

João Paulo Silva Servato

AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE REPARO
ALVEOLAR EM RATOS PINEALECTOMIZADOS
UTILIZANDO FLUOROCROMOS

ARAÇATUBA

2009

João Paulo Silva Servato

AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE REPARO
ALVEOLAR EM RATOS PINEALECTOMIZADOS
UTILIZANDO FLUOROCROMOS

Trabalho de Conclusão de Curso, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Bacharel em
Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ORIENTADORA: Prof^a. Ass. Dra. Doris Hissako Sumida

ARAÇATUBA

2009

Dedicatória

A todos os companheiros dessa jornada, chamada Graduação, muito obrigado pelo apoio, atenção e carinho dispensados.

Agradecimentos

À Profª Doris Hissako Sumida, que muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

Aos Profs. Drª Roberta Okamoto e João César Bedran de Castro, pela atenção e apoio durante a execução desse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

A todos docentes e técnicos administrativos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pelo incansável apoio ao longo do período de minha Graduação.

Epígrafe

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

Albert Einstein

RESUMO

Estudos demonstram que pessoas que trabalham no turno da noite perdem a capacidade de liberação circadiana de melatonina (Me) via glândula pineal, pois este hormônio só é liberado via esta glândula em condições de escuridão e durante o sono. Além do controle do ciclo circadiano, a melatonina vem sendo atrelada a diversas funções específicas, atuando como agente antioxidante, mediador inflamatório e substância osteogênica. A melatonina pode interferir no reparo alveolar de diversas formas, tanto pela modulação de processos inflamatórios, pela formação de fibrilas colágenas, pelo tempo de diferenciação dos osteoblastos, como através do stress oxidativo. Devido às estas ações da Me, pode ser que os trabalhadores noturnos, após uma extração dentária, apresentem um atraso no reparo alveolar. Entretanto, ainda não há estudos que demonstrem tal suposição. Portanto, o presente estudo tem por finalidade avaliar o processo de reparo alveolar em ratos pinealectomizados. Para tanto, foram utilizados 20 ratos Wistar de 1 mês de idade que foram divididos em dois grupos: 1) Grupo SHAM, animais submetidos à cirurgia simulada de pinealectomia, ou seja, nestes animais foram realizados todos os procedimentos da pinealectomia, exceto a remoção da glândula pineal; 2) Grupo PNX, animais submetidos à pinealectomia, ou seja, a remoção efetiva da glândula pineal. Passados 30 dias da pinealectomia, foi realizada a exodontia do incisivo superior direito. Após a extração dental, foram injetados (i.m.) os fluorocromos: calceína (no 14º dia PO) e a alizarina (no 28º dia PO). No 35º dia PO, as maxilas contendo os alvéolos em reparação foram removidas, e submetidas ao processamento laboratorial. A análise das lâminas foi realizada através de microscopia de epifluorescência, acoplado a uma fonte de luz externa para excitação dos fluorocromos, utilizando filtros com fotomultiplicador específicos para calceína e alizarina correspondentes ao comprimento de onda excitado por cada fluorocromo. Para

a aquisição das imagens, foi utilizada uma câmera digital acoplada a um microscópio de fluorescência e conectada ao computador pelo programa Leica DC 300F onboard. As imagens foram capturadas e mensuradas utilizando-se os programas Axiosion, versão 4,7 (Carl Zeiss, Göettingen, Germany) e ImageLab 2000, versão 2.4. Os nossos resultados demonstraram que a pinealectomia promove alterações negativas no processo de reparo alveolar, visto pela diminuição na neoformação óssea do grupo PNX em comparação com os ratos controle, em todos os períodos de PO e em todos os terços alveolares (apical, médio e cervical) estudados.

Palavras Chaves: melatonina, pinealectomia, reparo alveolar e fluorocromos.

ABSTRACT

Studies show that people who work at night shift lose the ability to circadian release of melatonin (Me) by the pineal gland, because this hormone is only released by this gland under conditions of darkness and during sleep. Beyond the control of the circadian cycle, the melatonin has been linked to several specific functions, acting as an antioxidant, an inflammatory and osteogenesis substance. Melatonin may interfere with alveolar repair in different ways, by the modulation of inflammatory processes, by the formation of collagen fibrils, by the differentiation time of osteoblasts, and by oxidative stress. Due to these actions of Me, may be that the night workers, after a tooth extraction, show a delay in wound healing. However, there are no studies that demonstrate this assumption. Therefore, this study aims to evaluate the process of wound healing in pinealectomized rats. For this, it was used 20 Wistar rats with 1 month of age to be divided into two groups: 1) SHAM group, animals underwent sham surgery for pinealectomy, this animal was carried out all procedures of pinealectomy, except the removal of pineal gland; 2) PNX group, the animals that was subjected to

pinealectomy (the removal of the pineal gland). After 30 days of pinealectomy was performed for extraction of upper right incisor. After the tooth extraction was injected (im) the fluorochromes: calcein (in 14 days postoperative -PO) and alizarin (in 28 days PO). In 35 days PO, the maxilar containing the alveoli in repair was removed and carried out the processing laboratory. After all the mechanical procedure, analysis of the slices will be made through the epifluorescence microscope, coupled to an external light source for excitation of fluorochromes by using filters specific for photomultipliers to calcein and alizarin, corresponding to the wavelength of excited for each fluorochrome. For acquisition of images, was used a digital camera attached to a fluorescence microscope and connected to the computer by Leica DC 300F software. The images was captured and measuared by Axiovision, version 4,7 (Carl Zeiss, Göettingen, Germany) and ImageLab 2000, version 2.4 softwares. Ours results have demonstrated that pinealectomy causes negative changes in the alveolar repair process, that it can be seen by the decrease in bone formation in PNX group compared to SHAM, in all periods of PO and in all alveolar portions (apical, middle and cervical) studied.

Keywords: melatonin, pinealectomy, alveolar repair and fluorochromes.

Sumário

I. Introdução.....	10
II. Objetivo.....	16
III. Materiais e Métodos	17
IV. Resultados	21
V. Discussão	26
VI. Conclusão	32
VII. Considerações Finais	33
VIII. Referências Bibliográficas	34
Anexo (Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal)	

I. INTRODUÇÃO

CARVALHO & OKAMOTO et al. (1987) descreveram que fatores locais e sistêmicos podem alterar as respostas teciduais que promovem a reparação alveolar. A cavidade bucal sofre transtornos frente a enfermidades, gerando sinais e sintomas que promoverão atraso na proliferação celular (FAHEY et al.,1991; CUTLER et al.,1991) e no metabolismo do colágeno (SCHNEIR et al., 1979; SCHNEIR et al., 1982), interferindo assim na formação do tecido de granulação e na deposição óssea, retardando a reparação alveolar (DEVLIN et al., 1996; GRANDINI et al.,1978).

A formação óssea ocorre através do processo de remodelamento, o qual ocorre continuamente, envolvendo reabsorção de osso antigo pela ação osteoclástica e subsequente formação de osso novo pela ação osteoblástica, substituindo assim a massa óssea e mantendo a integridade anatômica e funcional. Esta ação de remodelamento é controlada por fatores de crescimento e citocinas produzidas na medula óssea, e pela ação sistêmica de hormônios como o paratormônio, a insulina, o estradiol, o hormônio do crescimento (GH) e a melatonina (BILEZIKIAN et al., 2002; ROTH et al., 1999).

A melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina) é uma molécula amplamente presente na natureza, ocorrendo em organismos unicelulares, plantas, fungos e animais. Na maioria dos vertebrados, incluindo os homens, a melatonina é sintetizada primariamente na glândula pineal, durante o período escuro do ciclo circadiano, embora estudos mais recentes comprovem sua síntese em diversos órgãos e tecidos, incluindo retina, medula óssea, plaquetas, trato gastro-intestinal, pele e linfócitos. (PANDI-PERUMAL et al., 2006).

Além do controle do ciclo circadiano, a melatonina vem sendo atrelada com diversas funções específicas, estando relacionada ao envelhecimento, à obesidade, à sensibilidade à insulina, à maturação sexual, às ações antidepressivas, ao controle das secreções de hormônio

(do crescimento, hormônios adrenais e tireoideanos), e como agentes antioxidante, substância oncoestática, substâncias cardio-protetoras, mediador inflamatório e substância osteogênica (PANDI-PERUMAL et al., 2006; LIMA et al. 1994; LIMA et al. 1998).

ROTH et al. (1999), observaram que a melatonina tem um importante efeito na regulação do crescimento ósseo. Estes pesquisadores demonstraram que a culturas de pré-osteoblastos (MC3T3-E1(MC3T3) incubadas com melatonina (50 nM) apresentaram uma diferenciação celular ao redor de 12 dias ao invés de 21 dias (que é o tempo normal para que ocorra essa diferenciação em meio não tratado). Eles também observaram nesta mesma cultura celular, a presença de nódulos compostos com várias camadas de células, densamente envolvidos por fibrilas colágenas e espaço intercelular com depósitos minerais densos, principalmente na metade interna.

Em concentrações menores (10 mM), a melatonina também ocasiona aumento da expressão gênica de sialoproteínas como também de proteínas marcadoras ósseas (fosfatase alcalina, osteopontina e osteocalcina) (ROTH et al., 1999). NAKADE et al. (1999) comprovaram, em culturas de células ósseas humanas (HOB-M cells) e em células da linhagem osteoblástica (SV-HFO cells) que a melatonina aumentava a proliferação celular e a síntese de colágeno tipo I.

Além de promover diferenciação e síntese de proteínas, a melatonina também propicia o aumento da formação de massa óssea pela regulação negativa no receptor ativador do fator nuclear kappa B, o qual participa na ativação osteoclástica. (KOYAMA et al., 2002). Nos osteoblastos, a expressão de osteoprotegerina, substância que inibe a diferenciação osteoclástica, é aumentada pela presença de melatonina, constituindo outro fator de redução da atividade osteoclástica promovido pela melatonina. Ademais, o aumento da massa óssea causada pela melatonina se dá pela supressão da reabsorção óssea.

Os osteoclastos geram altos níveis de anions superóxidos, durante a reabsorção óssea, e isto deve contribuir para o processo degenerativo. Melatonina e seus metabólitos são fortes antioxidantes e suprimem a atividade de anions superóxidos, entre outros radicais livres. O efeito da melatonina na redução da atividade osteoclástica no osso depende em parte desta propriedade antioxidativa (PANDI-PERUMAL et al., 2006).

A ação direta da melatonina como agente antioxidante se dá durante sua metabolização, a qual ocorre com o consumo de radicais livres e esta ação é complementada indiretamente com a estimulação de enzimas antioxidantes como: glutathiona peroxidase, reductase, superóxido dismutase e catalase. A melatonina também é capaz de promover a redução dos níveis de óxido nítrico e do anion peróxido nítrico, por inibir a ativação de óxido nítrico sintetase induzível – iNOS (CUTANDO et al., 2007).

OSTROWSKA et al. (2003) sugeriram que, em ratos, a pinealectomia influenciava significativamente o ciclo cicardiano 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 dia (OSTROWSKA et al., 2003).

Na Odontologia, os efeitos benéficos da melatonina já vêm sendo avaliados por alguns pesquisadores. CUTANDO et al. (2007) associaram a melatonina como um possível recurso contra a doença periodontal, graças às suas atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, e estimulantes da proliferação de fibroblastos e da remodelação óssea. Em outro trabalho, CUTANDO et al. (2003) relacionam os graus severos de periodontite com a diminuição dos níveis salivares de melatonina, indicando que a melatonina age na proteção do organismo,

contra agressões bacterianas externas. Também em 2007, publicaram um trabalho relatando que, após a extração dentária, os níveis séricos de radicais livres aumentam, dificultando as reações de cura. A aplicação de melatonina nestes alvéolos diminuiria as complicações causadas pelo estresse oxidativo (CUTANDO et al., 2007).

Como amplamente revisto, a melatonina pode interferir no reparo alveolar de diversas formas, tanto pela modulação de processos inflamatórios, pela formação de fibrilas colágenas, pelo tempo de diferenciação dos osteoblastos, como através do stress oxidativo. Portanto, provavelmente, a falta da liberação deste hormônio pela pineal pode trazer um prejuízo neste reparo.

Estudos demonstram que pessoas que trabalham no turno da noite perdem a capacidade de liberação circadiana de melatonina via pineal, pois este hormônio só é liberado via esta glândula no escuro e durante o sono (SACK et al 1997; GOOLEY, et al., 2008; LEE, et al., 2006). Estas pessoas apresentam aumento da incidência de disfunções cardiovasculares, gastrointestinais, reprodutivas, de câncer, de distúrbios de sono e alerta, este último levando naturalmente a uma maior incidência de acidentes com estes trabalhadores e possivelmente riscos para toda a sociedade. Estes trabalhadores noturnos também estão sujeitos mais freqüentemente a problemas psicológicos, sociais e familiares. Tais efeitos são resultados da interferência de suas atividades com o ciclo circadiano normal. Em particular, a temperatura corpórea e a secreção de melatonina parecem ser os responsáveis pela variação do estado de alerta (GOOLEY et al., 2008).

Esses trabalhadores noturnos podem apresentar, após uma extração dentária, um atraso no reparo alveolar. Entretanto, ainda não há estudos que demonstrem tal suposição. Portanto, o presente estudo tem por finalidade avaliar o processo de reparo alveolar em animais no qual ocorre uma supressão da liberação de melatonina pela pineal. Para tanto, os estudos serão

conduzidos em ratos pinealectomizados, em comparação a ratos que não passaram por esta intervenção.

O processo de reparo em feridas de extração dental é definido como o conjunto de reações teciduais desencadeadas no interior do alvéolo após a exodontia, processo de reparo feito à custa de remanescentes do ligamento periodontal, sendo concluído com a completa reparação do alvéolo por tecido ósseo (OKAMOTO et al., 1973).

Diversas metodologias têm sido empregadas no estudo do processo de reparo alveolar, sendo que as pesquisas têm utilizado como metodologia principal a análise de cortes histológicos obtidos em parafina e corados com hematoxilina e eosina (RODRIGUES et al., 2005).

Recentemente, tem-se observado a utilização de novas metodologias que permitem a obtenção de respostas cada vez mais específicas, buscando um melhor entendimento dos processos que envolvam a biologia óssea dentro do processo de reparo alveolar. Metodologias como imunocitoquímica, PCR, hibridização *in situ* têm sido cada vez mais utilizadas dentro da odontologia com intuito de se obter respostas cada vez mais voltadas para aspectos celulares (RODRIGUES et al., 2005).

