



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS DENTÁRIOS E PRÓTESE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM REABILITAÇÃO ORAL



LETÍCIA FERREIRA MONTARELE

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS EFEITOS DO TRATAMENTO TÓPICO DA
MELATONINA ASSOCIADA À ESPONJA DE COLÁGENO E À PROTEÍNA
RHBMP-2 SOBRE O REMODELAMENTO ÓSSEO**

Ribeirão Preto

2023

LETÍCA FERREIRA MONTARELE

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS EFEITOS DO TRATAMENTO TÓPICO DA
MELATONINA ASSOCIADA À ESPONJA DE COLÁGENO E À PROTEÍNA
RHBMP-2 SOBRE O REMODELAMENTO ÓSSEO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre no Programa de Reabilitação Oral.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Orientadora: Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus da USP – Ribeirão Preto

Montarele, Letícia Ferreira

Análise morfológica dos efeitos do tratamento tópico da melatonina associada à esponja de colágeno e à proteína rhbmp-2 sobre o remodelamento ósseo/ Letícia Ferreira Montarele; orientador, João Paulo Mardegan Issa. – 2022.

143 f.: il. + 2 DVDs

Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Versão original

1. Melatonina; 2. rhBMP-2; 3. Remodelação óssea; 4. Reparo ósseo

FOLHA DE APROVAÇÃO

MONTARELE, L. F. Análise morfológica dos efeitos do tratamento tópico da melatonina associada à esponja de colágeno e à proteína rhbmp-2 sobre o remodelamento ósseo.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre no Programa de Reabilitação Oral.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Presidente

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

À Deus, pelo dom da vida, força e iluminação no caminho.

*A minha querida prima **Juliana Ferreira (in memorian)**, pelo eterno apoio, cumplicidade e admiração, e sempre esteve presente e me apoiou incondicionalmente em todas as etapas da minha vida.*

*Aos meus pais, **Antônio Marcos Montarele e Dulcinea Luiza Ferreira Montarele**, minha base. Sempre se dedicaram e estiveram presentes em todos os dias da minha vida, apoiando minha formação e me ensinando a correr atrás dos meus sonhos, se hoje estou aqui é graças a vocês. A vocês dedico todo o meu amor!*

*Ao meu irmão, **Angellino Marcos Montarele**, meu amigo e companheiro. Tudo que faço é pensando em te deixar orgulhoso! Meu eterno amor a você!*

Agradecimento Especial

Ao meu orientador Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa, agradeço pela oportunidade, por todo esse tempo de orientação, pela dedicação, paciência, profissionalismo e ensinamentos. Com você aprendi a amar ainda mais a área acadêmica e a paixão em contribuir com as descobertas científicas.

Ao técnico, Dr. Dimitrius Leonardo Pitol, por toda paciência, dedicação e por todas as horas no laboratório, sempre ao meu lado me incentivando. Seus ensinamentos foram muito valiosos, sempre serei grata.

Ao Prof. Dr. Bruno Fiorelini, que mesmo de longe, sempre se fez presente, me auxiliou e me incentivou sempre que foi preciso. A você, minha eterna gratidão!

Gratidão!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada pelo Diretor Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, por proporcionar formação de qualidade aos alunos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro, chefe do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, por sua dedicação e respeito inestimável.

A Profa. Dra. Andréa Cândido dos Reis, Coordenadora do curso de Pós-graduação em Odontologia (Reabilitação Oral), pela dedicação ao Programa e crescimento profissional dos pós-graduandos.

Agradeço a Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza por ser minha relatora e por todas as considerações feitas ao meu projeto.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto FORP-USP pelos ensinamentos recebidos durante toda minha graduação e pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão do auxílio regular referente a essa pesquisa (2019/03699-1) e pelo auxílio publicação, que permitiu a publicação do artigo em uma revista de alto impacto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPQ, pela concessão da primeira Bolsa de Mestrado (131348/2019-1).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES, pela concessão da segunda Bolsa de Mestrado.

Aos secretários do Departamento de Materiais Dentário e Prótese Wagner Del Gatto, Fernanda Talita de Freitas e Regiane Tirado Damasceno e pela dedicação ao Departamento, Professores e Pós-graduandos e por toda paciência nessa caminhada.

Aos secretários do Departamento de Biologia Básica e Oral, pela dedicação ao Departamento, Professores e Pós-graduandos.

Ao Secretário do Serviço de Pós-Graduação, Mauro Henrique Leoni Bernardo, pela dedicação e disponibilidade de tempo dispensadas sempre que necessário.

Aos meus amigos Camila Carla Alves, Caroline Vieira Fortes, Filipe Santos Ferreira Mendes, Gabriela Leite Pedroso, Hian Parize, João Vicente Calazans Neto, Juliana Dias Corpa Tardelli, Claudinei Chinarelli Colus Junior, Larissa Matos Oliveira, Leonardo de Pádua Andrade, Maria Júlia Pagliarone, Marina Paulini Ribeiro, Nicole Palloni Zanatto, Rafael Marquesin, Samantha de Oliveira Chagas, Yumi Chokyu Del Rey que tornaram esta caminhada na pós-graduação mais leve.

A sociedade brasileira que contribui para a formação e manutenção das Instituições Públicas de Ensino Superior do Brasil

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Epígrafe

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

(Albert Einstein)

LISTA DE TABELA

Tabela 1.	Hormônios e citocinas e suas respectivas funções no remodelamento ósseo.....	42
Tabela 2.	Distribuição dos tratamentos e grupos experimentais.....	56
Tabela 3.	Análise estatística.....	64
Tabela 4.	Intensidade de reação imunoistoquímica para todos os fatores investigados em todos os grupos experimentais.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática do procedimento da confecção do defeito no osso da calvária decorrente do atrito causado pela rotação de uma broca tipo trefina cilíndrica em baixa rotação, resultando na remoção do bloco ósseo e na preservação da dura-máter.....	56
Figura 2.	Demonstração da técnica utilizada para confecção dos defeitos ósseos. A - Asspesia da região operada. B – incisão sagital para confecção de retalho total. C – divulsão dos tecidos, para exposição da calvária. D – confecção dos defeitos ósseos bilaterais.....	57
Figura 3.	Materiais utilizados para os tratamentos experimentais (melatonina, rhBMP2, esponja de colágeno).....	57
Figura 4.	Representação do tipo de análise realizada, nos defeitos ósseos bilaterais.....	58
Figura 5.	Processador de tecidos automatizado (para desidratação nos alcoóis) – A. Central de inclusão em parafina – B. Momento da inclusão do fragmento ósseo na parafina – C. Fragmento ósseo já incluído na parafina – D. Bloco de parafina pronto para confecção das lâminas – E.....	59
Figura 6.	Micrótomo utilizado para confecção corte dos blocos de parafina.....	60
Figura 7.	Cabine para coloração das lâminas em tricômico de masson.....	60
Figura 8.	Exemplos de alguns cortes histológicos, corados com tricômico de masson, observados em microscopia.....	61
Figura 9.	Corte histológico, corado com tricômico de masson, referente a cada grupo analisado, observado em microscopia para realização das análises quantitativas e qualitativas.....	62
Figura 10.	Aspectos quantitativos e qualitativos da região dos defeitos ósseos na calvária dos animais em todos os grupos experimentais. (A): O gráfico 1 mostra a área de tecido ósseo neoformado na região dos defeitos ósseos do grupo de controle e dos grupos experimentais. O gráfico revela que houve uma diferença significativa nos grupos 6 e 8 em relação a todos os outros grupos. (B-J): A coloração tricrômio de Masson foi realizada para evidenciar a formação de tecido ósseo na área de reparo. Foram tiradas fotomicrografias para mostrar o tecido ósseo recém formado na área do defeito de cada grupo. A presença de células osteoblásticas e tecido ósseo recém formado pode ser observada, indicando a reparação óssea dos locais receptores. Coloração do tricrômio de Masson. Barra de escalas: 46 um. *: maiores quantidades de tecido ósseo neoformado, indicando os melhores resultados da terapia utilizada. *: quantidades menores de tecido ósseo recém formado na região da ferida. +: grandes quantidades de tecido ósseo recém formado, mas sem diferença significativa. Seta vermelha: lacunas ósseas.....	72

