (CO). Therefore, melatonin improved the bone turnover in peri-implant region in pinealectomized rats.

Keywords: Melatonin, Pineal Gland, Dental Implants, Tibia, Circadian Changes, Chronobiology and disorders of circadian sleeping rhythm.

1 INTRODUÇÃO

A síntese de melatonina é estimulada primariamente através da escuridão e inibida pela luz [1]. Os efeitos benéficos da melatonina sobre a saúde do osso foram confirmados por vários estudos *in vivo* e *in vitro* [2,3], em que a melatonina também se mostra capaz de realizar ligações com proteínas citossólicas, incluindo quinase C, calmodulina, calreticulina [4,5] e à quinona redutase-2 [6]. Tendo em vista estes resultados, a melatonina não é um hormônio clássico, mas funciona como um protetor das células e também como um antioxidante [7]. Além disso, várias organelas, incluindo o núcleo e as mitocôndrias podem acumular melatonina [8].

Por causa de suas propriedades antioxidantes, a melatonina e sua capacidade de desintoxicar os radicais livres [9,10], pode interferir na função dos osteoclastos [11]. A inibição da reabsorção óssea pode ser reforçada por uma reação de indolamina na osteoclastogênese. A melatonina age nos osteoclastos, células ósseas multinucleadas envolvidas na reabsorção da matriz óssea em todas as diferentes formas, uma das quais é através da formação de radicais livres [12]. Após pinealectomia, foram reportadas diminuições da densidade óssea e de outros parâmetros estruturais [13,14]. Neste contexto, é importante notar que, em humanos, a produção de melatonina diminui com a idade [15].

Ostrowska *et al.* (2003) [16], sugeriram que em ratos a pinealectomia influenciava significativamente o ciclo circadiano do metabolismo ósseo. E que um possível mecanismo para tal relação deveria envolver o hormônio calcitotrófico, IGF-I, corticoesteróides e as concentrações de T3. O IGF-1 (Insulin-like growth factor) secretado pelas plaquetas estimula a proliferação de células osteoprogenitoras, aumentando o número de células capazes de sintetizar matriz óssea. Em ratos

pinealectomizados, os níveis de IGF-I estavam substancialmente diminuídos durante todo o 24º dia, fato este que justificou a escolha do período de 30 dias após a pinealectomia para a instalação dos implantes nesta pesquisa.

Não há nenhuma evidência do desenvolvimento de tolerância com a utilização de melatonina [17,18]. Isto está em contraste com outros hipnóticos normalmente utilizados para o tratamento dos transtornos do sono, tais como as benzodiazepinas [19]. Uma revisão sistemática com meta-análise mostrou que a dose de melatonina habitual de 5mg ou a duração do tratamento, apresentou efeitos constantes no julgamento sobre a qualidade do sono. [20]

Dessa forma, como amplamente revisto, a melatonina interfere no reparo ósseo de diversas formas, por meio da modulação de processos inflamatórios, formação de fibrilas colágenas, tempo de diferenciação dos osteoblastos e estresse oxidativo [11,12,21,22,23]. Assim, a ausência da melatonina ou a sua produção em níveis abaixo do fisiológico, remetem a condição na qual se encontra os trabalhadores noturnos, pessoas que passam por alterações de fuso-horário, insônia e estresse. [1]

Neste sentido, questiona-se se nessas condições ocorre algum prejuízo no metabolismo ósseo e quais as características envolvidas nas vias biológicas do tecido ósseo ao redor de implantes osseointegráveis. Atualmente, com o aumento da expectativa de vida dos indivíduos, bem como pela popularização dos implantes dentários, o entendimento das características estruturais e a reversão das alterações patofisiológicas do osso peri-implantar, é fundamental para aumentar a previsibilidade de sucesso do tratamento reabilitador.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho investigou as alterações celulares e possíveis complicações que possam ocorrer junto a esta interface (osso/implante) em ratos pinealectomizados. A hipótese do presente estudo é que o reparo ósseo periimplantar dos ratos pinealectomizados será diferente do grupo controle e que esta alteração poderia ser regulada pela reposição hormonal de melatonina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste projeto, foi utilizado um total de 30 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos, os quais foram divididos em três grupos: controle (CO), pinealectomizados sem melatonina (PNX), e pinealectomizados com melatonina (PNXm), os animais foram submetidos ao 1º tempo cirúrgico (pinealectomia). Foram eutanasiados aos 42 dias contados após o 2º tempo cirúrgico (instalação de implantes em ambas as tíbias). Estes animais foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração e água *ad libitum* no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba– UNESP.

- Grupo Controle – (CO) somente sem remoção da glândula Pineal (n=10);
- Grupo Pinealectomia (PNX) – remoção da glândula Pineal (n=10);
- Grupo Pinealectomia com Melatonina (PNXm) – remoção da glândula Pineal e ministração de Melatonina (n=10).

3.1 1º Tempo cirúrgico (pinealectomia):

Neste momento os ratos dos grupos PNX e PNXm foram anestesiados com cloridrato de quetamina (80mg/kg p.c., i.m.) e xilazina (10mg/kg p.c., i.m.) adaptados a

um aparelho estereotático. Com auxílio de duas barras auriculares, a cabeça de cada animal foi colocada em posição fixa (Fig. 1a). Após a remoção do pelo sobre o escalpo e assepsia da pele da cabeça com solução de álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal e o tecido subcutâneo foi afastado para a visualização da região do lambda (Fig. 1b), foi feita a raspagem das articulações fibrosas (tipo serrata) entre os ossos parietais e o osso interparietais expostos (Fig 1c).

Nesta região foi realizada uma osteotomia de 4,5 mm de diâmetro da calvária (com uma broca tipo “trefina” acoplada a um motor de baixa rotação)(Fig 1d). Após a retirada deste fragmento de osso, o seio venoso (região de intersecção do seio venoso sagital e transversal) foi visualizado (Fig. 1e) e com uma pinça será retirada a glândula pineal, que se localiza logo abaixo deste seio (Fig 1g). Após a retirada desta glândula, o fragmento de osso retirado (Fig. 1f) foi recolocado na sua posição inicial (Fig 1h), sendo o animal retirado do aparelho estereotático. Após a hemostasia, a pele foi suturada com fio de seda 4-0. Como medida profilática após a cirurgia foi injetado 0,2 mL de um antibiótico veterinário (associação de penicilina com estreptomicina 1.200.000 UI) por via intramuscular. Após a cirurgia, os ratos foram mantidos nas condições acima citadas.

3.2 2º Tempo cirúrgico (instalação de implantes):

Neste momento, após contados os trinta dias pós pinealectomia, os animais foram mantidos em jejum durante oito horas prévias ao procedimento cirúrgico e sedados pela combinação de 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e cloridrato

de mepivacaína (0.3 mL/Kg, Scandicaíne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório.

Após a sedação dos animais foi realizada tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda (Fig. 2a), anti-sepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto) (Fig. 2b). Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) cada tíbia teve realizada uma incisão de aproximadamente 2 cm de comprimento na região de metáfise tibial externa (Fig. 2c) e a seguir, o tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso que recebeu o implante (Fig 2d-f).

Foram instalados 60 implantes de titânio com superfície tratada (Implalife® Sistemas de Prótese Ltda, São Paulo, SP, Brasil), com diâmetro de 1,6 mm e altura de 3,0 mm, esterilizados por raios gama. Estes implantes apresentavam o módulo de rebordo quadrado. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa de 1,4mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 16:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany) e profundidade de 3,0 mm (Fig. 2f).

Cada animal recebeu 2 implantes, com travamento e estabilidade inicial, sendo 1 em cada metáfise tibial (Fig. 2a).

Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos por planos (Fig. 2g,h).

No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 mL de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) (Figura 11). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*.

3.3 Tratamento com melatonina

No grupo CO, os ratos não receberam melatonina exógena.

No Grupo PNX, os ratos pinealectomizados não receberam melatonina exógena, os espécimes receberam o veículo no qual a melatonina é diluída. (Fig. 3b)

No Grupo PNXm, os ratos receberam melatonina através de gavagem (dose 5mg/kg). (Fig. 3a) [25]

3.4 Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 42 dias pós-operatórios por meio de dose excessiva de anestésico.

3.5 Análises

3.5.1 Grupo A: Tíbias Descalcificadas

Seis tíbias de cada grupo experimental (CO, PNX, PNXm) foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 5 semanas, desidratadas em sequência de

álcoois e diafanizadas. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente e receberam cortes de 6 µm de espessura e foram montadas em lâminas histológicas.

Previamente a realização das análises histológica e imunoistoquímicas, as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conhecia a qual grupo pertenciam.