Uma ferramenta metodológica que tem sido bastante solicitada é a da injeção de fluorocromos em períodos diferentes, buscando uma visão integrada da dinâmica do tecido ósseo formado em diferentes momentos. Tem sido utilizada principalmente em trabalhos que analisam o processo de integração óssea, uma vez que evidenciam o período em que houve o processo de neoformação óssea junto aos implantes (RODRIGUES et al., 2005).

O processo de reparo alveolar é um interessante modelo para estudar o metabolismo do tecido ósseo, pois representa uma situação na qual o organismo cria condições para produção de tecido ósseo com o objetivo de preenchimento total do alvéolo previamente ocupado pelo dente. Estudos mostram que o processo de reparação alveolar ocorre de forma dinâmica, e

envolve várias etapas celulares, iniciando-se pela proliferação fibroblástica, principalmente a partir do ligamento periodontal remanescente, originando um tecido conjuntivo sobre o qual ocorre a deposição de cálcio, levando à formação de trabéculas ósseas, que preencherão o alvéolo (OKAMOTO et al., 1973; CARVALHO et al., 1987). No entanto, o processo só é considerado completo quando o alvéolo encontra-se totalmente preenchido por tecido ósseo neoformado e com a crista alveolar adjacente remodelada. Além de sustentar o elemento dentário, o processo alveolar da maxila e da mandíbula permite a sustentação das reabilitações protéticas, assim como os implantes osseointegráveis e as próteses parciais removíveis. Já se sabe que o sucesso desses tratamentos está relacionado com a qualidade óssea do processo alveolar (LUVIZUTO, 2007).

II. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é averiguar se a pinealectomia (supressão de liberação da melatonina pela pineal) interfere no processo de reparo alveolar de ratos, utilizando fluorocromos.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos (com um mês de idade), mantidos em ambiente de 12/12 horas de claro e escuro (período claro iniciado às 7:00 horas) e temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$. Durante todo o período experimental, a ingestão de ração e água foi *ad libitum*.

2. Pinelectomia

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: 1) Grupo SHAM, animais submetidos à cirurgia simulada de pinelectomia, ou seja, nestes animais foram realizados todos os procedimentos da pinelectomia, exceto a remoção da glândula pineal; 2) Grupo pinelectomizado (PNX), animais submetidos à pinelectomia, ou seja, remoção da glândula pineal. Os ratos foram anestesiados com cloridrato de quetamina (80mg/kg p.c., i.m.) e xilazina (10mg/kg p.c., i.m.) e adaptados a um aparelho estereotáxico. Com auxílio de duas barras auriculares, a cabeça de cada animal foi colocada em posição fixa. 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*. Desta região foram removidos 4,5 mm de diâmetro de calota craniana (com uma broca tipo “trefina” acoplada a um motor de baixa rotação). Após a retirada deste fragmento de osso, o seio venoso (região de intersecção do seio venoso sagital e transversal) foi visualizado e com uma pinça foi retirada (grupo PNX) ou não (grupo SHAM) a glândula pineal, que se localiza logo abaixo deste seio. Após a retirada desta glândula, o fragmento de osso retirado foi recolocado na sua posição inicial, sendo o animal retirado do aparelho estereotáxico. Após a hemostasia, a pele foi suturada com fio de algodão. Como medida

profilática, após a cirurgia foram injetados 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. Exodontia

Após trinta dias da pinealectomia, os animais foram anestesiados conforme descrito acima. Destes animais sob anestesia, foi extraído o incisivo central superior direito, com instrumental especialmente adaptado para este fim, utilizando a técnica proposta por Okamoto et al. (1973). Os alvéolos foram suturados com fio de poliglactina 910 (vicryl 4-0), para se evitar o deslocamento do coágulo; o que causaria prejuízo ao reparo.

Após a extração dental, 10 ratos de cada grupo (SHAM e PNX) foram utilizados para o experimento de fluorocromo.

4. Injeção de fluorocromos

Após a extração dental foram injetados (i.m.) os fluorocromos (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA): calceína (no 14º dia PO) e a alizarina (no 28º dia PO). No 35º dia PO; as maxilas contendo os alvéolos em reparação foram removidas através de um corte tangente à sutura intermaxilar, realizado com lâmina de bisturi, e por um outro corte junto à face distal do último molar, realizado com tesoura. A peça foi cortada removendo-se os excessos de tecido mole.

5. Processamento laboratorial

As peças obtidas foram 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 durante 24 horas. Após a fixação, as peças passaram pela etapa de

desidratação a partir da seqüência crescente de álcoois 70, 90, 95 e 100 gradativamente, com troca de solução a cada 3 dias, em agitador orbital (Line CT – 150, Cientec – Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil), todos os dias, durante 4 horas. No término da desidratação, as peças foram imersas em acetona (Labsynth, Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, Brasil) por 24 horas, a seguir em solução de acetona e polimetil metacrilato lento (PMMAL - Clássico, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, Brasil) na proporção 1:1. Na seqüência, receberam 3 banhos de PMMAL, sendo que no último banho foi acrescentado o catalisador peróxido de benzoíla a 1% (Riedel – De Haën AG, Seelze – Hannover, Germany). O último banho (PMMAL e catalisador) foi realizado com as peças colocadas em tubos de ensaio com tampa e mantidas à temperatura ambiente por 1 (uma) semana aproximadamente, para que a resina polimerizasse. Após a polimerização, os blocos com as peças foram inicialmente desgastados em esmeril. Em seguida, foram desgastados através do desgaste manual progressivo com lixas d'água 3M® granulação 220, 400, 600 e 1200 (3M do Brasil, Sumaré, Brasil), ao abrigo da luz fluorescente, gradativamente até a espessura de 100µm no sentido longitudinal dos alvéolos. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas de vidro e as lamínulas montadas utilizando Óleo Mineral (Óleo Mineral 100% Puro®, Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, SP Brasil) como meio de montagem. Após a fixação das lamínulas, as bordas foram isoladas com esmalte para evitar o esvaziamento do óleo, e como consequência, impedindo o ressecamento do corte.

6. Análise microscópica

A análise das lâminas foi realizada através de microscopia de epifluorescência (Leica DMLB, Heerbrugg, Switzerland), acoplado a uma fonte de luz externa para excitação dos fluorocromos (Leica EL 6000, Heerbrugg, Switzerland), utilizando filtros com fotomultiplicador específicos para calceína e alizarina correspondentes ao comprimento de

onda excitado por cada fluorocromo. Para a aquisição das imagens, foi utilizada uma câmera digital (Leica DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) acoplada a um microscópio de fluorescência e conectada ao computador pelo programa Leica DC 300F onboard. As imagens foram capturadas e mensuradas utilizando-se os programas Axiosion, versão 4,7 (Carl Zeiss, Göettingen, Germany) e ImageLab 2000, versão 2.4.

7. Análise Estatística

Todos os valores serão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística será feita pelo método do teste t de Student para amostras não pareadas, e as diferenças entre os dois grupos serão consideradas significantes quando $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

Para a descrição dos resultados, foi realizada uma análise quantitativa da neoformação óssea dos períodos pós-operatórios (14 e 28 dias - PO). Aos 14 dias após a extração dental, o osso neoformado é representado pela calceína, visualizada na cor verde. Aos 28 dias, a injeção de alizarina, possibilita observar tecido ósseo marcado em vermelho. As análises foram realizadas nos terços apical, médio e cervical do alvéolo dental.