Figura 11.	Imagens representativas da imunohistoquímica para coloração VEGF. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (++); (D) grupo 5 com marcação considerada (++) , o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris foi manchada. Barra de escala: 46 µm.....	74
Figura 12.	Imagens representativas da imunohistoquímica para coloração do CD31. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (+); (D) grupo 6 com marcação considerada (+); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris contra-manchada. Barra de escala: 46 µm.....	75
Figura 13.	Imagens representativas da imunohistoquímica para coloração de OPG. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (+); (D) grupo 6 com marcação considerada (++++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris contra-manchada. Barra de escala: 46 µm.....	76
Figura 14.	Imagens representativas da imunohistoquímica para coloração IL1β. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (++); (D) grupo 7 com marcação considerada (++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris foi manchada. Barra de escala: 46 µm.....	77
Figura 15.	Imagens representativas da imunohistoquímica para coloração de IL6. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (+++); (D) grupo 3 com marcação considerada (++++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris contra-manchada. Barra de escala: 46 µm.....	78
Figura 16.	Imagens representativas da imunohistoquímica para coloração de IL10. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (+++); (D) grupo 5 com marcação considerada (+++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris foi manchada. Barra de escala: 46 µm.....	79
Figura 17.	Imagens representativas da imunohistoquímica para coloração de osteocalcina. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (+); (D) grupo 8 com marcação considerada (+++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris foi manchada. Barra de escala: 46 µm.....	80

- Figura 18.** Imagens representativas da imunoistoquímica para coloração de osteopontina. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (++); (D) grupo 9 com marcação considerada (++++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris contra-manchada. Barra de escala: 46 µm..... **81**
- Figura 19.** Imagens representativas da imunoistoquímica para a coloração RUNX2. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (+); (D) grupo 3 com marcação considerada (++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris foi manchada. Barra de escala: 46 µm..... **82**
- Figura 20.** Imagens representativas da imunoistoquímica para coloração TRAP. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (+); (D) grupo 4 com marcação considerada (++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris foi manchada. Barra de escala: 46 µm..... **83**

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	31
2. REVISÃO DE LITERATURA	37
2.1 Tecido ósseo	39
2.1.1 Osteoblastos	39
2.1.2 Osteócitos	40
2.1.3 Osteoclastos.....	40
2.2 Remodelação óssea	41
2.3 Defeito crítico.....	43
2.4 Abordagens terapêuticas para defeitos críticos.....	43
2.4.1.1.1 Aloenxertos	44
2.4.1.1.2 Biomateriais	44
2.5 Melatonina	44
2.6 BMP2.....	46
2.7 Regeneração óssea guiada	46
3. PROPOSIÇÃO	49
3.1 Objetivos	51
3.1.1 Objetivos Gerais	51
3.1.2 Objetivos Específicos.....	51
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 Animais.....	55
4.2 Técnica Cirúrgica para a confecção das lesões ósseas	55
4.3 Tratamentos e Grupos Experimentais	56
4.4 Cuidados pós-operatórios	57
4.5 Eutanásia dos animais e obtenção das amostras	58
4.6 Processamento Histológico	58
4.7 Análise qualitativa ao microscópio de luz	61
4.8 Análise quantitativa	61
4.9 Análise imunoistoquímica.....	62
4.10 Análise estatística	63
4.11 Aspectos éticos	64

5. CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS	65
6. RESULTADOS	69
6.1 Resultados Análise qualitativa e quantitativa	71
6.2 Resultados Análise Imunoistoquímica	72
7. DISCUSSÃO	85
8. CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO	111
APÊNDICES	115

Resumo

RESUMO

MONTARELE, L. F. **Análise morfológica dos efeitos do tratamento tópico da melatonina associada à esponja de colágeno e à proteína rhbmp-2 sobre o remodelamento ósseo.** 2022. 143f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O reparo extensivo de defeitos ósseos é um importante problema de saúde ainda não completamente resolvido. Diferentes tratamentos alternativos foram propostos, mas, diante de um defeito ósseo crítico, ainda é muito difícil chegar a uma regeneração completa, com o osso neoformado apresentando todas as características morfológicas e fisiológicas de um osso normal, de pré-injúria. O uso tópico da melatonina mostrou-se como um adjuvante promissor para a regeneração óssea, devido a seus efeitos positivos sobre o metabolismo ósseo. Assim, para buscar novas técnicas biológicas, seguras, que promovam a reparação óssea e favoreçam a cicatrização dos defeitos, colocamos a hipótese de que existe um efeito sinérgico do tratamento com melatonina associado a 5 µg rhBMP-2 para orientar a regeneração óssea. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos de reparo ósseo da administração tópica de melatonina em diferentes concentrações (1, 10 e 100 µg), associada ou não ao rhBMP-2. A cicatrização de defeitos ósseos induzidos cirurgicamente foi quantitativa e qualitativamente avaliada através de análise histopatológica por microscopia de luz. Além disso, foi realizado a imunistoquímica no tecido, para identificar fatores angiogênicos, osteogênicos e osteoclastogênicos. Os dados quantitativos foram comparados entre os grupos pelo teste ANOVA/Tukey e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A análise estatística revelou maior quantidade de tecido ósseo neoformado nos grupos tratados com diferentes concentrações de melatonina em associação com rhBMP-2 (grupo 6,7,8), indicando um efeito positivo da associação para a reparação óssea. Além disso, os resultados mostraram que a presença do scaffold no defeito ósseo dificultou o processo de reparo ósseo porque no grupo tratado com "coágulo de sangue + scaffold" os resultados da formação óssea e a imunomarcagem foram reduzidos em comparação com todos os outros grupos (tratados apenas com melatonina ou em associação com rhBMP-2). Contudo, foi concluído que este tratamento pode ser promissor uma vez que se torna uma nova técnica alternativa segura para o tratamento clínico de fraturas, defeitos ósseos e enxertos ósseos, entretanto a metodologia para aplicação destas substâncias deve ser revista, visando a sua aplicação direta na lesão, sem o uso de qualquer substrato que influencie na formação do coágulo.

Palavras-chave: melatonina; rhBMP-2; remodelação óssea; reparo ósseo

Abstract

ABSTRACT

MONTARELE, L. F. **Morphological analysis of the effects of topical melatonin treatment associated with collagen sponge and rhbmp-2 protein on bone remodeling.** 2022. 143f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The extensive repair of bone defects is an important health problem that has not yet been completely solved. Different alternative treatments have been proposed, but in the face of a critical bone defect, it is still very difficult to achieve complete regeneration, with the newly formed bone presenting all the morphological and physiological characteristics of a normal, pre-injury bone. The topical use of melatonin has shown to be a promising adjuvant for bone regeneration, due to its positive effects on bone metabolism. Thus, to search for new, safe, biological techniques that promote bone repair and favor defect healing, we hypothesized that there is a synergistic effect of melatonin treatment associated with rhBMP-2 to guide bone regeneration. This study aimed to investigate the bone repair effects of topical administration of melatonin in different concentrations (1, 10 and 100 µg), associated or not with rhBMP-2. The healing of surgically induced bone defects was quantitatively and qualitatively evaluated by histopathological analysis by light microscopy. In addition, quantitative stereology was performed on immunohistochemically prepared tissue to identify angiogenic, osteogenic, and osteoclastogenic factors. Quantitative data were compared between groups by ANOVA/Tukey test and differences were considered significant when $p < 0.05$. Statistical analysis revealed a significant difference between the control group (bone defect + blood clot) and the groups treated with different concentrations of melatonin in association with rhBMP-2, indicating a positive effect of the association for bone repair. Furthermore, the results showed that the presence of the scaffold in the bone defect hindered the bone repair process because in the group treated with "blood clot + scaffold" the results of bone formation and immunolabeling were reduced compared to all other groups (treated with melatonin alone or in association with rhBMP-2). However, it was concluded that this treatment can be promising as it becomes a new safe alternative technique for clinical treatment of fractures, bone defects and bone grafts, however the methodology for application of these substances should be reviewed, aiming at its direct application on the lesion, without the use of any substrate that influences clot formation.