3.5.1.1 Análise Histológica

Aos 42 dias pós-operatórios, a região periimplantar das tíbias foi analisada em cortes histológicos para peças calcificadas incluídas em resina, as lâminas confeccionadas foram coradas por vermelho de Alizarina e azul de Stevenel.

3.5.1.2 Análise Imunoistoquímica

A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários a serem utilizados foram contra fosfatase ácido tartarato resistente (TRAP), osteoprotegerina (OPG), RANKL, osteocalcina (OC) (Santa Cruz Biotechnology), com o objetivo de se analisar as respostas celulares quanto ao processo de reabsorção óssea (TRAP), remodelação (OPG e RANKL) e mineralização (osteocalcina).

Foram realizados experimentos de imunoistoquímica utilizando como método de detecção a imunoperoxidase. Foi utilizado o anticorpo secundário biotinilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o amplificador foi a Streptavidina e Biotina (Dako) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão das proteínas semi-quantitativamente pela

atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo alveolar. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), por meio de escores que categorizam a extensão da área com marcação positiva para cada proteína estudada. Assim, os escores utilizados foram: marcação leve (++), marcação moderada (+++) e marcação intensa (++++), sendo consideradas positivas as marcações com diaminobenzidina, tomando-se o cuidado de se realizar controles negativos para avaliar a especificidade dos anticorpos.

Os escores referentes à intensidade de imunomarcação de acordo com trabalhos previamente publicados [26,27].

3.5.2 Grupo B: Tíbias calcificadas

3.5.2.1 Análise Histométrica

Os parâmetros histométricos seguiram os padrões determinados pelos *guidelines* publicados pela Sociedade Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado (ASBMR)[28].

As tíbias esquerdas dos animais dos 3 grupos experimentais (Controle, PNx, PNxm) foram reduzidas e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos[®], Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas e banhadas em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças passaram pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois 70, 90 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 5 dias, em agitador orbital (KLine CT – 150[®], Cientec - Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) todos os dias durante 4 horas.

Ao término da desidratação, as peças foram imersas em mistura de álcool 100 e resina fotopolimerizável Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) em diferentes concentrações, até a utilização apenas da resina como meio de imersão. As peças foram incluídas na resina Technovit, que foi fotopolimerizada e passaram pelo protocolo para processamento do Exakt (Figura 18).

O corte e o desgaste das peças foram realizados no plano méso-distal utilizando um sistema de corte (Exakt® Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha) até a obtenção de secção de aproximadamente 80 µm de espessura. Como corantes foram utilizados o vermelho de alizarina e o azul de Stevenel. As imagens obtidas foram capturadas pelo mesmo sistema destacado anteriormente e serão submetidas à análise histométrica. Com o auxílio do programa (ImageJ® 2.1.4.7.i1) que realizará a mensuração da extensão linear de contato entre tecido conjuntivo (corado com azul de Stevenel) e implante e entre tecido ósseo (corado com vermelho de alizarina) e implante, de 2 regiões pré-selecionadas, correspondentes às regiões das duas espiras mais centrais do implante, contados do módulo de rebordo ao ápice dos implantes, para ambos os grupos.

Para a determinação da área de osso neoformado (AON) nas duas roscas mais centrais de cada lado do implante (localizadas em osso medular) devido à anatomia do leito receptor (espaço medular amplo ser mais crítico ao processo de neoformação e remodelação).

Como cada implante presente na lâmina foi considerado uma unidade para a análise, as leituras foram realizadas nos dois lados do implante, de forma que sua média será considerada como valor representativo da unidade.

Os dados obtidos serão convertidos em valores percentuais e os dados iram ser submetidos à curva de normalidade para determinação do teste mais adequado (paramétrico versus não paramétrico) no Programa estatístico para pesquisa biológica, (SigmaPlot 3.2 Software, Inc). O nível de significância adotado será de $p < 0,05$ para todos os testes.

3.5.3 Grupo C

3.5.3.1 Análise Biomecânica

Para a análise biomecânica, 6 animais dos grupos CO, PNX, PNXm, após a eutanásia tiveram as metáfises das tíbias direita foram reabertas para exposição dos implantes e realização do torque reverso. Um monta-implante (Conexão, São Paulo, Brasil) foi adaptado ao hexágono do implante e o torquímetro digital acoplado ao monta-implante.

Foi aplicado movimento anti-horário aumentando-se o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo-se completamente a interface osso/implante, momento em que o torquímetro registre o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm). Os valores obtidos foram agrupados e submetidos à análise estatística mais adequada de acordo com a distribuição na curva de normalidade, adotando nível de significância a 5% [27,29].

3.5.4 Grupo D

3.5.4.1 Avaliação radiográfica tridimensional (Micro-Ct)



Os parâmetros adotados seguiram as diretrizes para avaliação da microarquitetura óssea em roedores utilizando microtomografia computadorizada publicada por Bouxsein *et al.* (2010)[30].

Para a análise tridimensional, dois animais dos grupos CO, PNX, PNXm terão as tíbias esquerdas foram removidas, reduzidas à área de instalação dos implantes e armazenadas em álcool 70%, foram primeiramente submetidas a análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan[®] (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 9 µm de espessura (50Kv e 500µ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida uma área ao redor do implante (ROI) delimitada por 0,5 mm em torno de todo o implante. Esta área ficou definida como Área Total (0,5mm de margem ao redor dos implantes- ROI 4,5mm x 3,2mm) (Fig. 4). O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (thersould). O threshold utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza, que possibilitará a obtenção do volume de osso formado ao redor dos implantes. (Fig. 5)

4 RESULTADOS

4.1 Análise Histológica

Nas primeiras espiras dos implantes, foi possível observar a presença de tecido ósseo cortical em todos os grupos. Para a região medular, o grupo CO mostrou formações de tecido ósseo maduro e em justaposição às espiras do implante, não apresentando processo inflamatório. No grupo PNX houve formação óssea imatura, com disposição de fibras colágenas desorganizadas, com presença de fibroblastos em meio a adipócitos próximos as regiões medulares relacionadas a células inflamatórias com um número moderado de macrófagos e linfócitos. Contudo, a região medular se mostrou uma região crítica à formação de osso na interface osso/implante em ratos pinealectomizados sem tratamento. Em relação ao grupo PNXm, observou-se formação de tecido ósseo imaturo em grande quantidade, disposto desorganizadamente com presença de fibroblastos em direção as espiras mais centrais dos implantes. (Fig. 6)

4.2 Análise Imunistoquímica

A enzima TRAP marca osteoclastos em atividade de reabsorção e neste estudo, a sua imunomarcacão foi considerada moderado para CO e PNXm, já para o grupo PNX a imunomarcacão foi intensa (Fig.7). Os escores para OPG, proteína que sinaliza para as atividades de formação do tecido ósseo, foram intenso para CO e PNXm e moderado PNX (Fig.8). As imunomarcacões para RANKL, proteína que sinaliza para as atividades de reabsorção do tecido ósseo, foram moderadas para os grupos CO e PNXm, e intenso PNX (Fig.9). As marcações para OC, proteína que marca a etapa de mineralização do tecido ósseo, foram intensos para os grupos CO e PNXm, e moderado PNX (Fig.10) (Tabela 3).

4.3 Análise Biomecânica

Na análise Biomecânica os dados passaram no teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) (Shapiro-Wilk) ($P = 0.266$) sugerindo um teste paramétrico para comparação entre os grupos CO, PNX e PNXm. A análise de variância com valor igual a ($P = 0.856$), após passar pelo pós teste de Tukey, as comparações entre os grupos só não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos PNX e PNXm com ($P = 0.500$). Na comparação dos grupos CO com PNXm e CO com PNX os resultados foram significativos com ($P < 0.050$). (Fig. 11) (TABELA 4)

4.4 Análises Histométricas

Na análise de extensão linear de contato osso/implante (ELCOI), os grupos passaram no teste de Shapiro-Wilk ($P = 0.278$) o que permitiu a utilização de um teste paramétrico. Na equação de variância ($P = 0.393$). O teste de comparação múltipla de Tukey apontou diferenças estatisticamente significantes nos grupos PNXm quando comparado com PNX, indicando que o tratamento fez diferença. Quando comparados o grupo PNXm com o grupo Controle, houve diferença indicando que o grupo tratado com melatonina foi diferente do controle. Entre os grupos controle e PNX não houve diferença estatisticamente significativa. O grupo tratado com melatonina apresentou diferença estatisticamente significativa ($P = 0.001$). (TABELA 2) (Fig. 12.a)

Na análise de área de osso neoformado (AON), quando os grupos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk obtiveram um resultado de ($P < 0.050$) o que indicou um teste não paramétrico. $H = 0,669$ com 2 graus de liberdade. Kruskal-Wallis ($P = 0,716$). As diferenças nos valores medianos entre os grupos de

tratamento não são grandes o suficiente para excluir a possibilidade de que a diferença é devido à variabilidade de amostragem aleatória; não houve diferença estatisticamente significativa ($P = 0,716$). (Fig. 12.b)

4.5 Análise Microtomográfica

Na análise Biomecânica os dados passaram no teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) (Shapiro-Wilk) ($p=0,851$) microtomográfica, o parâmetro BV.TV ($p=0,933$) que trata da porcentagem de volume ósseo mostrou-se igual ao parâmetro Tb.N ($p=0,933$) que quantifica o número de trabéculas. Esses parâmetros se mostram diretamente proporcionais, e não apresentaram diferença na avaliação entre os grupos.