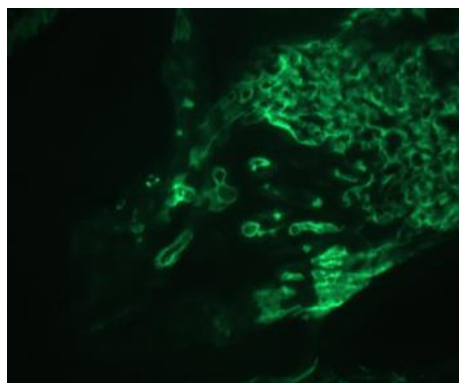
- Terço apical (Fig.1)

No décimo quarto dia de pós-operatório, o grupo PNX apresentou uma diminuição ($\downarrow 68\%$) significativa ($p < 0,05$) na neoformação óssea em comparação ao grupo SHAM no terço apical. Um decréscimo ($\downarrow 45\%$) significativo ($p < 0,05$) também foi observado em PNX em relação ao grupo controle SHAM no 28º dia PO.

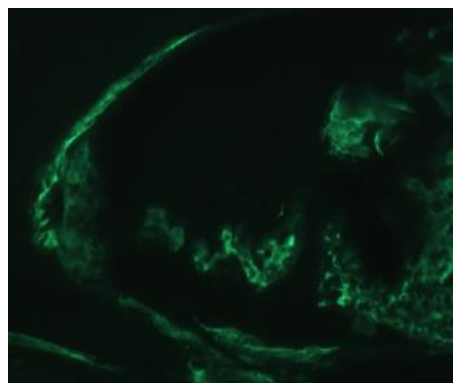
- Terço médio (Fig.2)

No grupo PNX, no 14º dia de PO, foi constatada uma redução ($\downarrow 53\%$) significativa na neoformação óssea em comparação ao grupo SHAM, na mesma data estudada. Resultados similares foram observados no vigésimo oitavo dia de pós-operatório, no qual o Grupo PNX apresentou um menor valor ($\downarrow 50\%$, $p < 0,05$) em relação ao grupo controle SHAM.

A)

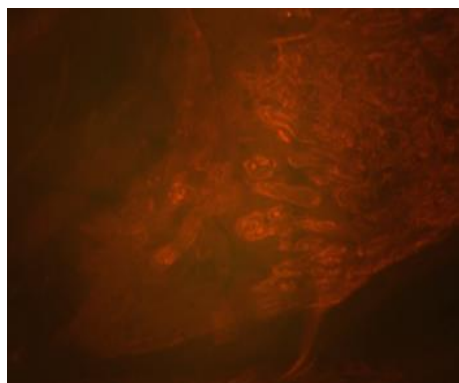


SHAM – 14ª dia PO

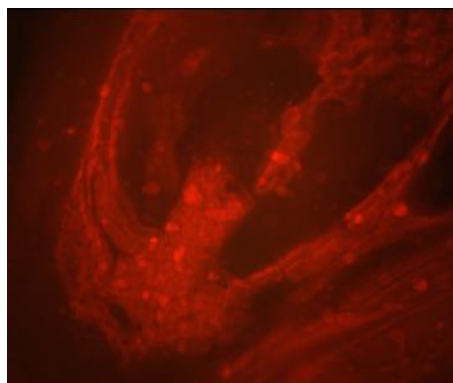


PNX – 14ª dia PO

B)



SHAM -28º dia de PO



PNX- 28º dia de PO

C)

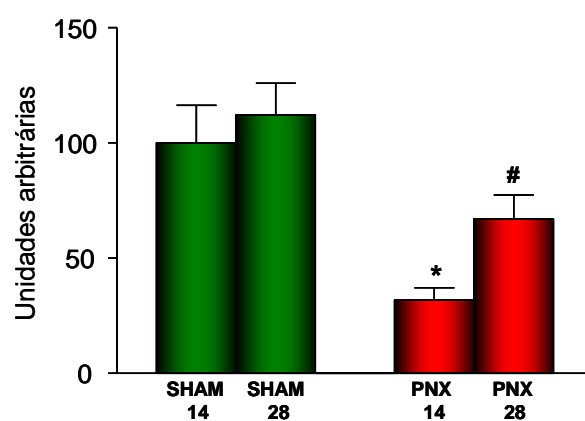
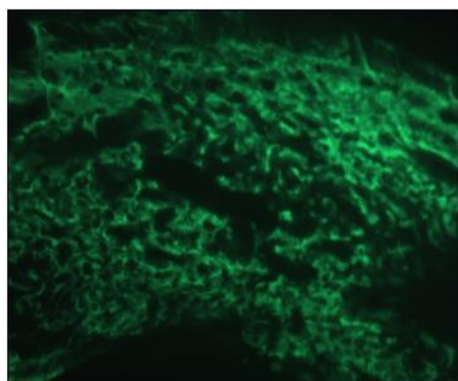


Fig.1. Avaliação do processo de reparo alveolar de ratos controle (SHAM) e pinealectomizados (PNX) no 14º e 28º dia de pós-operatório (PO) no terço apical alveolar. Em A, imagens referentes aos grupos SHAM e PNX no 14º dia de PO. Em B, imagens referentes aos grupos SHAM e PNX no 28º dia de PO. Em C, valores apresentados como médias e erro padrão da média de 9 animais.

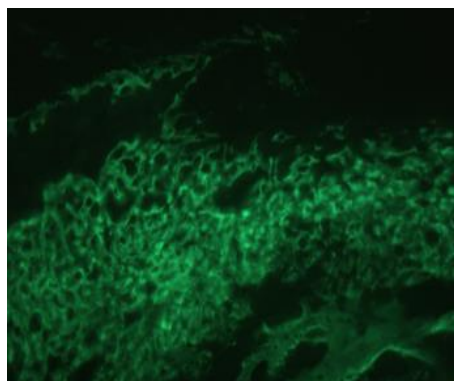
* $p < 0,05$ SHAM 14 vs PNX 14.

$p < 0,05$ SHAM 28 vs PNX 28.

A)

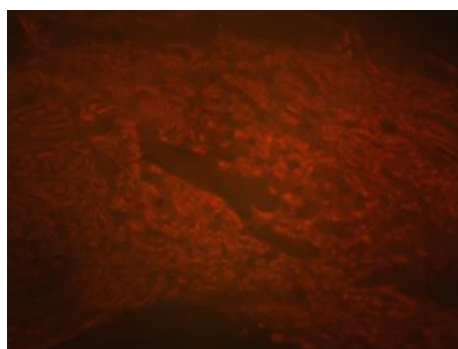


SHAM – 14ª dia PO

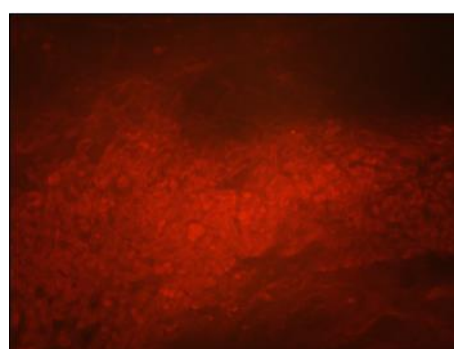


PNX – 14ª dia PO

B)



SHAM -28ª dia de PO



PNX – 28ª dia PO

C)