Keywords: melatonin; rhBMP-2; bone remodeling; bone repair

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O defeito ósseo crítico configura-se quando o tecido ósseo não consegue se regenerar por completo sozinho, devido à extensão da lesão⁽¹⁾. Dessa forma, diversas pesquisas são desenvolvidas para o estabelecimento de abordagens terapêuticas seguras, como uso de materiais sintéticos ou naturais, que auxiliem o processo de neoformação óssea. Dentre as abordagens terapêuticas já estabelecidas clinicamente na literatura para o tratamento desses defeitos críticos/cirúrgicos, encontra-se os autoenxertos, aloenxertos e materiais artificiais utilizados isolados ou em associação ao enxerto ósseo. No entanto, essas técnicas possuem suas desvantagens: os autoenxertos geralmente oferecem suprimento de tecido insuficiente, resultando em morbidade significativa do sítio doador, além de dor crônica, alterações sensoriais, risco de infecção e hematomas^(2,3,4). Os aloenxertos podem resultar em rejeição imunológica, inflamação, suprimento limitado, reabsorção excessiva e potencial transmissão de doenças. Todas essas desvantagens, despertou o interesse de descobrir novas técnicas e materiais que aumentassem as alternativas para tratamentos de defeitos ósseos. Felizmente, a engenharia tecidual tem sido bastante explorada, com a finalidade de superar essas restrições⁽⁵⁾.

A melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina) é uma molécula amplamente presente na natureza, ocorrendo em organismos unicelulares, plantas, fungos e animais⁽⁶⁾. Na maioria dos vertebrados, incluindo a espécie humana sua secreção se dá pela glândula pineal durante a fase noturna do dia⁽⁷⁾. A melatonina vem sendo atrelada a diversas funções específicas, dentre elas o envelhecimento, à obesidade, à sensibilidade à insulina, à maturação sexual, ações antidepressivas, ao controle das secreções de hormônio (do crescimento, hormônios adrenais e tireoidianos) e como agente antioxidante, onco-estático e osteogênico^(8,6).

A melatonina é capaz de desempenhar a função de um sincronizador circadiano da função de todos os tecidos periféricos, incluindo o tecido ósseo^(9,10), mantendo o metabolismo em sincronia com o ciclo claro-escuro. Isto suporta a ideia de que um crescimento ósseo máximo possa ocorrer durante a fase noturna do dia, quando a melatonina exibe seu mais elevado nível plasmático. De fato, células do tecido ósseo exibem um ritmo diurno que pode ser controlado pela melatonina^(11,12), sugerindo que a melatonina seja um fator biológico endógeno importante para remodelagem óssea. Estudos têm sugerido um efeito benéfico da melatonina sobre o metabolismo ósseo, incluindo efeitos anabólicos e efeitos anti-absortivos, os quais resultam em osteogênese. Enquanto os efeitos anti-absortivos são decorrentes de uma ação da

melatonina sobre os osteoclastos⁽¹³⁾, os efeitos anabólicos sobre o remodelamento ósseo promovidos pela melatonina são decorrentes da atuação desta sobre os osteoblastos. Estudos *in vitro* demonstraram que a melatonina promove a proliferação⁽¹⁴⁾ e a diferenciação^(15,16,17) de células osteoblásticas. A ação da melatonina sobre células osteoblásticas é determinante para que as células tronco mesenquimais sejam direcionadas para a diferenciação em linhagens osteogênicas⁽¹⁸⁾. Estudos *in vivo* têm demonstrado que a aplicação tópica de melatonina é capaz de ativar a osteogênese ao redor de implantes de titânio, favorecendo assim a osseointegração⁽¹⁹⁾. Ademais, a formação de células osteoblásticas induzida pela melatonina ocorre através do aumento da expressão das proteínas ósseas morfogenéticas (BMP-2 e BMP-4), envolvidas na diferenciação osteoblástica⁽¹⁷⁾.

Diversos carreadores, *scaffolds*, e fatores de crescimento tais como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) têm sido utilizadas para a reparação de defeitos ósseos^(20,16). A proteína óssea morfogenética do tipo 2, BMP-2, é encontrada em pequenas quantidades nas células mesenquimais, nas fibras colágenas e células da matriz óssea. A BMP-2 é produzida pela tecnologia recombinante e seu papel osteoindutor é desempenhado por sua ação sobre as células mesenquimais, transformando-as em células osteoprogenitoras capazes de formar osso^(21,22,23,24,25,26). Porém o seu uso tópico isolado é contraindicado, devido a sua rápida dissolução e degradação, sendo assim seu uso é recomendado associado à biomateriais carreadores tais como hidroxiapatita, vidro bioativo, beta fosfato de tricálcio, osso bovino mineralizado e/ou desmineralizado, polímeros biodegradáveis e outros⁽²⁷⁾. Nesse estudo foi empregada uma dose de 5 µg de rhBMP-2, de acordo com estudos anteriores que mostraram a contribuição significativa dessa dose no reparo de osso crítico em calvárias de ratos⁽²⁸⁾.

Com o intuito de possibilitar a reparação de grandes defeitos ósseos, a regeneração óssea guiada (ROG) tem se apresentado com resultados promissores. Assim, as membranas e esponjas protegem os sítios de reparo de células endoteliais que não suportam a formação de osso, evita a migração de células de epiteliais e atuam de maneira a impedir a reabsorção óssea inicial^(29,30). Atualmente é discutido que a função das biomembranas está além de uma barreira passiva, mas também como um compartimento bioativo^(31,32). Além desses mecanismos moleculares, a regeneração óssea guiada pode apoiar a estabilidade mecânica do local, favorecendo o processo de remodelação óssea⁽³³⁾.

Em função da melatonina administrada topicamente ter apresentado resultados satisfatórios tanto para implantação dentária quanto para a recuperação de ossos lesionados^(34,35,36,19), investigaremos os efeitos da combinação do tratamento da melatonina associada a

uma esponja de colágeno e à rhBMP-2 sobre a recuperação de uma lesão óssea.

Com isso essa pesquisa emergiu como inovadora, tratando a questão apresentada, da visão morfológica, evidenciando os reais efeitos de cada tipo de tratamento e sua possível eficácia.

2. Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo, especializado, vascularizado, dinâmico que é modificável ao longo da vida, em decorrência de processos patológicos ou fisiológicos, por meio da deposição ou reabsorção da matriz óssea. Pode ser classificado como tecido ósseo primário (imaturo) ou secundário (maduro ou lamelar). O tecido ósseo imaturo apresenta disposição irregular das fibras colágenas e menor quantidade de cristais de hidroxapatita, já o tecido ósseo lamelar apresenta fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou concêntricas em torno dos canais de Havers, formando osso compacto ou esponjoso ⁽³⁷⁾.

O tecido ósseo é constituído por dois componentes básicos: as células e matriz óssea. Sua alta solidez é em decorrência da alta deposição de sais de cálcio na matriz celular ⁽³⁸⁾.

Apresenta funções relacionadas ao alojamento e proteção da medula óssea, suporte, depósito de cálcio, fosfatos e outros íons. Esse tecido, está sob controle de fatores sistêmicos (hormônios) e fatores locais (fatores de crescimento e citocinas).