Na análise dos parâmetros tanto Tb;Th ($p=0,933$) que trata da espessura do trabeculado ósseo e que confere uma característica de maturidade óssea, quanto Tb.Sp ($p=0,200$) que aponta a separação entre as trabéculas ósseas, não houve diferença entre os grupos avaliados. (Fig. 13)

5 DISCUSSÃO

A hipótese apresentada neste estudo de que o reparo ósseo periimplantar dos ratos pinealectomizados seria diferente do grupo controle negativo (PNX), foi parcialmente aceita, tendo em vista que os parâmetros histológicos, a ELCOI, o torque reverso e a imunomarcção de proteínas envolvidas no reparo ósseo, evidenciaram que a melatonina foi capaz de melhorar o metabolismo do osso de animais pinealectomizados. Enquanto que os demais parâmetros (AON, BV/TV, Tr.N, Tb.Th e Tb.Sp) foram similares entre os grupos ($p>0,05$, Teste Tukey).

Histologicamente, notou-se um padrão de neoformação óssea na região periimplantar muito próxima em todos os grupos nas regiões corticais, sendo possível verificar a presença de osso cortical maduro próximo ao módulo do rebordo e ao ápice do implante, em que nesse modelo experimental, este processo valida a condição de instalação satisfatória e a ausência de fibrointegração ou reabsorção, que culminaria em falha na instalação do implante e na consequente exclusão de amostras das análises. No entanto, foi possível notar que a região medular se tornou crítica à neoformação óssea nas espiras mais centrais dos implantes, sendo-nos mais comprometida nos animais com comprometimento da melatonina, por meio da pinealectomia. [25,13] O grupo de animais pinealectomizados tratados com melatonina apresentaram resultados histológicos mais favoráveis quando comparados com os animais não tratados, demonstrando menos células inflamatória e maior neoformação ósseas ao longo da superfície do implante e próxima às espiras mais centrais, contudo, esse novo tecido ósseo formado junto à essas espiras ainda estava imaturo e desorganizado quando comparado ao grupo controle. [13,24,25,26].

Neste contexto, estes resultados confirmaram os observados por publicações anteriores [28,30], no tocante a consagração metodológica dos estudos de reparo ósseo ao redor dos implantes instalados em tíbias. A área fundamental de análise do reparo é representada pela região medular, já que mesmo modificando o metabolismo do tecido ósseo, as regiões corticais não mostram alterações significantes em comparação aos grupos experimentais.

Na análise da área de osso neoformado correspondente à espira mais central da interface osso/implante, não foi observada diferença que fosse estatisticamente significativa ($p=0,716$), contudo, o grupo tratado com melatonina apresentou uma

tendência a apresentar maior área de osso novo. Os resultados relacionados à ELCOI ($P=0,393$), o tratamento com melatonina mostrou diferença favorável sobre os demais grupos, sendo que os espécimes do grupo PNX e CO não apresentaram diferenças entre si. Esses resultados implicam no fato de que o maior contato do osso ao implante permite maior capacidade de dissipação de cargas e proteção ao advento da osseointegração [31,32]. Uma vez que o fenômeno da osseointegração somente é alcançado após a aplicação de carga, e por consequência, há maior maturação do osso peri-implantar [31,32]. Portanto, estudos futuros com a aplicação de micromovimentos sobre os implantes durante os diferentes períodos de reparação, devem ser realizados.

As reações de imunoistoquímica são essenciais para o entendimento das respostas celulares envolvidas no reparo ósseo [25,33,34]. As imunomarcações observadas neste estudo mostraram escores que tendiam a aproximar os resultados dos animais tratados com melatonina ao grupo controle, em comparação ao grupo PNX sem tratamento. Isso demonstra que o procedimento de pinealectomia realmente interfere nas sinalizações do metabolismo ósseo. A fosfatase ácido resistente ao tartarato mostrou o processo de reabsorção acontecendo sobre o grupo controle de uma forma leve, no grupo PNXm de uma forma moderada e no grupo PNX de forma intensa. A osteoprotegerina que é um marcador da função osteoclástica que indiretamente favorece a formação de tecido ósseo, foi marcada intensamente tanto para CO quanto para PNXm, mostrando um osso mais protegido da reabsorção quando comparado ao grupo PNX que foi moderado. A RANKL foi moderada para CO e PNXm, já PNX foi intenso. OC foi intensa para CO e PNXm, já PNX foi moderado.

A biomecânica analisada pelo torque reverso dos implantes demonstrou a resistência do osso periimplantar presente em cada grupo, ao indicarem que não houve

diferença estatisticamente significativa entre os grupos que sofreram a pinealectomia com ou sem tratamento, contudo, quando comparados com o grupo controle os resultados foram considerados significativos, demonstrando que a ausência da glândula pineal e seu hormônio prejudicaram o contato entre osso e superfície do implante. Esse contexto demonstra que a pinealectomia levou a um atraso da osseointegração, ocupando uma faixa de evolução do reparo ósseo intermediário a estabilidade primária e secundária do implante [30,31].

Os parâmetros tomográficos, tais como o volume do tecido ósseo e as informações do osso trabecular devem ser verificados no exame pré-operatório, tendo em vista que a qualidade do tecido ósseo será fundamental para a estabilidade primária dos implantes [24]. Assim, esses padrões volumétricos analisados nesta pesquisa tiveram a função de esclarecer as características imaginológica presentes no osso na circunstância da ausência da melatonina, sendo que em geral, o clínico implantodontista utiliza de exames tomográficos para auxiliá-lo a escolher a macrogeometria do implante, o tipo de tratamento de superfície e outros fatores como a técnica e região de instalação [35]. O volume ósseo muitas vezes é o parâmetro visualizado por meio do exame tomográfico para a determinação da quantidade de osso, buscando o mínimo de sítio para sustentar o implante dentário [36].

Entretanto, este trabalho mostra que estatisticamente não houve diferenças entre os grupos CO, PNx e PNxm através do BV.TV ($P=0,933$), com uma tendência a mostrar maior volume ósseo para o grupo tratado com melatonina e seguidos do PNx e do controle. Sendo corroborado pelo número de trabéculas Tr.N ($0,933$), mostrando que o volume ósseo é uma grandeza diretamente proporcional ao número de trabéculas. Já no parâmetro que analisou a espessura dessas trabéculas Tr.Sp ($P=0,200$), mostraram

que o grupo CO, que estava reduzido em BV.TV e Tr.N foi superior aos demais grupos e que essa característica é conferida à presença de trabéculas ósseas mais maduras e por consequência, de maior qualidade. No parâmetro Tr.Sp ($P=0,933$), que analisou as separações entre as trabéculas mostrou que o grupo PNX estava com a maior separação comparado com os demais grupos. Esta característica corroborou com os resultados histológicos que demonstraram um osso mais pobre, mais trabecular e imaturo com maiores espaços entre as trabéculas, diferente do grupo tratado com melatonina que mostrou uma tendência a resultados parecidos com os do grupo CO.

Ao correlacionar todos os resultados obtidos nesse trabalho, foi possível notar que as diferenças foram sutis, porém passíveis de dar indícios perspicazes com relação às alterações criadas pela pinealectomia, em que a ausência da melatonina prejudicou as funções sistêmicas importantes para o metabolismo ósseo relacionado ao *turnover* celular e a capacidade de maturação do tecido ósseo. O tratamento mostrou uma tendência positiva nos resultados que se aproximavam ao grupo controle.