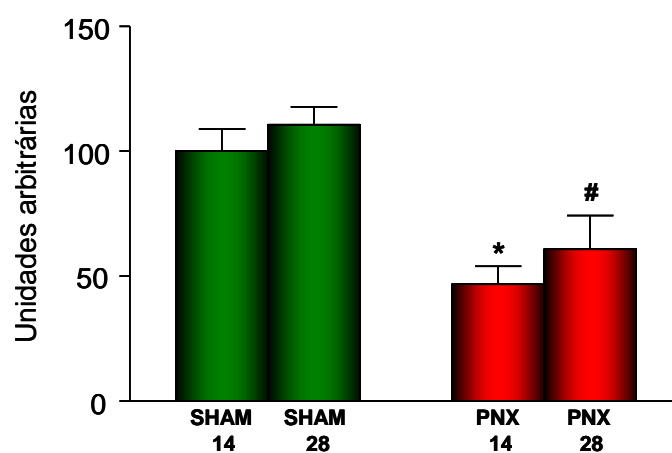


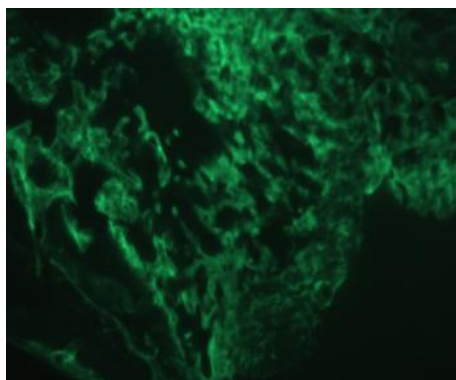
Fig.2. Avaliação do processo de reparo alveolar de ratos controle (SHAM) e pinealectomizados (PNX) no 14º e 28º dia de pós-operatório (PO) no terço médio alveolar. Em A, imagens referentes aos grupos SHAM e PNX no 14º dia de PO. Em B, imagens referentes aos grupos SHAM e PNX no 28º dia de PO. Em C, valores apresentados como médias e erro padrão da média de 9 animais.

* $p < 0,05$ SHAM 14 vs PNX 14.
$p < 0,05$ SHAM 28 vs PNX 28.

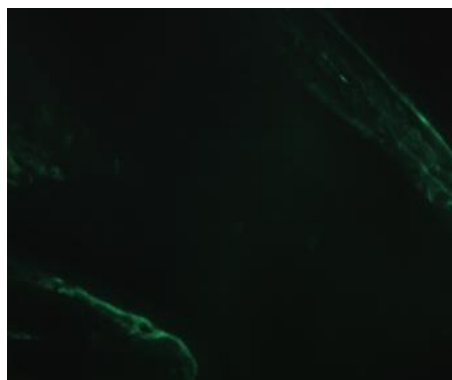
- Terço cervical (Fig.3)

No 14º dia PO, o grupo PNX apresentou uma diminuição (↓44%) significativa ($p < 0,05$) na neoformação óssea em comparação ao grupo SHAM no terço apical. Uma redução (↓60%) significativa ($p < 0,05$) também foi observada em PNX em relação ao grupo controle SHAM no 28º dia PO.

A)

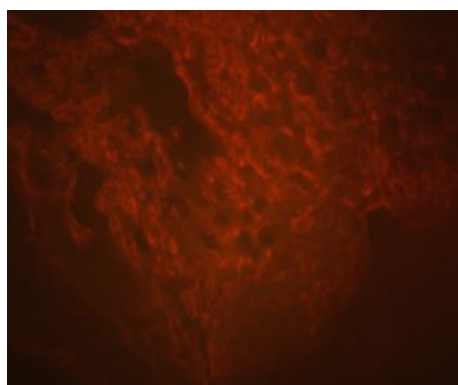


SHAM – 14ª dia PO

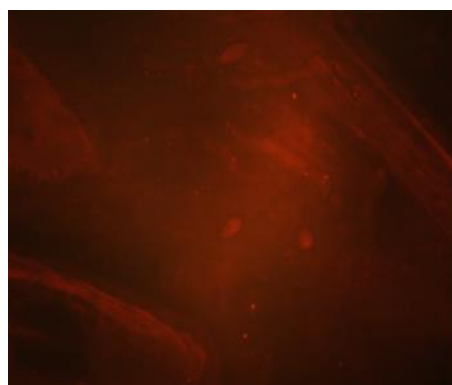


PNX – 14ª dia PO

B)



SHAM -28º dia de PO



PNX- 28º dia de PO

C)

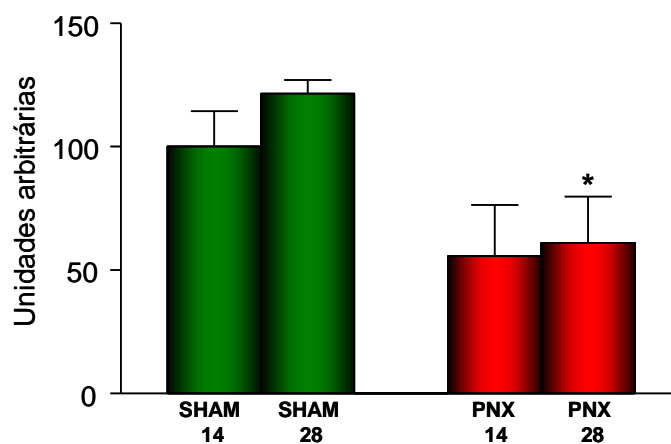


Fig.2. Avaliação do processo de reparo alveolar de ratos controle (SHAM) e pinealectomizados (PNX) no 14º e 28º dia de pós-operatório (PO) no terço cervical alveolar. Em A, imagens referentes aos grupos SHAM e PNX no 14º dia de PO. Em B, imagens referentes aos grupos SHAM e PNX no 28º dia de PO. Em C, valores apresentados como médias e erro padrão da média de 9 animais.

* $p < 0,05$ SHAM 14 vs PNX 14.

$p < 0,05$ SHAM 28 vs PNX 28.

V. DISCUSSÃO

Embora a Odontologia Preventiva tenha adquirido elevada importância nos últimos anos, a extração dental ainda está entre os procedimentos cirúrgicos mais realizados na cavidade bucal. Por isso, torna-se importante o conhecimento das alterações celulares ocorridas no interior do alvéolo, sobretudo, o conhecimento da biologia e fisiologia dos tecidos e células para que o procedimento cirúrgico possa ser exercido corretamente, garantindo solidez à sua execução. (RODRIGUES et al, 2005).

O processo de reparo em feridas de extração dental é definido como o conjunto de reações teciduais desencadeadas no interior do alvéolo seguida à exodontia, processo este feito à custa de remanescentes do ligamento periodontal, sendo concluído com a completa reparação do alvéolo por tecido ósseo (OKAMOTO et al., 1973).

Entre os fatores de ordem local que interferem no processo de reparo alveolar estão: as complicações ou traumas provenientes da técnica cirúrgica, como a fratura dental, a fratura de tábua óssea ou de cristas alveolares; as alveolectomias; a utilização de brocas e cinzéis; os cuidados pós-exodônticos, como a curetagem abusiva ou inadequada e a irrigação excessiva com soro fisiológico; os efeitos proporcionados pela irrigação alveolar com anestésicos locais e/ou infiltração em seus tecidos adjacentes e as condições periodontais e infecções (OKAMOTO et al., 1973). Entre os fatores de ordem sistêmica que interferem no processo de reparo alveolar estão: o diabetes, o uso crônico de corticóides e drogas imunossupressoras, e desordens hormonais, entre outros.