A deposição e remodelação óssea ocorre constantemente e deve ser equilibrada, a fim de garantir a homeostase do sistema esquelético, ou seja, os osteoblastos e osteoclastos precisam estar com a atividade balanceada. Esse equilíbrio é influenciado pela carga mecânica exercida do tecido ósseo e pelas interações com outros sistemas biológicos ⁽¹⁾.

2.1.1 Osteoblastos

São células ósseas jovens, mononucleadas, de origem mesenquimal, com núcleo esférico e citoplasma basófilo com intensa atividade metabólica, responsáveis pela formação e mineralização da matriz orgânica do osso ^(39,40). A proliferação, atividade e sobrevivência dos osteoblastos são controladas por fatores sistêmicos e locais.

Quando ativas, de forma geral, são responsáveis pela síntese, secreção e mineralização do tecido ósseo ⁽⁴¹⁾.

Essas células são capazes de sintetizar a matriz orgânica, constituída de várias proteínas colágenas e não colágenas (colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas, fosfoproteínas e citocinas). A interação desses componentes fornece um arcabouço que permite a deposição de sais minerais, além do fato de algumas destas moléculas atuarem diretamente na mineralização, por meio da secreção de vários reguladores ^(42,43).

Os osteoblastos participam do processo de regeneração óssea, pois atuam como receptores e transmissores de sinais para a remodelação óssea atuando secretando fatores de regulação como Interleucina-6 (IL-6) e fatores de crescimento como TGF- β que são fatores locais que agem na proliferação, diferenciação e atividade osteoblástica. Além disso, os osteoblastos têm a capacidade de modificar a matriz adjacente, removendo ou alterando as proteoglicanas ou glicoproteínas ⁽⁴⁴⁾.

2.1.2 Osteócitos

Antigamente, acreditava-se que essas células eram inativas, porém agora sabe-se que são indispensáveis para regulação óssea e altamente ativas. É o tipo de célula mais abundante no tecido ósseo, apresentam vida longa, e são os osteoblastos que ficaram aprisionados no interior das lacunas, presentes na matriz extracelular, são células elípticas com prolongamentos citoplasmáticos para o estabelecimento de junções (tipo gap) entre as células (osteócitos, osteoblastos e células de revestimento ósseo), responsáveis pela passagem de moléculas e íons de um osteócito para outro, constituindo uma complexa rede que interconecta a superfície óssea às porções mais internas, garantindo sua principal função, que é a vitalidade, manutenção, regulação da homeostase óssea, além disso, e estão envolvidos no processo de envelhecimento ósseo ^(45, 46).

Além disso, os osteócitos são multifuncionais, capazes de integrar sinais hormonais e mecânicos envolvidos na resposta esquelética, a fim de coordenar a função dos osteoblastos e osteoclastos. Estão presentes em vários processos fisiológicos, dentro e fora do ambiente ósseo. Vale ressaltar que, a presença dessas células nas pesquisas é extremamente importante, pois são capazes de mediar os efeitos benéficos de diferentes abordagens terapêuticas utilizadas na prática clínica, devido ao fato de que transmitem sinais biológicos ^(47, 48, 49).

Diante de tudo isso, conclui-se que os osteócitos são células essenciais para a remodelação óssea.

2.1.3 Osteoclastos

São células gigantes, multinucleadas, que incorporam vários monócitos. Sua função está relacionada ao processo de reabsorção e remodelação óssea, promovendo escavações na superfície óssea denominadas lacunas de Howship. O osteoclasto age desmineralizando a matriz óssea, por meio da liberação de enzimas proteolíticas, que geram um ambiente ácido, junto com os prótons gerados pela enzima anidrase carbônica ^(50, 51, 52).

O fator de crescimento tumoral (TGF-b) e o estrógeno promovem a apoptose dessas

células, enquanto o paratormônio (PTH) e a Interleucina-1 (IL-1) prolongam a atividade osteoclástica, por meio da sua ação supressora de apoptose. Acredita-se, que a apoptose de osteoblastos estimula a chegada de osteoclastos para superfícies que deverão ser reabsorvidas⁽⁵⁰⁾. Diante de tudo isso, é evidente a importância do papel do osteoclasto no microambiente ósseo.

2.2 Remodelação óssea

O tecido ósseo está em constante remodelação óssea, esse processo é fundamental para garantir a manutenção da massa óssea adulta. A remodelação óssea, pode ocorrer por meio de situações fisiológicas (transformação de osso primário para secundário, manutenção do crescimento e etc) ou patológicas (fraturas, entre outras). Se a atividade osteoclástica estiver maior, ocorrerá a reabsorções patológicas, como por exemplo, nas periodontites, menopausa, osteoporose e tumores ósseos^(37, 53, 54).

De forma geral, a remodelação óssea consiste na remoção do osso velho ou danificado, pelas células osteoblásticas, por osso neoformado, secretado pelos osteoblastos, é fundamental que esse processo esteja em equilíbrio, para que não haja alterações no microambiente ósseo, garantindo a homeostase mineral sistêmica⁽⁵⁵⁾.

Uma cascata de eventos associados a fatores sistêmicos e locais, como hormônios, citocinas e fatores de crescimento, promove a proliferação de células osteoprogenitoras e diferenciação dos osteoblastos, para que ocorra a formação óssea.

Para o processo de reabsorção óssea, inicialmente ocorre a ativação dos osteoclastos, previamente à reabsorção da matriz mineralizada pelos osteoclastos, os osteoblastos produzem colagenase, removendo a camada de osteóide, expondo a matriz mineralizada, dessa forma, em contato direto com a matriz óssea mineralizada os osteoclastos se tornam ativos. Outra possibilidade de modular a formação e atividade osteoclástica seria a partir de sinais gerados, com a liberação de citocinas⁽⁵⁶⁾.

No processo de remodelação óssea, além dos osteoblastos participarem secretando a matriz óssea, também atuam controlando a atividade dos osteoclastos, pois a maioria dos fatores que controla a reabsorção óssea (PTH, dihidroxivitamina D3, esteróides sexuais, prostaglandinas (PGs), TGF- β , citocinas, como Interleucina-1, Interleucina-6 e Interleucina⁽¹¹⁾, age diretamente nas células osteoblásticas, dessa forma, esses fatores estimulam os osteoblastos a liberarem moléculas que estimulam a migração e adesão na superfície óssea que será reabsorvida^(51, 54). A seguir, encontra-se uma tabela com as citocinas e hormônios envolvidos na remodelação óssea^(51, 54, 57).

Tabela 1. Hormônios e citocinas e suas respectivas funções no remodelamento ósseo.