Amstrup *et al.* (2015) [24], demonstraram pouquíssimos efeitos colaterais com doses usuais e até em altas doses de melatonina, tornando-se um tratamento promissor complementar no futuro para a prevenção do risco de fraturas e perda ósseas em especial, o colo do fêmur. A melatonina é virtualmente livre de toxicidade, o que se torna necessário o delineamento de estudos futuros com doses mais elevadas de melatonina, o que de fato é desejável para avaliar o verdadeiro efeito desta droga em relação ao osso humano. Com isso, poderá adequar-se os níveis de segurança para o emprego seguro e estabelecer-se as associações necessárias a outros hormônios sinérgicos à melatonina.

6 CONCLUSÃO

Diante dos limites deste estudo *in vivo*, conclui-se que a melatonina foi capaz de melhorar o reparo ósseo ao redor dos implantes em ratos submetidos à pinealectomia.

REFERÊNCIAS

1. STEHLE JH, SAADE A, RAWASHDEH O, et al. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res* 2011; 51:17–43.
 2. SATOMURA K, TOBIUME S, TOKUYAMA R, et al. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res* 2007; 42:231–239.
 3. ZHANG L, ZHANG J, LING Y, et al. Sustained release of melatonin from poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres to induce osteogenesis of human mesenchymal stem cells in vitro. *J Pineal Res* 2013; 54:24–32.
 4. CARLBERG C, HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN R, STAPLE JK, et al. RZR_s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* 1994; 8:757–770.
 5. HEVIA D, SAINZ RM, BLANCO D, et al. Melatonin uptake in prostate cancer cells: intracellular transport versus simple passive diffusion. *J Pineal Res* 2008; 45:247–257.
-

6. ANTON-TAY F, RAMIREZ G, MARTINEZ I, et al. In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res* 1998; 23:601–606.
 7. HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F, BENITEZ-KING G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res* 1994; 17:55–62.
 8. MACIAS M, ESCAMES G, LEON J, et al. Calreticulin–melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem* 2003; 270:832–840.
 9. TAN DX, MANCHESTER LC, TERRON MP, et al. Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance. *J Pineal Res* 2007; 43:317–320.
 10. PEYROT F, DUCROCQ C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res* 2008; 45:235–246.
 11. HARDELAND R, TAN DX, REITER RJ. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res* 2009; 47:109–126.
 12. CUTANDO A, GÓMEZ-MORENO G, ARANA C, et al. Melatonin: potential functions in the oral cavity. *J Periodontol* 2007; 78:1094–1102.
 13. EGERMANN M, GERHARDT C, BARTH A, et al. Pinealectomy affects bone mineral density and structure—an experimental study in sheep. *BMC Musculoskelet Disord* 2011; 12:271.
-

14. TURGUT M, KAPLAN S, TURGUT AT, et al. Morphological, stereological and radiological changes in pinealectomized chicken cervical vertebrae. *J Pineal Res* 2005; 39:392–399.
 15. ZHDANOVA IV, WURTMAN RJ, BALCIOGLU A, et al. Endogenous melatonin levels and the fate of exogenous melatonin: age effects. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1998; 53:B293–B298.
 16. OSTROWSKA, Z.; KOS-KUDLA, B.; NOWAK, M, et al. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats. *Endocr Regul*; 37: 211–24, 2003.
 17. WADE AG, FORD I, CRAWFORD G, et al. Nightly treatment of primary insomnia with prolonged release melatonin for 6 months: a randomized placebo controlled trial on age and endogenous melatonin as predictors of efficacy and safety. *BMC Med* 2010; 8:51.
 18. BUSCEMI N, VANDERMEER B, HOOTON N, et al. The efficacy and safety of exogenous melatonin for primary sleep disorders. A meta-analysis. *J Gen Intern Med* 2005; 20:1151–1158.
 19. SRINIVASAN V, BRZEZINSKI A, PANDI-PERUMAL SR, et al. Melatonin agonists in primary insomnia and depression-associated insomnia: are they superior to sedative-hypnotics? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011; 35:913–923.
-

20. FERRACIOLI-ODA E, QAWASMI A, BLOCH MH. Meta-Analysis: Melatonin for the Treatment of Primary Sleep Disorders. PLoS ONE 2013; 8(5): e63773. doi:10.1371/journal.pone.0063773.
 21. LEUNG KC, CHOW TW, WAT PY, et al. Peri-implant bone loss: management of a patient. Int J Oral Maxillofac Implants 2001; 16:273-277.
 22. ISIDOR F. Influence of forces on peri-implant bone. Clin Oral Implants Res 2006; 17 Suppl 2:8-18.
 23. CUTANDO A, GÓMEZ-MORENO G, VILLALBA J, et al. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. J. Pineal Res 2003; 35:239–44.
 24. AMSTRUP AK, SIKJAER T, HEICKENDORFF L, et al. Melatonin improves bone mineral density at the femoral neck in postmenopausal women with osteopenia: a randomized controlled trial. J Pineal Res 2015; 59:221–229.
 25. MANRIQUE N, PEREIRA CC, LUVIZUTO ER, et al. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. Clin Oral Investig 2015; 19:1319-1327.
 26. PEDROSA JR WF, OKAMOTO R, FARIA PEP, et al. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone grafts remodeling. Part II: calvarial bone. Clin Oral Impl Res 2009; 20:1254–1264.
 27. DEMPSTER DW, COMPSTON JE, DREZNER MK, et al. Standardized Nomenclature, Symbols, and Units for Bone Histomorphometry: A 2012 Update
-

- of the Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2013; 28:2–17.
28. RAMALHO-FERREIRA G, FAVERANI LP, PRADO FB, et al. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015; 44:798-805.
 29. BOUXSEIN ML, BOYD SK, CHRISTIANSEN BA, et al. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *J Bone Miner Res* 2010; 25:1468-1486.
 30. GLÖSEL B, KUCHLER U, WATZEK G, et al. Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010; 25:516-524.
 31. TRISI P, BERARDINI M, FALCO A, et al. Validation of value of actual micromotion as a direct measure of implant micromobility after healing (secondary implant stability). An in vivo histologic and biomechanical study. *Clin Oral Impl Res* 2016; 00:1–8.
 32. WISKOTT HWA, BONHOTE P, CUGNONI J, et al. Implementation of the “loaded implant” model in the rat using a miniaturized setup – description of the method and first results. *Clin Oral Impl Res* 2012; 23:1352–1359.
 33. LUVIZUTO ER, DIAS MS, QUEIROZ TP, et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone* 2010; 46:1021–1029.
 34. LUVIZUTO ER, QUEIROZ TP, DIAS SM, et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing
-

process in ovariectomized female rats treated with estrogen or raloxifene. Arch Oral Biol 2010; 55:52–59.

35. WENNERBERG A, ALBREKTSSON T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. Clin Oral Implants Res 2009; 20:172-184.
36. ESPOSITO M, FELICE P, WORTHINGTON HV. Interventions for replacing missing teeth: augmentation procedures of the maxillary sinus. Cochrane Database Syst Rev 2014; Art. No.: CD008397.

TABELAS

TABELA 1 - Organograma de grupos experimentais e análises onde cada tíbia foi considerada uma unidade amostral, como exemplificado no quadro:

IMPLANTES EM TÍBIAS 42 DIAS		GRUPO A CALCIFICADO	GRUPO B DESCALCIFICADO	GRUPO C MICROCT	GRUPO D BIOMECÂNICA	(N) TOTAL
GRUPO 1	CO Sem PNX	(n=6) Tíbia.	(n=6) Tíbia.	(n=2) Tíbia.	(n=6) Tíbia.	20
GRUPO 2	PNX	(n=6) Tíbia.	(n=6) Tíbia.	(n=2) Tíbia.	(n=6) Tíbia.	20
GRUPO 3	PNX MELATONINA	(n=6) Tíbia.	(n=6) Tíbia.	(n=2) Tíbia.	(n=6) Tíbia.	20

(CO) = controle; (PNX) = Pinelectomia.