A sequência da reparação alveolar pode ser descrita, em linhas gerais, como se segue: (1) formação do coágulo; (2) substituição do coágulo por tecido de granulação; (3) substituição

do tecido de granulação por tecido conjuntivo; (4) surgimento do tecido osteóide; (5) amadurecimento gradativo da matriz óssea e; (6) epitelização da ferida cirúrgica (OKAMOTO et al., 1973).

Como comentado anteriormente, diversas metodologias têm sido empregadas para o estudo do processo de reparo alveolar, tais como: imunocitoquímica, PCR, hibridização *in situ*, histológica e histométrica, apresentando-se relevantes na maioria dos trabalhos, sejam associadas ou não a outros métodos de estudo. (RODRIGUES et al, 2005).

A utilização de fluorocromos para análise do processo de reparação em feridas de extração dentária em ratos apresenta vantagens, tais como: 1) diminuição no número de animais utilizados para o experimento, em função das injeções dos fluorocromos serem realizadas no mesmo rato; 2) menor variabilidade s resultados devido às análises dos períodos do processo de reparo ser realizadas no mesmo animal. Outra característica desta metodologia é que não se evidenciam células, mas apenas as faixas fluorescentes, que mostram o processo de neoformação óssea. (RODRIGUES et al, 2005).

A análise com os fluorocromos permitiu avaliar a deposição de cálcio ocorrida para cada período de injeção. Foram utilizados os fluorocromos: calceína, injetada aos 14 dias após a exodontia (visualização do cálcio depositado em verde) e a alizarina, injetada aos 28 dias pós-operatórios (visualização do cálcio depositado em vermelho). Além disso, a quantificação da área marcada pelo fluorocromo permite a realização de uma análise quantitativa do processo de mineralização do tecido ósseo nos dois períodos de análise estabelecidos neste projeto (KAYATT, 2006).

Métodos de reconstrução óssea são pré-requisitos essenciais para a reabilitação funcional de perdas ósseas traumáticas ou decorrentes de patologias. Há uma constante busca por meios de se obter um reparo mais rápido e com maior densidade óssea (RAGHOEBAR et al., 2005).

Além do controle do ciclo circadiano, a melatonina vem sendo relacionada com diversas funções específicas, estando relacionada como agente antioxidante, substância oncoestática, mediador inflamatório, ações antidepressivas, cardio-protetora, osteogênica, e também sendo relacionada ao envelhecimento, a obesidade, a maturação sexual (PANDI-PERUMAL et al., 2006).

A administração de melatonina modifica a síntese e a liberação circadiana de hormônio do crescimento (gh), insulin-like growth factor-I (IGF-I), interleucina-1, fator de necrose tumoral alfa, diversas citocinas, transforming growth factor, VEGF, e dos hormônios adrenais, tireóideos e testiculares (PANDI-PERUMAL et al., 2006).

O tratamento com melatonina resulta em um significativo aumento no reparo tecidual; este efeito pode ser em parte atribuído pelo aumento da angiogênese e da elevada expressão de VEGF HO-1, HO-2, arginase e COX-2; e de sua seletiva inibição da expressão de iNos, no início do reparo (PUGAZHENTHI et al., 2008).

Os nossos resultados demonstraram que a pinealectomia promove alterações negativas no processo de reparo alveolar, visto pela diminuição na neoformação óssea do grupo PNX em comparação com os ratos controle, em todos os períodos de PO e em todos os terços alveolares (apical, médio e cervical) estudados.

A partir destes resultados, podemos inferir que embora a melatonina seja produzida em diversos outros órgãos como: retina, medula óssea, plaquetas, trato gastro-intestinal, pele e linfócitos, esse sítios extrínsecos à glândula pineal, não são capazes de suprir as concentrações fisiológicas deste hormônio, necessárias para um adequado reparo alveolar.

Conforme descrito na introdução, a melatonina pode interferir no reparo alveolar de diversas formas, seja pela diminuição/aumento da formação de fibrilas colágenas, do tempo de diferenciação dos osteoblastos, do stress oxidativo e pela modulação do processo

inflamatório e da liberação de fatores de crescimento. Portanto, a falta da liberação deste hormônio pela pineal prejudica este reparo.

MAESTRONI (1993) mostra que a melatonina, presente na medula óssea, tem alta afinidade por linfócitos T-Helper. A ativação dos receptores de melatonina, nestas células, aumenta a produção de IL-4, a qual causa liberação de fatores de crescimento na medula óssea. OSTROWSKA et al. (2003) comprovaram a menor concentração de IGF-I, em ratos pinealectomizados.

Os fatores de crescimento representam uma classe de mediadores biológicos que regulam a proliferação, quimiotaxia e diferenciação celular (LYNCH et al., 1989). A aplicação terapêutica desses fatores, objetivando a regeneração de um determinado tecido, fundamenta-se na tentativa de mimetizar os eventos biológicos responsáveis pela formação (estágio embrionário) e manutenção (estágio pós-natal) deste tecido (SCHILEPHAKE et al., 2002).

O papel de fatores de crescimento no processo de cicatrização tem sido demonstrado nos últimos anos. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e TGF são conhecidos fatores de crescimento, secretado durante cicatrização por os grânulos α das plaquetas, macrófagos e fibroblastos. Embora seus mecanismos de ação, bem como a extensão de sua influência não são totalmente compreendidos, esses fatores mostraram um aumento no conteúdo de colágeno na fase inicial da cicatrização das feridas. Os fatores de crescimento ligam-se a receptores celulares específicos e induzem as células a migrar, a dividir, e para produzir os outros elementos que influenciam a processo de reparo da ferida.

SOYBIR et al. (2003) demonstraram que a administração de melatonina em ratos leva à significativa melhoria da cicatrização de feridas cutâneas, relatando um aumento no número de vasos sanguíneos, fibras colágenas e da densidade de fibroblastos após a aplicação, e

discorre que o mecanismo pelo qual a melatonina age é ainda dúbio, mas sugere que o provável efeito pode ser secundariamente relacionado com fatores de crescimento.

DROBNIK et al. (2008) foram os primeiros a demonstrar a influência da melatonina na regulação da deposição de colágeno após infarto do miocárdio. A suplementação com melatonina exógena elevou a acumulação de colágenos nas áreas do coração danificadas. A pinealectomia cirúrgica ou farmacologia diminuiu esta deposição. Este acúmulo de colágeno é positivo, pois acelera o reparo e reduz uma série de complicações. Os efeitos anti-oxidantes diretos da melatonina reduziram o volume da área de injúria causada pela isquemia.

ROTH et al. (1999) relataram que a melatonina pode promover similarmente a MC3T3-E1, a diferenciação celular e a mineralização. Além disso, estudos preliminares demonstraram que este hormônio aumenta a produção de pró-colágeno tipo I nas células ósseas e pode modular *in vitro* a expressão óssea de sialoproteína, o aumento da expressão gênica sialoproteínas e outras proteínas ósseas marcadoras, incluindo fosfatase alcalina, osteopontina, e osteocalcina. Portanto, a melatonina é ser capaz de promover a diferenciação do osteoblasto e mineralização da matriz *in vitro*.