Citocina/Hormônio	Funções
PTH e vitamina D3	Atuação indireta nos osteoclastos, por receptores nos pré-osteoblastos, osteoblastos e células de revestimento ósseo.
Interleucina-1 α (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α)	São citocinas que estimulam a reabsorção óssea (uma via autócrina). Estimulam os osteoclastos maduros e a proliferação de seus precursores.
Interleucina-6 (IL-6)	Citocina produzida pelos osteoclastos, células do estroma e células da linhagem monócito-macrófago. Aumenta a reabsorção óssea através do estímulo e de receptores presentes na membrana celular dos osteoclastos, além de estimular a reabsorção óssea por via parácrina. Aumenta a reabsorção óssea estimulada pela IL-1 e TNF, mas não estimula a reabsorção óssea mediada pelo PTH e 1,25 Dihidroxitamina D. Anticorpos para IL-6 bloqueiam a reabsorção óssea produzida pela IL-1 e TNF indireta.
Antagonista do receptor IL-1	é uma citocina relacionada à família do gene da IL-1 Liga-se ao receptor da IL-1 e compete com a IL-1 α e b pela ligação e ativação deste receptor. É um inibidor muito efetivo da reabsorção óssea osteoclástica, estimulada não apenas pela IL-1, mas pelo TNF.
RANKL	Citocina essencial para a indução da osteoclastogênese. Expresso pelas células T ativadas e pelos osteoblastos que se unem com RANK, ativando-os
RANK	é uma proteína transmembrana, expressa nos progenitores dos osteoclastos, osteoclastos, células T, células B, células dendríticas e células epiteliais da glândula mamária. É um membro da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR)
Osteoprotegerina (OPG)	é um membro dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) que regula negativamente a formação e ativação dos osteoclastos interrompendo a ligação RANK-RANKL por ligar-se ao RANKL. Secretada pelos osteoblastos, ao competir com esta ligação é tida como a chave do mecanismo regulatório da diferenciação e atividade osteoclástica. Sua produção é aumentada em resposta a IL-1, IL-6, IL-11, TNF, fator de crescimento transformante (TGF β) e estrógeno e é inibida pelo PTH42;
Fator de crescimento transformante- b (TGF-b)	Produzido pelos osteoblastos e células da medula óssea, o qual estimula a formação óssea e inibe a diferenciação, formação e atividade dos osteoclastos maduros. Armazenado no osso, é produzido quando há estímulo para reabsorção óssea, podendo ser um mecanismo importante na desativação osteoclástica.
Interferon- γ (INF- γ)	Citocina multifuncional, produzida pelas células T, com capacidade de proliferação e diferenciação dos progenitores dos osteoclastos. Pode suprimir a osteoclastogênese por interferir com a via de sinalização RANKL. Pode ser um fator crítico na manutenção da integridade óssea.
Interferon- β (INF- β)	Citocina que está envolvida na regulação dos osteoclastos e possui um efeito benéfico na destruição óssea, provavelmente regulando negativamente a osteoclastogênese, através de uma sinalização cruzada com a via RANKL.
1,25 Dihidroxitamina D	Hormônio da mineralização óssea, sob o comando do PTH, fosfatase e cálcio. Apresenta um importante mecanismo para a formação osteoclástica no espaço medular. Age como um fator de diferenciação tanto nas células progenitoras quanto na célula já madura, provavelmente por ação indireta.
Estrógeno	É um hormônio que suprime a produção de citocinas de reabsorção óssea, como a IL-1 e IL-6 e inibe a atividade de reabsorção via osteoblastos.
Calcitonina	Hormônio secretado pela tireóide, além de diminuir os níveis plasmáticos de cálcio, inibe a proliferação e diferenciação dos precursores dos osteoclastos.

Vale ressaltar a importância do conhecimento de todo o processo de remodelação

óssea, bem como as células e fatores envolvidos, para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas seguras que visem a regeneração óssea, para o tratamento de defeitos ósseos, causados por patologias ou traumas.

2.3 Defeito crítico

Defeito crítico é definido na literatura, como defeitos que não se regeneram por completo espontaneamente ou defeitos com tamanho comprimento maior que 1–2 cm e perda maior que 50% da circunferência do osso, o qual constitui um problema significativo para formação de um novo tecido ósseo no local lesionado. Esse tipo de defeito é considerado a base para as pesquisas de reparo ósseo, pois o grau de cicatrização do defeito ósseo é determinado principalmente pelo tamanho do defeito ^(58,59).

Para estudos de regeneração óssea, modelos animais padronizados são fundamentais, para garantir reprodutibilidade e precisão, o modelo de defeito crítico é essencial para as conclusões experimentais, pois permite a avaliação da resposta, *in vivo*, de possíveis protocolos de tratamentos, como uso de enxertos e biomateriais, para alcançar o objetivo resolução do defeito ^(60,25).

2.4 Abordagens terapêuticas para defeitos críticos

Para que um material seja definido como ideal nas enxertias ósseas, além da biocompatibilidade é necessário seguir o princípio de ótimas propriedades físico-químicas, sendo elas: osteogênese, osteocondução e osteoindução ^(57,61,62). **Osteogênese** é quando o material é capaz de estimular a formação óssea diretamente, a partir de osteoblastos ⁽⁶³⁾. **Osteoindução** é capacidade de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, para estimulação da formação ósseo no sítio ⁽⁶⁴⁾. **Osteocondução** é uma característica que permite a aposição de um novo tecido ósseo na sua superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitora ^(65,66).

Além disso tudo, o substituto ósseo deve ser rentável, apresentar quantidade disponível necessária, ter resistência semelhante ao osso que será substituído, manejável e sem risco de transmissão de doenças.

Vale a pena ressaltar que, é extramamente difícil definir um novo material ou uma nova técnica como clinicamente aplicável no corpo humano, pois além de apresentar todas essas propriedades citadas otimizadas, esses bioprocessos são extramamente complexos e cada vez mais, descobre-se sobre a biologia óssea e seus mecanismos de atuação, além da sua relação

direta e indireta com diversos eventos moleculares ⁽⁶⁷⁾.

O material ideal para enxertia, ainda não existe, entretanto, atualmente o autoenxerto é o que mais se aproxima das características ideais, citadas acima.

2.4.1 Autoenxertos

Atualmente, são definidos com padrão ouro, pela compatibilidade biológica e propriedades osteogênicas. São colhidos do próprio paciente e apresentam as propriedades de osteogênese, osteocondução e osteoindução. Entretanto, apresenta algumas desvantagens, como necessidade de sítio doador, potencial de reabsorção e grande morbidade cirúrgica. A seguir, temos alguns exemplos mais comuns de áreas doadoras: osso ilíaco e calvária (extrabucal), mento, ramo mandibular (intrabucal) ^(68,69,70,71,72).

2.4.1.1 Aloenxertos

Podem ser obtidos de cadáveres ou doadores vivos, são processados em condições estéreis e armazenadas em bancos de ossos humanos. A vantagem desse tipo de enxertia é que não há necessidade de um sítio doador, redução da morbidade. As desvantagens é o risco de transmissão de doenças, disponibilidade limitada e diminuição do potencial osteogênico, devido ao processo de esterelização ^(73,74).

2.4.1.1.2 Biomateriais

A utilização de biomateriais na Odontologia, está cada vez maior, são materiais naturais ou sintéticos utilizados em contato com sistemas biológicos cuja finalidade é reparar ou substituir tecidos ou funções do organismo. Para uma resposta biológica adequada, os biomateriais devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos biológicos do hospedeiro. Para isso, busca-se três características básicas: ⁽¹⁾ biocompatibilidade, não induzindo respostas biológicas adversas, como reações alérgicas e inflamatórias não toleráveis pelo organismo; ⁽²⁾ alta osteocondutividade, estimulando o crescimento de células ósseas; e ⁽³⁾ bioatividade, que é a capacidade do material em se unir com tecido biológico ^(72,75,76).

A estrutura molecular desse tipo de enxerto é constituída de matriz óssea desproteinizada, com intuito de eliminar respostas imunes e inflamatórias no local.

2.5 Melatonina

A melatonina, foi descoberta em 1958 por Aaron Lerner, é uma molécula que está presente em vários organismos vivos, nos vertebrados ela é uma molécula produzida e secretada pelos pinealócitos, presentes na glândula pineal, a partir do aminoácido triptofano ^(76,77). Seus maiores níveis plasmáticos são encontrados, durante o período noturno, com concentrações séricas variando entre 80 e 120 pg / ml, visto que a secreção é aumentada pela escuridão e suprimida pela luz, durante o dia as concentrações séricas variam entre 10-20 pg / ml ^(78,79).

A melatonina, pode atuar por diferentes vias moleculares, cuja mais caracterizada é pela ativação de receptores específicos da membrana, sendo eles sítios ML1 de alta afinidade e sítios ML2 de baixa afinidade ^(80,81)

Sua função biológica primária é a manutenção do ciclo circadiano, porém essa molécula também participa de outros processos fisiológicos, com funções relacionadas a imunidade, pressão sanguínea, regulação cardiovascular autonômica, hemostasia, sistema imunológico, envelhecimento, obesidade (regulação da glicose), maturação sexual, ações antidepressivas, desintoxicação de radicais livres controle de secreção de hormônios, agente antioxidante, oncoestático e osteogênico ^(82,83,84). Além disso tudo, a melatonina apresenta um papel essencial na regulação do metabolismo ósseo, mantendo o metabolismo e a homeostase do microambiente ósseo em sintonia, por apresentar efeitos benéficos, decorrentes de ações anabólicas e antireabsortivas ^(85,86,87,88).