TABELA 2 – Análise estatística da histometria de Estensão linear de Contato Osso Implante (ELCOI)

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
PNXm vs. PNX	0.0227	3	5.888	<0.001	Yes
PNXm vs. CO	0.0189	3	4.611	0.006	Yes
CO vs. PNX	0.00385	3	0.940	0.785	No

TABELA 3 – Escores atribuídos à análise imunoistoquímica:

	TRAP	OPG	RANKL	OC
CO	+++	++++	+++	++++
PNX	++++	+++	++++	+++
PNXm	+++	++++	+++	++++

TABELA 4 – Dados submetidos à análise estatística para análise biomecânica de contra torque:

Groups	CO	PNX	PNXm
Removal Torque (N.cm)	8	3	6
	9	6	5
	8	6	6
	6	6	6
	9	4	5
	9	5	7
	6	6	6
	7	7	7
Média	7,75	5,375	6

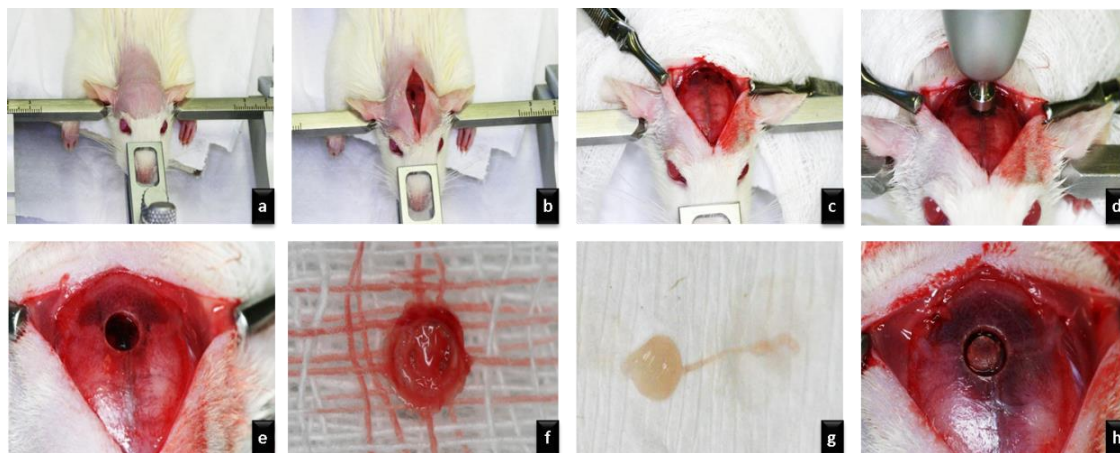
FIGURAS

Figura 1 – Sequência cirúrgica para pinealectomia: (a) Após a tricotomia e antissepsia da região a ser acessada para a realização do procedimento cirúrgico de pinealectomia, foi utilizado um aparelho estereotáxico para estabilizar a cabeça do rato, (b) Foi realizada uma incisão longitudinal com cerca de 2cm sobre a sutura sagital, (c) deslocamento do retalho e pericrânio para exposição da região do lambda (intersecção das suturas sagital e lambdoide), (d) Foi realizada uma osteotomia com uma trefina de 4,5mm na região, (e) para obtenção de acesso direto a glândula Pineal abaixo do seio venoso da dura-máter, (f) Foi removida a porção óssea trefinada da região lambdoide e foi mantida em solução salina até o momento do seu reposicionamento, (g) a glândula Pineal foi removida e identificada por animal, (h) Foi reposicionada a porção óssea que havia sido removida.

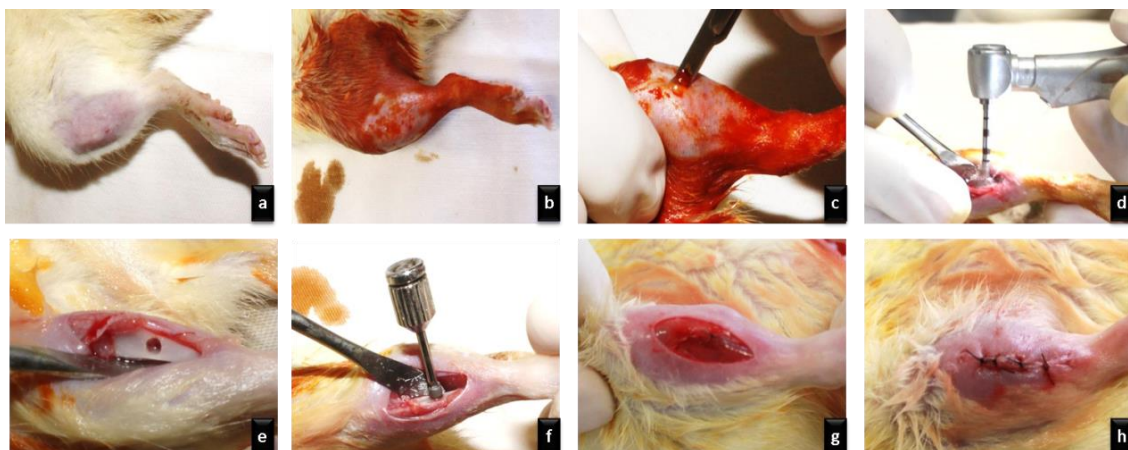


Figura 2 – Sequência cirúrgica para instalação do implante na tíbia: (a) tricotomia da região anterolateral da tíbia, (b) antissepsia com PVPI degermante, (c) incisão de aproximadamente 3 cm de comprimento na região de metáfise tibial esquerda e direita, (d) o músculo gastrocnêmico e o periósteo foi descolado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para receber os implantes com o auxílio de uma fresa lança acoplada a um contra-ângulo de implante conectado a um motor elétrico, foi realizada loja cirúrgica sob irrigação abundante com soro fisiológico, (e) loja cirúrgica criada foi realizada com fresa start de 1,4mm de diâmetro, (f) instalação do implante com auxílio de uma chave digital quadrada, (g) Sutura por planos com fio de Vycril 4-0, (h) sutura com pontos simples interrompidos em pele com fio de nylon 4-0.

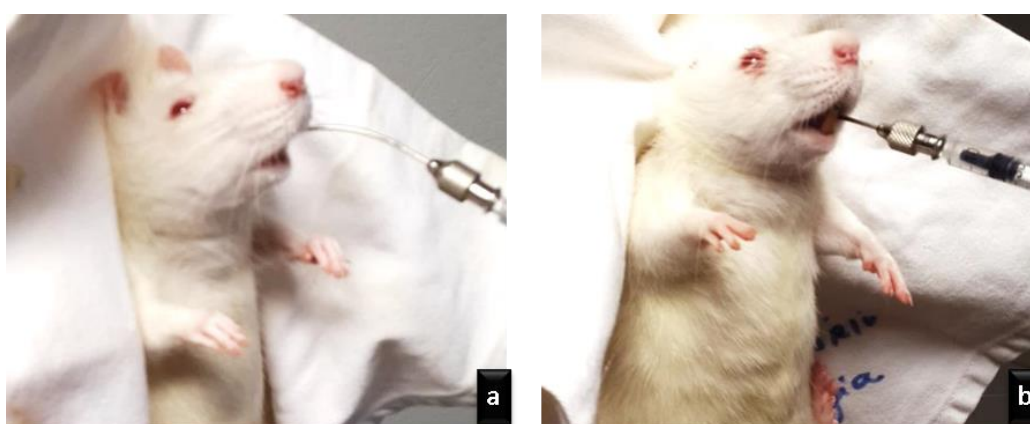


Figura 3 - (a) Administração por via oral um volume de 0,2 ml de melatonina na proporção de 5mg/kg para o grupo PNxm. (b) No grupo PNx, foi administrado por via oral um volume de 0,2ml de solução salina.

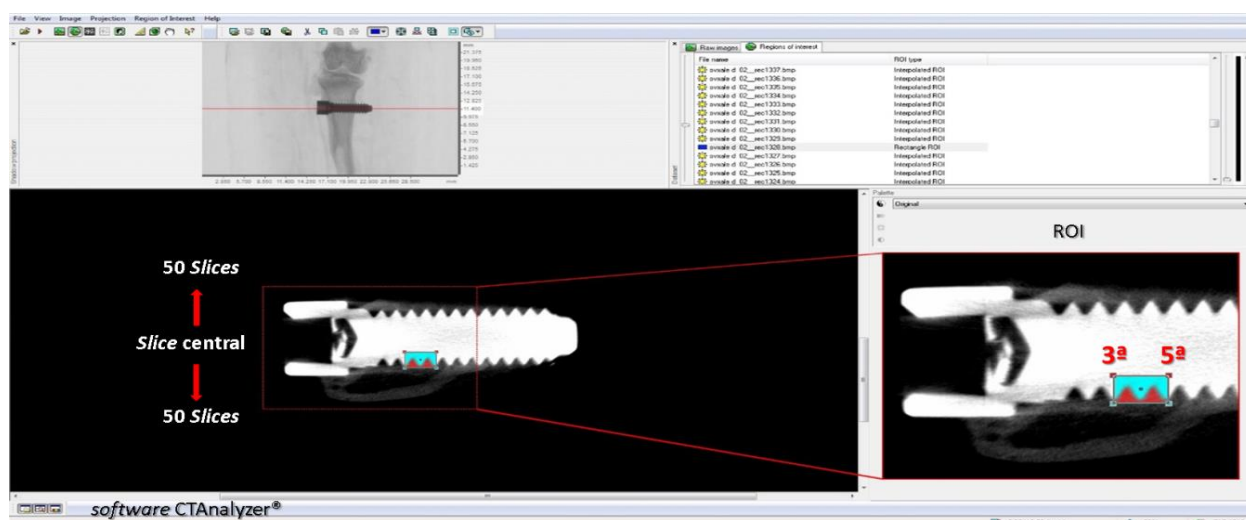


Figura 4 - Demarcação da ROI no software CTAnalyzer. O quadro vermelho mostra uma aproximação para melhor visualização da área retangular correspondendo aos vales entre a 3ª e a 5ª rosca do implante