Em outro estudo, *in vivo*, uma injeção intra-peritoneal diária em ratos jovens com 100 mg/kg de p.c. de melatonina, durante 21 dias, aumentou significativamente a densidade mineral óssea nos fêmures do grupo estudado, (SATAMURA et al., 2006). TAKECHI et. al. (2008), utilizando esta mesma concentração de melatonina, comprovaram que uma dose diária deste hormônio, durante 4 semanas, aumentou significativamente a formação óssea na região circundantes aos implantes ósseointegráveis, em tíbias de ratos. Consequentemente, estes trabalhos fornecem provas conclusivas de que o tratamento com melatonina *per si* leva a um aumento no volume de osso neoformado, *in vivo* e *in vitro*.

Assim como CUTANDO et al. (2008) e TAKECHI et. al. (2008), nosso trabalho revela a influência da melatonina no reparo de feridas ósseas. Havendo sempre uma concordância

entre os estudos, nos quais um reparo mais efetivo e em menos tempo foi sempre encontrado com a suplementação deste hormônio. Do mesmo modo, nosso trabalho encontrou o efeito no sentido contrário, quando se diminui a concentração desse hormônio.

Estudos demonstram que pessoas que trabalham no turno da noite perdem a liberação circadiana de melatonina via pineal, pois este hormônio só é liberado via esta glândula no escuro e durante o sono (SACK et al., 2007; GOOLEY et al., 2008; LEE et al., 2006). Estes trabalhadores noturnos apresentam aumento da incidência de disfunções cardiovasculares, gastrintestinais, reprodutivas, de câncer, de distúrbios de sono e alerta, este último levando naturalmente a uma maior incidência de acidentes com estas pessoas e possivelmente riscos à toda sociedade. Estes trabalhadores estão sujeitos mais frequentemente a problemas psicológicos, sociais e familiares. Tais efeitos são resultados da interferência de suas atividades com o ciclo circadiano normal. (GOOLEY, et al., 2008).

Estes trabalhadores noturnos, após uma extração dentária, poderão apresentar um reparo alveolar alterado. O presente estudo comprovou que o processo de reparo alveolar em animais PNx (nos quais ocorreu uma supressão da liberação de melatonina pela pineal), foi significativamente menor ao dos ratos controle.

Todas essas citações acima comprovam, assim como em nosso trabalho, a importância da preservação do funcionamento normal da glândula pineal e seu principal produto, a melatonina, sobre o reparo de vários tipos celulares e teciduais.

Mais pesquisas são necessárias para estabelecer em maior detalhe os efeitos do ME sobre o processo de cicatrização das feridas ósseas e cutâneas. A melatonina é uma substância facilmente disponível, produz poucos efeitos colaterais, e é relativamente barata, facilitando assim seu uso na pesquisa experimental. Em poucos anos a ME poderá deixar de ocupar seu lugar apenas experimental e assumir importante e irreversível papel na clínica médico-odontológica.

VI. CONCLUSÃO

A partir dos nossos resultados, concluímos que:

Em animais PNX, há uma diminuição na neoformação óssea, após o reparo alveolar, em relação aos ratos controle, em todos os períodos pós-operatório (14º e 28º dias de PO) e porções do alvéolo em reparo (terço apical, médio e cervical) nos ratos pinealectomizados. Estes resultados podem enfatizar: 1) a importância do uso de melatonina após exodontias, principalmente em trabalhadores noturnos, visto que estes perdem a liberação circadiana de ME pela via pineal ; 2) a importância da glândula pineal no controle do metabolismo ósseo.

VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A procura por um substituto ósseo capaz de suprir às exigências físico-biológicas para a reconstrução de defeitos ósseos causados por fatores traumáticos, patológicos e ou fisiológicos tem sido um dos grandes desafios da área médico-odontológica nos últimos tempos. Diversas são as possibilidades relatadas na literatura, dentre elas podemos citar os enxertos autógenos intra e extra-bucais, os enxertos alógenos, xenógenos, os implantes aloplásticos, e a regeneração óssea guiada. A suplementação desses métodos com a melatonina, se torna aparentemente viável, visto seus efeitos ósseo-indutivos, principalmente em pacientes, que por motivo qualquer perdem sua liberação circadiana deste hormônio.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M.C.R.; OKAMOTO, T.; Influência do stress no processo de reparo em feridas de extração dental. Estudo histológico em ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, v.18, p. 119-130, 1989

AMLER, M.H.; JOHNSON, P.L.; SALMAN, I.; Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 61, p. 32-44, 1960

ASTRAND, P.; CARLSSON, G.E.: Changes in the alveolar process after extractions in the white rat. A histologic and fluorescent microscopic study. **Acta Odont. Scand.** v. 27, p. 113-127, 1969

BESKONAKLI, E.; PALAOGLU, S.; RENDA, N.; KULACOGU, S.; TURHAN, T.; TASKIN, Y.; The effect of pinealectomy on immune parameters in different age groups in rats: results of the weekly alteration of the zinc level and the effect of melatonin administration on wound healing. **J. Clin. Neuro.** v. 7, n. 4, p.320-324, 2000.

BOYNE, P.J. Osseous repair of the postextraction alveolus in man. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** v. 21, p. 805-813, 1966.

CARDINALI, D.P.; LADIZESKY, M.G.; BOGGIO, V.; CUTRERA, R.A.; MAUTALEN, C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. **J. Pineal Res.**, v. 34, p. 81-87, 2003.

CARLSSON, G.E.H.; THILANDER, H.; HEDEGARD, B.; Histologic changes in the upper alveolar process after extractions with or without insertion of an immediate full denture. **Acta Odont. Scand.**, v. 25, p. 21, 1967.

CARVALHO, A.C.; OKAMOTO T. Interferências sistêmicas sobre o processo de reparo em feridas de extração dental. **Ver. Odontol. UNESP**, v. 14, p. 27-33, 1985.

CARVALHO, A.C.P.; OKAMOTO, T. **Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica**. São Paulo: Panamericana, 1987. 139p.

CUTANDO, A.; GOMEZ-MORENO, G.; ARANA, C.; ACUNA-CASTROVIEJO, D.; REITER, R.J.; Melatonin: potential functions in the oral cavity. **J Periodontol**, v. 78. p. 1094-1102, 2007.

CUTANDO, A.; ARANA, C.; GOMEZ-MORENO, G.; ESCAMES, A.L.; FERRERA, M.J.; REITER, R.J.; CASTROVIEJO, D.A. Local Application of Melatonin Into Alveolar Sockets of Beagle Dogs Reduces Tooth Removal–Induced Oxidative Stress. **J. Periodontol.** v. 78, n.3, p. 576-583, 2007.

CUTANDO, A.; GÓMEZ-MORENO, G.; ARANA, C.; MUNÓZ, F.; LOPEZ-PENÃ, M.; STEPHENSON, J.; REITER, R.J. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. **J. Pineal Res.**, v. 45, n.2, p. 174-179, 2008.

CUTANDO, A.; GÓMEZ-MORENO, G.; VILLALBA, J.; FERRERA, M.J.; ESCAMES, G. ACUNÃ-CASTROVIEJO, D.; Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. **J. Pineal Res.**, v. 35, p. 239–244, 2003.

FERNANDES, P.A.C.M.; CECON, E.; MARKUS, R.P.; FERREIRA, Z.S. Effect of TNF- α on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a ‘feedback’ of the immune response on circadian timing. **J. . Res.** v. 41, p. 344–350, 2006.