Em humanos, a melatonina estimula a proliferação de células ósseas e a síntese de colágeno Tipo I nessas células e inibe a reabsorção óssea por meio da regulação negativa da formação e ativação de osteoclastos mediada por RANKL ^(89,15,13).

Os mecanismos de ação para esses efeitos, podem ser por três vias ⁽⁸⁷⁾:

1. Aumento dos marcadores da diferenciação osteogênica (Runx2, Osteopontina e osteocalcina) e aumento da atividade dos osteoblastos
2. Inibição da expressão dos marcadores de diferenciação dos osteoclastos
3. Eliminação de radicais livres.

A perda óssea e a osteoporose, decorrentes do envelhecimento está relacionado a redução da melatonina. Wang X e colaboradores ^(20,19), concluiu que a melatonina estimula a formação óssea e alivia a perda óssea em ratas ovariectomizadas, decorrente da inibição da diferenciação dos osteoclastos e promoção da diferenciação osteogênica ⁽⁷⁸⁾.

Os efeitos osteogênicos e os inibitórios da osteoclastogênese, associado com as propriedades antioxidantes, segurança, custo e qualidade de vida torna a melatonina uma

molécula essencial para manutenção da saúde óssea e um potente agente de estudo clínica para recuperação óssea.

2.6 BMP2

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são fatores de crescimento multifuncionais que pertencem à superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGFbeta), mais especificamente a proteína morfogenética óssea 2 (BMP2), foi identificada como um indutor da formação óssea em 1988, e desde então está sendo estudada com intuito de favorecer os reparos ósseos causados por patologias ou traumas⁽⁹⁰⁾. De acordo com, Chen D, et al (2004) estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que a BMP-2 pode ser utilizado em várias intervenções terapêuticas, como defeitos ósseos, fraturas por não união, fusão espinhal, osteoporose e cirurgia de canal radicular^(91,92).

Okamoto M et al. (2006), concluiu que os sinais de BMP regulam o desenvolvimento ósseo por meio da estimulação de osteoblastos e osteoclastos. O rhBMP-2 acelera a diferenciação dos osteoblastos para secretar nova matriz óssea, incluindo colágeno prematuro e precursores minerais^(93,94).

De acordo com, Johnson TB (2018), o uso do rhBMP2 melhora qualidade óssea próxima a implantes, além de acelerar o tempo de consolidação óssea e mantém esses efeitos por um longo tempo⁽⁹⁵⁾.

Tendo tudo isso em vista, o uso do rhBMP2 tem despertado interesse para aplicações clínicas devido a sua capacidade diferenciada de ser um agente osteoindutor e por estar disponível comercialmente^(96,97). Entretanto, in vivo, a rhBMP-2 se difunde rapidamente a partir do local de implantação quando depositada em solução, o que abrevia seu efeito osteoindutor. Para que ocorra um resultado satisfatório é indispensável um sistema carreador como, por exemplo, os enxertos ósseos que apresentam potencial osteogênico^(98,99).

2.7 Regeneração óssea guiada

A regeneração óssea guiada, além da proteção do sítio de reparo, permite a exclusão, de forma mecânica, de células não osteogênicas ao redor da ferida óssea, para que não adentrem a área de reparo, favorecendo a migração de células osteogênicas proveniente do osso original. O uso de membranas e esponjas no local do defeito, garante a estabilidade, além de funcionar como um compartimento bioativo^(100,101,102,103,104,105,106).

A técnica de regeneração óssea guiada, auxilia na promoção da qualidade óssea, por facilitar um microambiente com mais metabólitos com espaço aberto para a formação óssea

inicial e contínua, permitindo um período de mineralização mais longo ⁽⁹⁶⁾.

3. Proposição

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivos Gerais

Constituem os objetivos gerais do estudo, avaliar os efeitos da administração da melatonina tópica em diferentes concentrações no reparo ósseo em defeitos ósseos cirúrgicos através da técnica de ROG, associada ou não à rhBMP-2.

3.1.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da administração da melatonina tópica em diferentes concentrações no reparo ósseo em defeitos ósseos cirúrgicos através da técnica de **ROG**, associada ou não à rhBMP-2 por meio das seguintes técnicas:

- a) Avaliação qualitativa por análise histopatológica por meio de microscópio de luz.
- b) Avaliação quantitativa por meio da técnica de histomorfometria
- c) Avaliação de fatores angiogênicos, osteogênicos e osteoclastogênicos por meio da técnica de imunoistoquímica.

4. Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

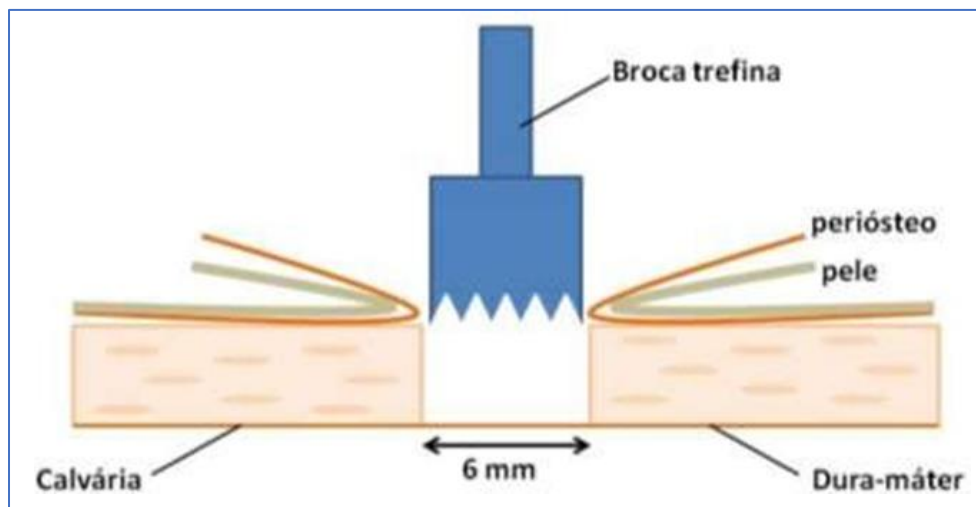
Foram utilizados 72 ratos albinos Wistar, adultos, machos (250 g), provenientes do Biotério Central PUSP RP – Universidade de São Paulo. Estes animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo 3 animais cada uma, separados de acordo com o grupo e mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração para pequenos roedores e água *ad libitum*.

4.2 Técnica Cirúrgica para a confecção das lesões ósseas

Os animais foram pesados para proporcionar corretamente a dose do anestésico. Para todos os procedimentos experimentais os animais receberam anestesia geral, com a associação de 80 mg/kg de Cloridrato de Ketamina (Cetamin – Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda – Cotia – SP - Brasil) e 6 mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Xilazin – Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda – Cotia – SP - Brasil), via intramuscular no *bíceps femoris* da pata direita. Nos casos em que não houve o efeito necessário do anestésico, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada.

Os animais anestesiados foram submetidos à tricotomia da pele que recobre a região central da calvária e em seguida a desinfecção com iodeto de polivinilpirrolidona (Indústria Química e Farmacêutica Rioquímica Ltd, Brasil). Após a técnica de assepsia foi realizada uma incisão sagital através da pele da calota craniana e periósteo, conferindo um retalho de espessura total. Após a incisão, o tecido conjuntivo subcutâneo foi divulsionado, de modo a expor a calvária. Na calvária exposta, os defeitos ósseos foram confeccionados bilateralmente, ambos equidistantes da sutura sagital mediana, utilizando-se uma broca cirúrgica tipo trefina de 6 mm de diâmetro externo (Kavo, São Paulo, Brasil). Com o auxílio de um motor elétrico para implantes, ajustado em 3000 RPM, procedeu-se a perfuração da calvária, sob constante e abundante irrigação com soro fisiológico 0,9%.