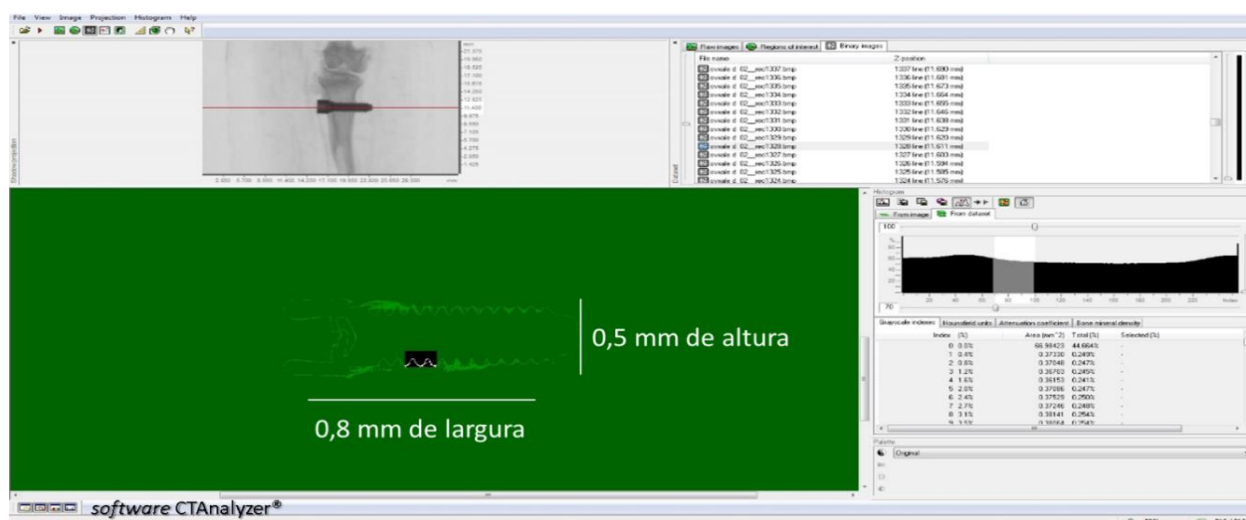


Figura 5 – Conversão das imagens em escala de cinza. A imagem mostra a ROI após a conversão em escalas de cinza com os intervalos de valores correspondentes ao osso esponjoso. As áreas em branco correspondem à estrutura óssea.



Figura 6 - Cortes histológicos pela técnica de inclusão em resina do sistema exakt na coloração de Azul de Stevenel e vermelho de alizarina. (CO) Grupo Control, (PNx) Grupo pinealectomizado e (PNxm) Grupo pinealectomizados tratado com melatonina.

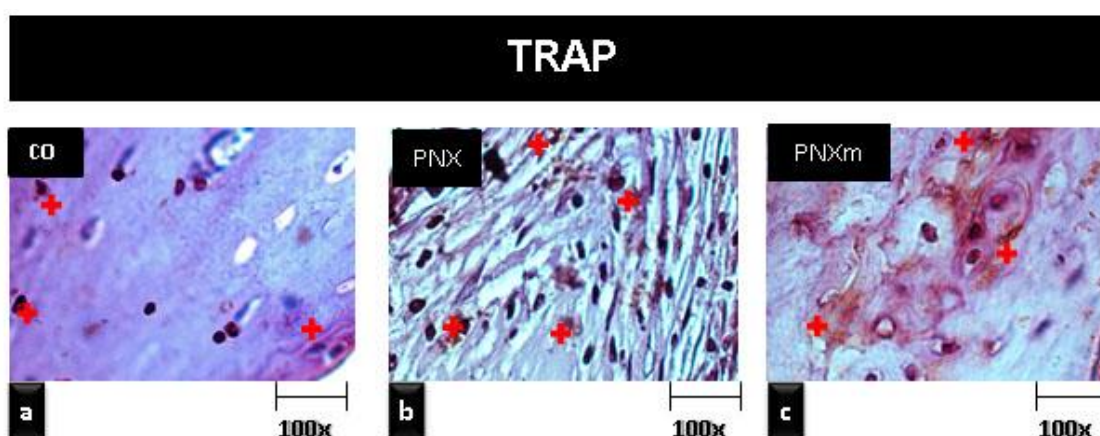


Figura 7 – Cortes histológicos pela técnica de inclusão em parafina com imunomarcacão para (TRAP): CO e PNxm moderado; PNx intenso.(100x)

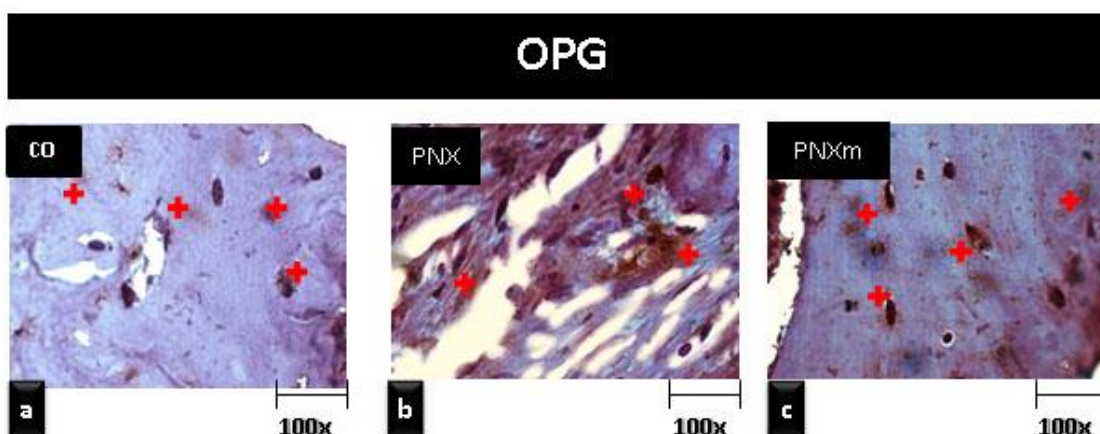


Figura 8 – Cortes histológicos pela técnica de inclusão em parafina com imunomarcacão para (OPG): CO e PNxm intensa; PNx moderado (100x)

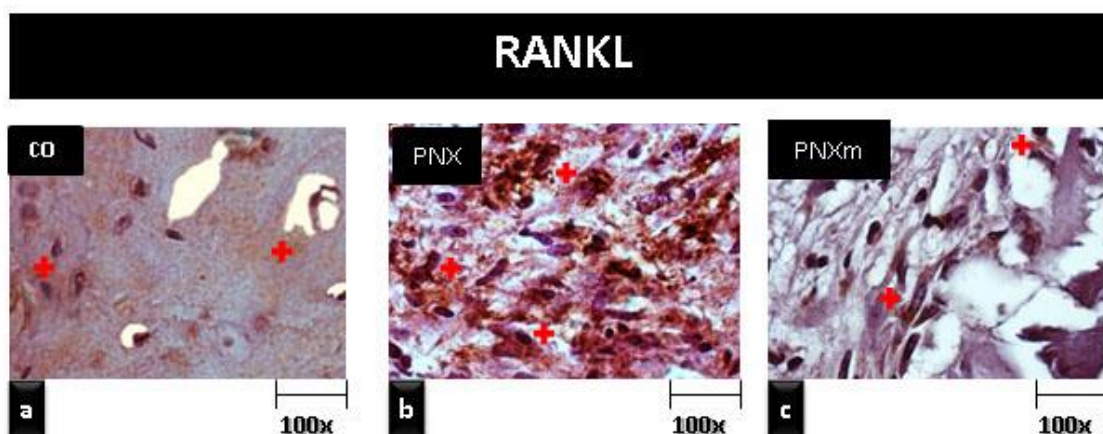


Figura 9 – Cortes histológicos pela técnica de inclusão em parafina com imunomarcção para (RANK-L): Co e PNxm moderado; PNx intenso (100x).