FERREIRA, Z.S.; FERNANDES, P.A.C.M.; DUMA, D.; ASSREUY, J.; AVELLAR, M.C.W.; MARKUS, R.P. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. **J. Pineal Res.**, v. 38, p. 182–188, 2005.

GOOLEY, J. “Treatment of Circadian Rhythm Sleep Disorders with Light” **Ann. Acad. Med. Singapore.** v. 37, p. 669-676, 2008.

GUGLIELMOTTI, M.B.; CABRINI, R.L.; Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic and histometric study. **J. Oral Maxillofac. Surg.** v. 43, p.359-364, 1985.

GUGLIELMOTTI, M.B.; UBIOS, A.M.; CABINI, R.L.; Alveolar wound healing after X-irradiation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 44, p. 972-976, 1986

GUGLIELMOTTI, M.B.; UBIOS, A.M.; CABRINI, R.L. Alveolar wound healing alteration under uranyl nitrate intoxication. **J. Oral Pathol.**, v. 14, p. 565-572, 1985.

KAYATT, FE; Análise experimental de copolímero na estabilidade primária de implantes osseointegráveis. Avaliação microscópica em ratos. Araçatuba. 38p Tese (Doutorado em Odontologia, Área de Concentração Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2006.

KOYAMA, H.; NAKADE, O.; TAKADA, Y.; KAKU, T.; LAU, KH.; Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through downregulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. **J. Bone Miner. Res.** v.17, p.1219–1229, 2002.

LADIZESKY, M.G.; CUTRERA, R.A.; BOGGIO, V.; SOMOZA, J.; CENTRELLA, J.M.; MAUTALEN, C.; CARDINALI, D.P.; Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. **Life Sci.** v. 70, p.557–565, 2001.

LEE, C.; MARK, R.; EASTMAN, C.; A Compromise Phase Position for Permanent Night Shift Workers: Circadian Phase after Two Night Shifts with Scheduled Sleep and Light/Dark Exposure. **Chronobiol. Int.** v.23, n.4, p.859-875, 2006.

LYNCH, S.E.; Colvin, R.B.; Antoniades, H.N.; Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. **J. Clin. Invest.** v.84, p.640-646, 1989.

Lotufo, C.M.C.; Lopes, C.; Dubocovich, M.L.; Farsky, S.H.; Markus, R.P. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. **Eur. J. Pharmacol.** v. 430, p.351–357, 2001.

MAESTRONI, G.J.M.; CARDINALI, D.P.; ESQUIFINO, A.I.; PANDI-PERUMAL, S.R.; Does melatonin play a disease-promoting role in rheumatoid arthritis? **J Neuroimmunol**, v. 158, p. 106–111, 2004.

MAESTRONI, G.J.M. The immunoendocrine role of melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 14, p. 1–10, 1993.

MAESTRONI, G.J.; CONTI, A.; PIERPAOLI, W.; Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. **J. Neuroimmunol.**, v. 13, p. 19–30, 1986.

MAESTRONI, G.J.; The immunotherapeutic potential of melatonin. **Expert Opin. Invest. Drugs**, v. 10, p. 467–476, 2001.

NAKADE, O.; KOYAMA, H.; ARIJI, H.; YAJIMA, A.; KAKU, T.; Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. **J. Pineal Res.**, v. 27, p. 106–110, 1999.

OKAMOTO, T.; FIALHO, A.C.V.; Estudo histológico comparativo entre dois métodos de obtenção de cortes de alvéolos de ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, v.19, p.63-64, 1990.

OKAMOTO, T.; RUSSO, M.C.; Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. **Rev. Fac. Odontol. Araçatuba**, v. 2, p. 153-164, 1973

OSTROWSKA, Z.; KOS-KUDLA1, B.; NOWAK1, M.; The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats. **Endocr. Regul.**, v. 37, p.211–224, 2003.

PANDI-PERUMAL, S.R.; SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G.J.M.; CARDINALI, D.P.; POEGGELER, B.; HARDELAND, R. Melatonin Nature's most versatile biological signal? **FEBS Journal**, v. 273, p.2813–2838, 2006.

PONTES, G.N.; CARDOSO, E.C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; MARKUS, R.P. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF- α increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. **J. Pineal Res.**, v. 43(4), p. 365-371, 2007.

RAGHOEBAR, G. M.; SCHORTINGVIS, J.; LIEM, R.S.; RUBEN, J. L.; VAN DER WAL, J. E. VISSINK,A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? **Clin. Oral Impl. Res.**, v.16, p. 349-356. 2005.

RODRIGUES, T.S. **Avaliação da dinâmica do processo de reparo alveolar utilizando fluorocromos**. Araçatuba : [s.n.], 2005. Dissertação (mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2005.

ROTH J.A.; KIM B.G.; LIN W.L.; CHO M.I.; Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p.22041–22047, 1999.

SACK R.L.; LEWY A.J.; “Melatonin as a chronobiotic: treatment of circadian desynchrony in night workers and the blind”. **J. Biol. Rhythms**, v.12 n.6, p. 595-603, 1997.

SATOMURA, K.; TOBIUME, S.; TOKUYAMA, R.; YAMASAKI, Y.; KUDOH, K.; MAEDA, E.; NAGAYAMA, M.; Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. **J. Pineal Res.**, v. 42, p. 231–239, 2007.

SCHILEPHAKE, H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. **Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.**, v. 31, p. 469-484, 2002.

SHIMABUCORO, CE. **Marcação fluorescente de cálcio em tecidos de suporte após a movimentação dentária experimental em ratos**. 61 f. 2007. Dissertação (Mestrado em Ortodontia). Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2007.

SILVA, C.L.M.; TAMURA, E.K.; MACEDO, S.M.D.; CECON, E.; BUENO-ALVES, L.; FARSKY, S.H.P.; FERREIRA, Z.S.; MARKUS, R.P.; Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, v.151, p. 195–205, 2007.

SRINIVASAN V.; PANDI-PERUMAL S.R.; MAESTRONI G.J.; ESQUIFINO A.I.; HARDELAND R.; CARDINALI D.P.; Role of melatonin in neurodegenerative diseases. **Neurotox. Res.**, v. 7, p. 293–318, 2005.

SUZUKI, N.; SOMEI, M.; KITAMURA, K.; REITER, R.J.; HATTORI, A. Novel bromomelatonin derivatives suppress osteoclastic activity and increase osteoblastic activity:implications for the treatment of bone diseases. **J.Pineal Res.**, v. 44, n.3, p. 326-334; 2007.

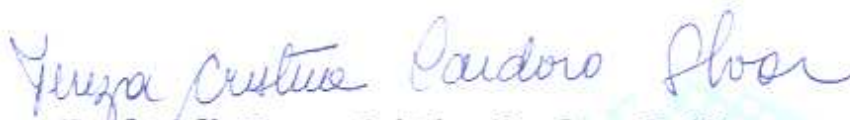


COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DO PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR EM RATOS PINEALECTOMIZADOS"** sob responsabilidade do **Profa. Ass Doris Hissako Sumida** e colaboração de **Roberta Okamoto, Carolina Chiantelli Claudio Coutinho, Tetuo Okamoto, João César Bedran de Castro** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 23/04/2009 de acordo com o protocolo 2009-00002312.

Araçatuba, 23 de Abril de 2009



Prof.ª Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva

Presidente da CEEA- FOA/UNESP