Figura 1. Representação esquemática do procedimento da confecção do defeito no osso da calvária decorrente do atrito causado pela rotação de uma broca tipo trefina cilíndrica em baixa rotação, resultando na remoção do bloco ósseo e na preservação da dura-máter.



4.3 Tratamentos e Grupos Experimentais

Para investigação do potencial osteogênico isolado e sinérgico da melatonina sobre a recuperação da lesão óssea da calvária, os animais foram distribuídos em 9 grupos experimentais, com 8 animais cada. Melatonina (1, 10 e 100 μg), recombinante humana da proteína morfogenética óssea (5 μg rhBMP-2) e esponja de colágeno como *Scaffold* (Lumina-Coat Criteria®) foram aplicadas bilateralmente em cada animal, e os grupos experimentais foram formados de acordo com o tratamento efetuado na região da lesão óssea, conforme demonstrado na tabela abaixo (tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos tratamentos e grupos experimentais

Grupos	Tratamentos
Grupo 1	Coágulo de sangue
Grupo 2	Coágulo de sangue + Scaffold
Grupo 3	Coágulo de sangue + Scaffold + Melatonina 1 μg
Grupo 4	Coágulo de sangue + Scaffold + Melatonina 10 μg
Grupo 5	Coágulo de sangue + Scaffold + Melatonina 100 μg
Grupo 6	Coágulo de sangue + Scaffold + Melatonina 1 μg + 5 μg rhBMP2
Grupo 7	Coágulo de sangue + Scaffold + Melatonina 10 μg + 5 μg rhBMP2
Grupo 8	Coágulo de sangue + Scaffold + Melatonina 100 μg + 5 μg rhBMP2
Grupo 9	Coágulo de sangue + Scaffold + 5 μg rhBMP2

Na figura 2, em A, é retratado o momento da asspesia da região em que foi realizado a cirurgia. Em B, é retratado o momento da incisão sagital, para um reparo total na calota, onde em seguida, é realizado a divulsão dos tecidos (C) até exposição da calvária. Na imagem D, é retratado os defeitos ósseos bilaterais, equidistantes da sutura sagital mediana, para colocação

dos tratamentos estudados, realizados por meio de uma trefina.

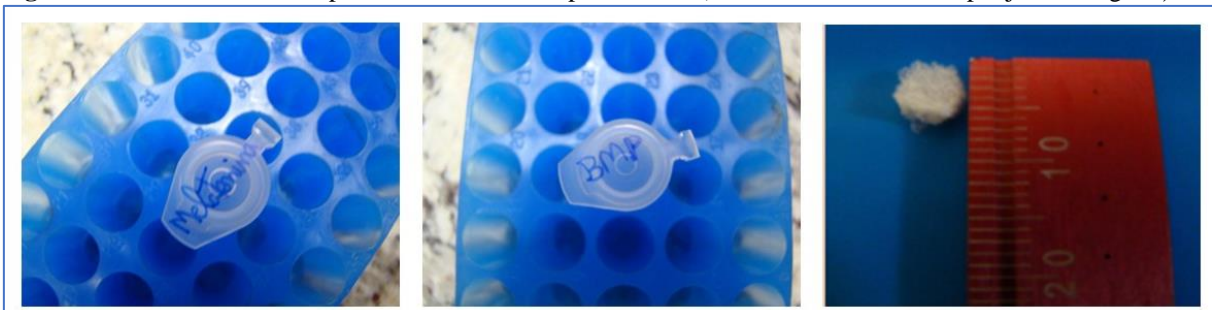
A figura 3, apresenta os materiais utilizados para os tratamentos experimentais dos grupos estudados, são eles: melatonina, rhBMP2 e esponja de colágeno.

Figura 2. Demonstração da técnica utilizada para confecção dos defeitos ósseos. A - Asspesia da região operada. B – incisão sagital para confecção de retalho total. C – divulsão dos tecidos, para exposição da calvária. D – confecção dos defeitos ósseos bilaterais.



Fonte: autoria própria

Figura 3. Materiais utilizados para os tratamentos experimentais (melatonina, rhBMP2, esponja de colágeno)



Fonte: autoria própria

4.4 Cuidados pós-operatórios

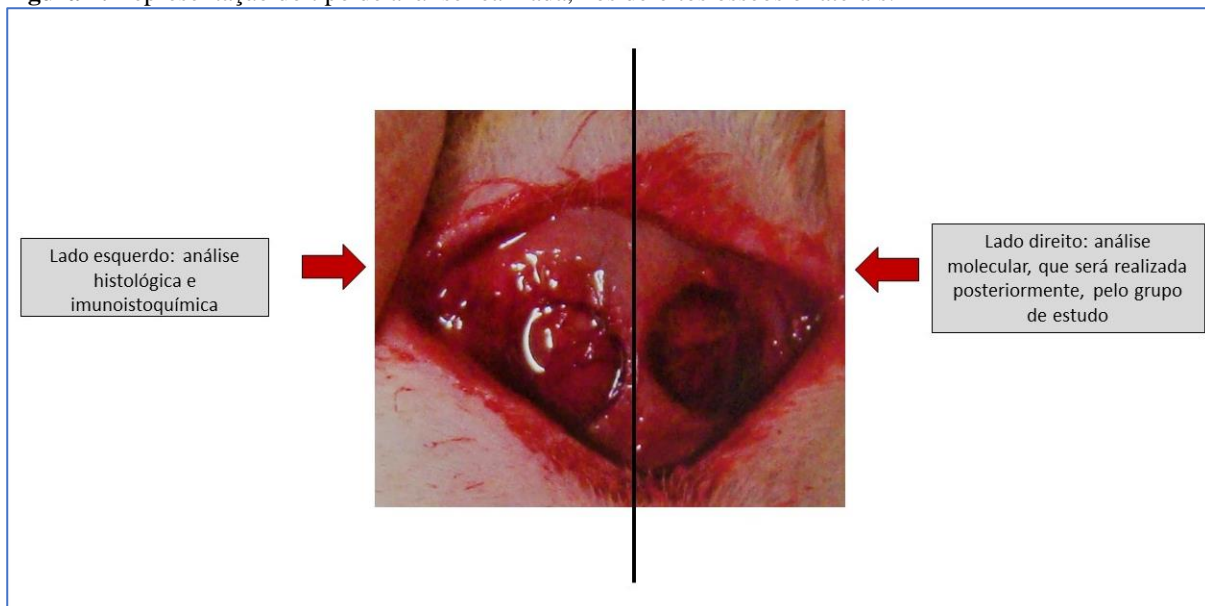
Após o tratamento, as bordas do tecido cutâneo incisado foram reposicionadas na linha

mediana e unidas, por meio de sutura com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil), de modo a refazer a integridade do tecido cutâneo. Em seguida, cada animal recebeu o tratamento com analgésico dipirona 100mg/kg peso animal, injeção subcutânea e do antibiótico *Pentabiotico Veterinário Pequeno Porte* (Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil), injeção intramuscular, no volume de 0,1 mL/100 g de peso.

4.5 Eutanásia dos animais e obtenção das amostras

Após o período pré-determinado de duas semanas de criação do defeito ósseo, os animais foram anestesiados com a associação Xylazina + Ketamina (75-100mg/Kg e 5-10mg/Kg, respectivamente), injetada por via intramuscular. Após a confirmação das perdas do reflexo postural e da sensibilidade à dor, os animais foram decaptados e a cabeça dissecada para a obtenção da calvária. Como em cada animal as duas lesões da calvária receberam o mesmo tratamento, as amostras do lado esquerdo da calvária foram destinadas para as análises histológica e imunoistoquímica para os fatores considerados, enquanto as amostras obtidas do lado direito foram destinadas para as análises molecular, que será realizada posteriormente (figura 4).