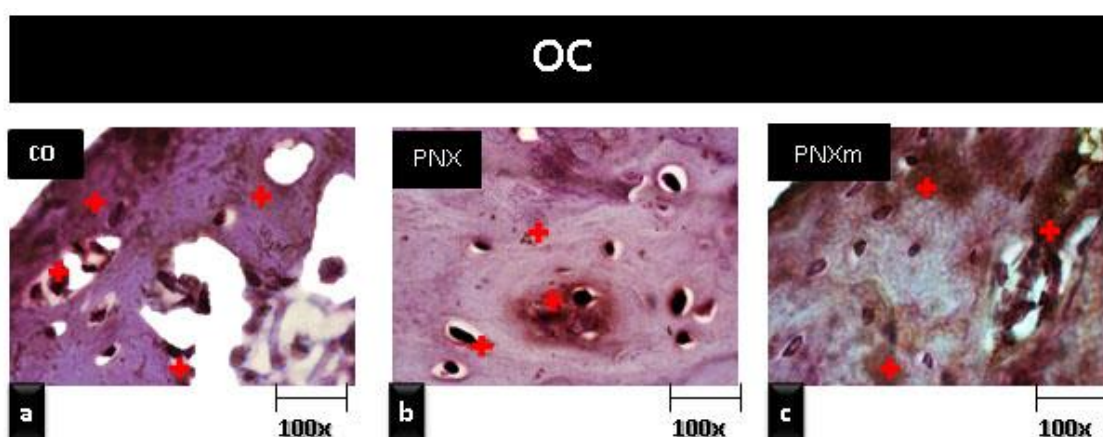


Figura 10 – Cortes histológicos pela técnica de inclusão em parafina com imunomarcção para (OC): CO e PNxm intenso; PNx moderado (100x)

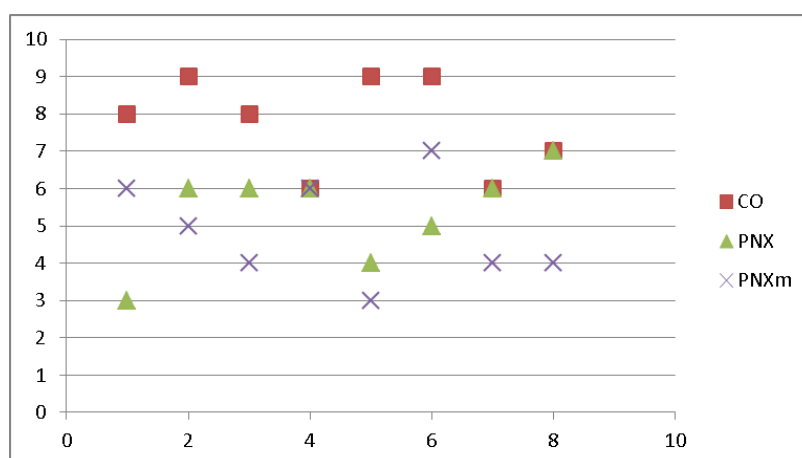


Figura 11 - Na análise Biomecânica os dados passaram no teste de normalidade (Shapiro-Wilk) ($P = 0.266$), após passar pelo pós-teste de Tukey, as comparações entre os grupos só não apresentou

diferença estatisticamente significativa entre os grupos PNX e PNXm com ($P = 0.500$). Na comparação dos grupos CONTR com PNXm e CONTR com PNX os resultados foram significativos com ($P < 0.050$).

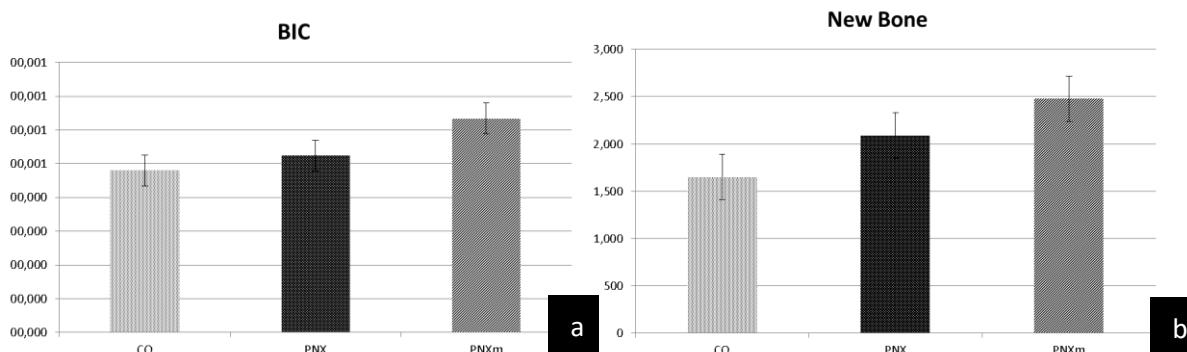


Figura 12 – a) Na análise de ELCOI houve diferença na comparação dos grupos com PNXm ($P = 0.001$ / *Tukey test*); b) Na análise de AON, não houve diferença estatisticamente significativa ($P = 0,716$ *Kruskal-Wallis*).

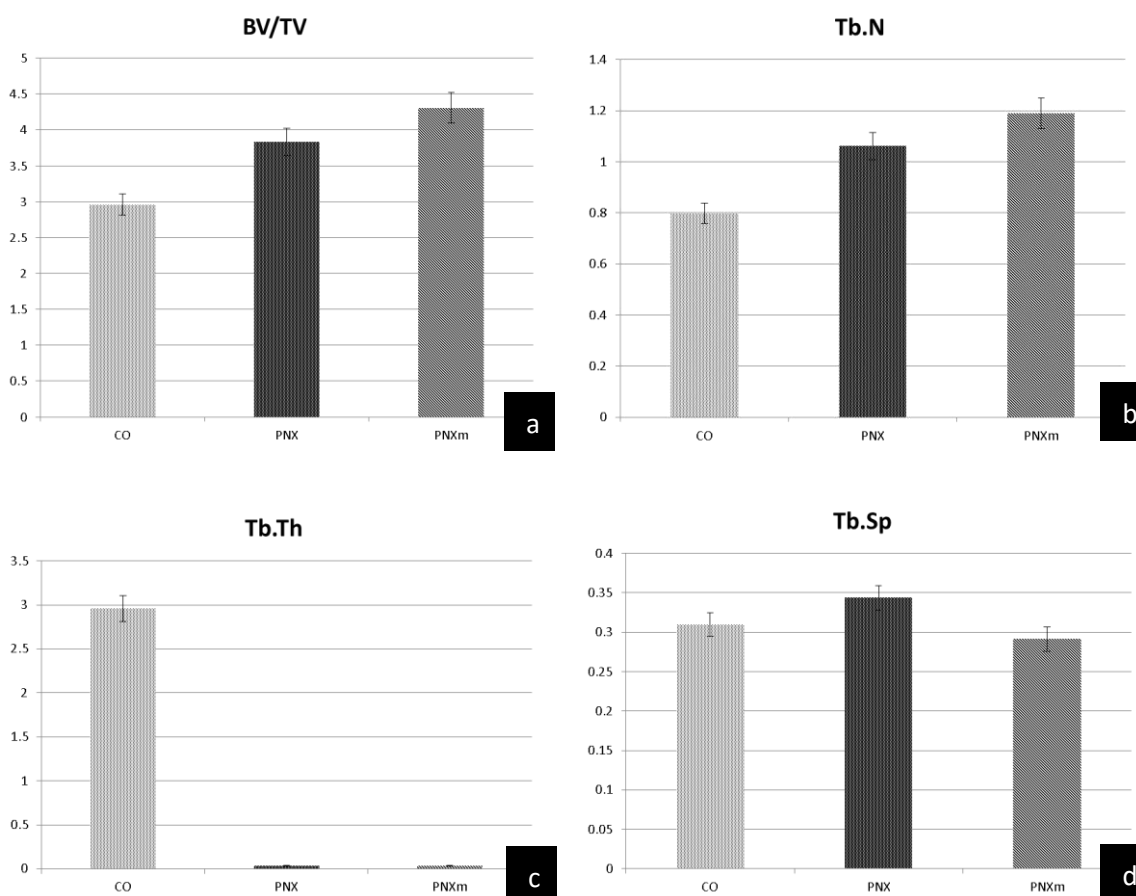
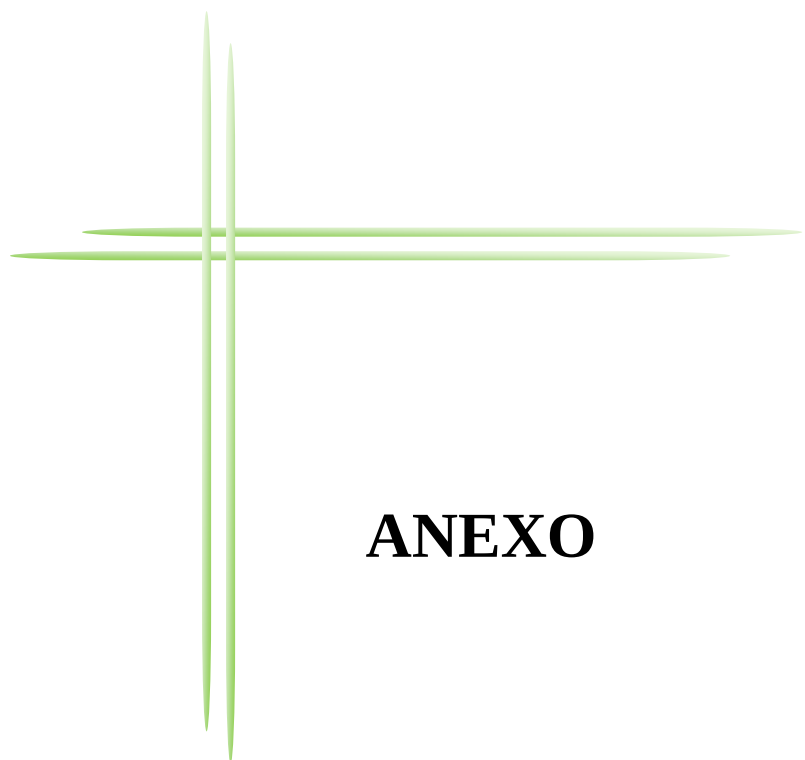


Figura 13 - Parâmetros para análise microtomográfica (a) BV.TV $p = 0,933$; (b) Tr.N $p = 0,933$; (c) Tb.Th $p = 0,933$; (d) Tb.Sp $p = 0,200$. Não houve diferença estatística.



ANEXO

Anexo I – Comissão de Ética no uso de Animais

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação do reparo ósseo na interface osso/implante em ratos pinealectomizados – Análise histológica, histométrica, imunohistoquímica e biomecânica", Processo FOA nº 2014-00268, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 26 de Junho de 2014.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 16 de Fevereiro de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 16 de Março de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of bone healing in bone/implant interface in pinealectomized rats – Histological analysis, histometric, immunohistochemical and biomechanic", Protocol FOA nº 2014-00268, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 26, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 16, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 16, 2016.


Prof. Dr. Edilson Ervolino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Aracatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mercedes – CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

Anexo II - Normas para publicação do periódico

Journal of Pineal Research

© John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd



Edited By: Russel J. Reiter

Impact Factor: 9.6

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2014: 3/83 (Physiology); 4/128 (Endocrinology & Metabolism); 13/252 (Neurosciences)

Online ISSN: 1600-079X

Author Guidelines = *Online submission*

To submit an article please visit our ScholarOne Manuscripts site: ScholarOne Manuscripts and create an account. Once an account has been created you log into the author center, click submit manuscript and follow the guidelines. In a covering letter the author(s) may suggest the names and addresses of the three possible reviewers. Covering letters should be uploaded to the manuscript central site as well. The editor is not responsible for loss or damage of manuscripts and associated materials.

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve its grammar, spelling, punctuation, and clarity. Visit Wiley-Blackwell's site to learn about the options. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

NOTE: IF YOUR PAPER IS ACCEPTED WITH MINOR OR MAJOR REVISIONS REQUIRED DO NOT RE-SUBMIT YOUR PAPER UNTIL YOU HAVE RECEIVED THE EDITED VERSION (VIA MAIL) FROM THE EDITOR AND YOU HAVE MADE THE APPROPRIATE EDITORIAL CHANGES.

Editor-in-Chief

Russel J. Reiter, Ph.D., D.Med.

Department of Cellular and Structural Biology

The University of Texas

Health Science Center at San Antonio

Mail Code 7762

7703 Floyd Curl Drive

San Antonio, TX 78229-3900
USA

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

Manuscripts

Upload your manuscript to ScholarOne Manuscripts. Tables and figures should be uploaded separately (Tables in Word format and figures in TIFF, EPS or JPEG format).

Type the manuscript double-spaced throughout with a 1" (2.5 cm) margin on all sides. Number all manuscript pages consecutively beginning with the title page.

The manuscript should have a uniform style and be submitted exactly as the author wishes it to appear in print. It should consist of subdivisions in the following sequence:

Title page

Abstract

Text

References

Footnotes

Figure Legends

Tables

Title Page

The first page of the manuscript should include:

Title of paper

Full name of author(s)

Institution of affiliation

A running title not to exceed 45 letters and spaces

Individual and mailing address to whom correspondence concerning the manuscript should be sent with complete mailing address, telephone number, fax number and e-mail address

List of 5-7 key words

Abstract

Submit an abstract of 250 words or less that will serve in lieu of a concluding summary. The abstract must be written in complete sentences and succinctly state the objectives, experimental design of the paper, principal observations and conclusions; it should be intelligible without reference to the rest of the paper.

References

References in Articles

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:
<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:
<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Papers in the reference list are numbered and placed in the order of their citation in the text. In the text, papers are cited by the appropriate number. Follow these examples:

In the text:

It is now obvious that melatonin has several important functions in mammals [1 -3].

In the reference list:

1. CUZZOCREA S, MAZZON E, SERRAINO I, et al. (with 4 or more authors list 3 followed by et al.) Melatonin reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. J Pineal Res 2001; 30:1 -12.
2. BLASK DE. Melatonin in oncology. In: Melatonin. Yi HS, Reiter RJ eds., CRC Press, Boca Raton, 1993; pp. 447-476.
3. RASMUSSEN DD, MITTON DR, LARSEN SA, YELLON SM. Aging-de-pendent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. J Pineal Res 2001; 3:89-94.

Where a DOI is included in a reference, it should be cited as follows:

Mazmanian, S. K., Ton-That, H. & Schneewind, O. (2001) Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of Staphylococcus aureus. Molecular Microbiology, 40: 1049-1057. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02411.x

Author Contributions

The Journal of Pineal Research recommends that authors submit a short description of all contributions to their manuscript. Each author's contribution should be described in brief, to appear immediately before the references. Authorship credit might include contributions to concept/design, acquisition of data, data analysis/interpretation, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript and approval of the article. Further information on authorship and contributorship may be found here.

Tables

All tables must be cited in the text and must have titles. Table titles should be complete but brief. Information other than that defining the data should be presented as footnotes.

Figures

All figures must be cited in the text and must have legends. Number figure legends consecutively, e.g., Fig. 1., Fig. 2.

Number figures, including charts and graphs, consecutively throughout the text. Give text references to figures only in terms of the figure number.

General illustration instructions: Illustrations should be uploaded with the manuscript. You can find tips for preparing tables and figures here.

The reverse side of each illustration should indicate: Authors name; Figure number; Top side of illustration; 'Review copy' on those copies intended only for reviewers.

Do not fasten illustrations with paper clips, staples, etc., because they will mark the surface of the illustration.

Illustrations should be shipped flat and protected by heavy cardboard.

Illustrations

All illustrations must be uploaded in complete and finished form with adequate labeling. You can find tips for preparing tables and figures here. The artwork should be sharp and black to achieve maximum contrast. Use stippling and hatching techniques to achieve tonal quality. Figures should be supplied as EPS or TIFF. Each complete figure should be uploaded as a separate file. Avoid using tints if possible; if shading is essential to the understanding of the figure, try to make it coarse. Information on our digital illustration standards can be obtained at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Supporting information

If you have previously provided Supporting Information with your article, please note it will not be edited or altered from its original format during the Production process. Although a proof of your Supporting Information is not available, it will appear online when your article is published.

Colour

As Journal of Pineal Research is now an online-only journal, online colour illustrations are free-of-charge.

Copyright Transfer Agreement

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)] you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with your Funder requirements.

For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Miscellaneous

The editor and publisher reserve the right to return to the author for revision manuscripts and illustrations that are not in proper finished form. A manuscript that has been rejected by The Journal of Pineal Research should not be resubmitted.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

Offprints

Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Accepted Articles Published Online ahead of Print

Articles in this journal which have been peer-reviewed and accepted, but not yet copy-edited, are published online through our OnlineAccepted feature in advance of print publication - click here to see the articles currently available. At this time Supporting Information cannot be published at the OnlineAccepted stage. Any required Supporting Information will be available online from the Early View stage.

Early View

The Journal of Pineal Research is covered by Wiley-Blackwell's EarlyView service.

EarlyView articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. EarlyView articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of EarlyView articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so EarlyView articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: www.doi.org/faq.html

Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.