Figura 4. Representação do tipo de análise realizada, nos defeitos ósseos bilaterais.



Fonte: autoria própria

4.6 Processamento Histológico

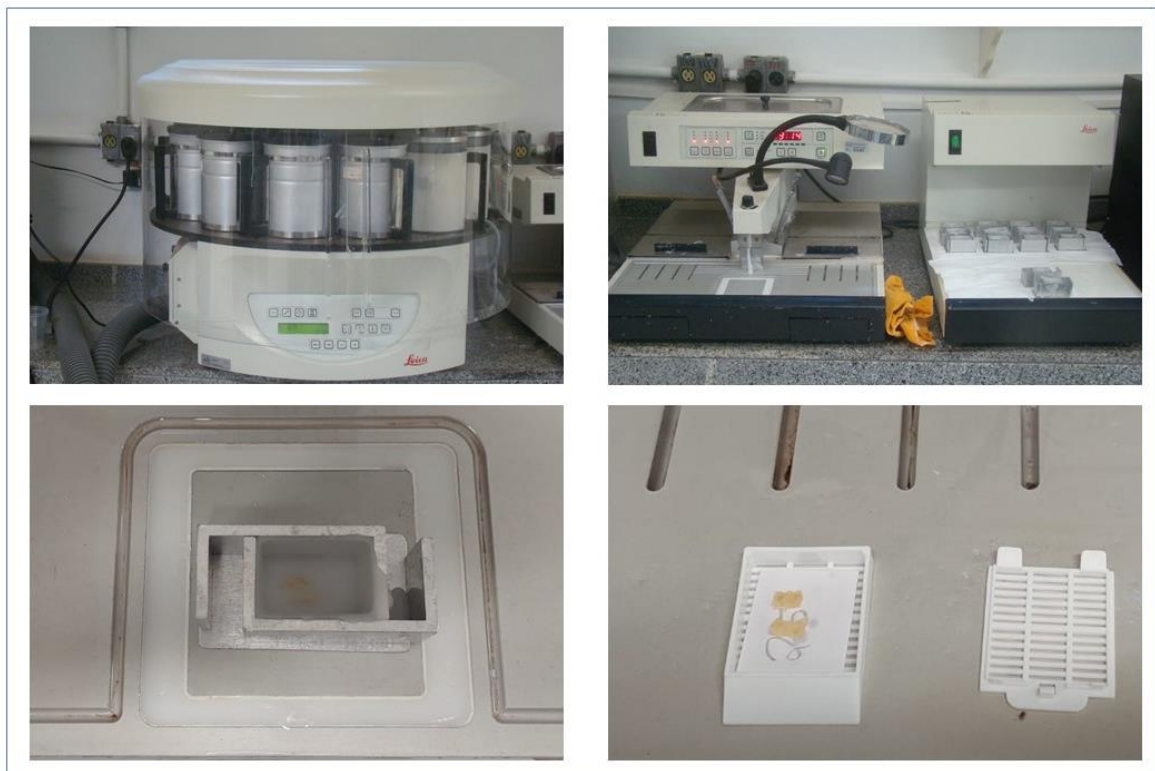
Após a decapitação do animal com anestesia prévia, a calvária foi removida, utilizando-se para isso tesouras e pinças adequadas estéreis. Os tecidos moles presentes foram cuidadosamente separados do tecido ósseo do crânio, para a obtenção do fragmento ósseo

contendo o defeito com margem de segurança. Esses fragmentos foram imersos na solução fixadora de paraformoldeído a 4% tamponado, por 24 horas. Em seguida, os espécimes foram descalcificados em EDTA a 10%, trocando-se as soluções uma vez por semana. Após o período de descalcificação, que variou de 30 a 40 dias, as amostras foram preparadas e colocadas para processamento histológico no processador de tecidos automatizado Leica Tp 1020, para desidratação em álcool, de forma crescente. Em seguida, os fragmentos ósseos foram incluídos em parafina, na central de inclusão Leica. A Figura 5 apresenta os equipamentos utilizados durante o processamento histológico.

De cada amostra de tecido ósseo foram realizados cortes semi-seriados de 5 μm de espessura, para confecção das lâminas, por meio de micrótomo (figura 6). Em seguida, esses cortes foram corados por tricrômico de masson (figura 7) para quantificação óssea, observada em microscopia de luz.

A figura 8 apresenta, com exemplo, algumas das lâminas após a coloração com tricômico de masson, observadas em microscópio óptico.

Figura 5. Processador de tecidos automatizado (para processamento histológico em parafina) – A. Central de inclusão em parafina – B. Momento da inclusão do fragmento ósseo na parafina – C. Fragmento ósseo já incluído na parafina – D. Bloco de parafina pronto para confecção das lâminas – E.



Fonte: autoria própria

Figura 6. Micrótopo utilizado para confecção corte dos blocos de parafina.



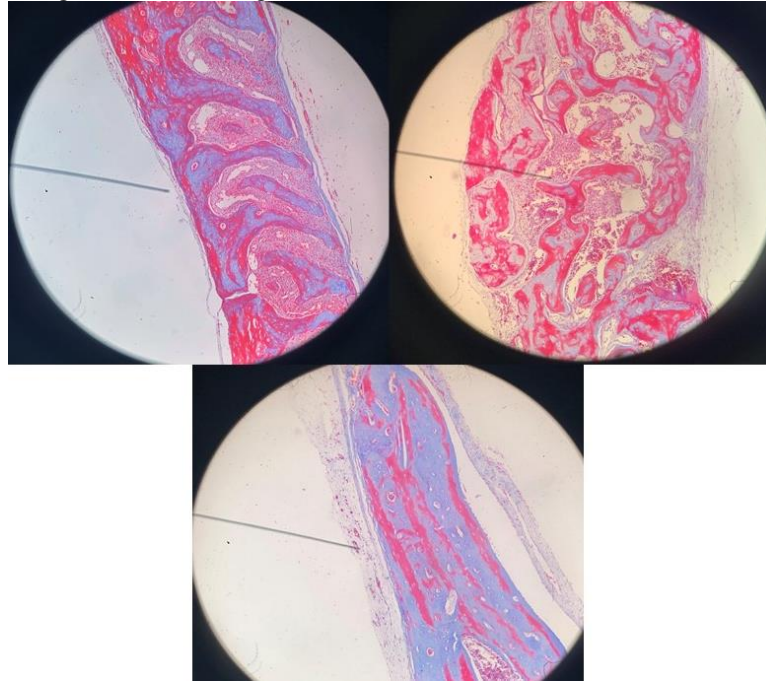
Fonte: autoria própria

Figura 7. Cabine para coloração das lâminas em tricômico de masson.



Fonte: autoria própria

Figura 8. Exemplos de alguns cortes histológicos, corados com tricômico de masson, observados em microscopia.



Fonte: autoria própria

4.7 Análise qualitativa ao microscópio de luz

A resposta tecidual da análise qualitativa, permitiu avaliar o osso neoformado na área de criação do defeito ósseo, nessa análise pode ser observado a presença de diferentes células envolvidas no processo de reparação óssea, como por exemplo, osteoblastos, osteócitos e células sanguíneas, além de ser possível diferenciar o osso existente e o neoformado nos grupos experimentais.

Para isso, foi utilizado um microscópio de luz (AxioImager Z2, Carl Zeiss, Germany) acoplado a câmera digital adquirido com auxílio de outros 2 projetos FAPESP passados. As imagens digitalizadas foram analisadas através da objetiva de aumento, para avaliação de tecido ósseo pelo método de tricômico de masson.

Para avaliação das imagens foi utilizado os softwares AxioVision da Zeiss.

4.8 Análise quantitativa

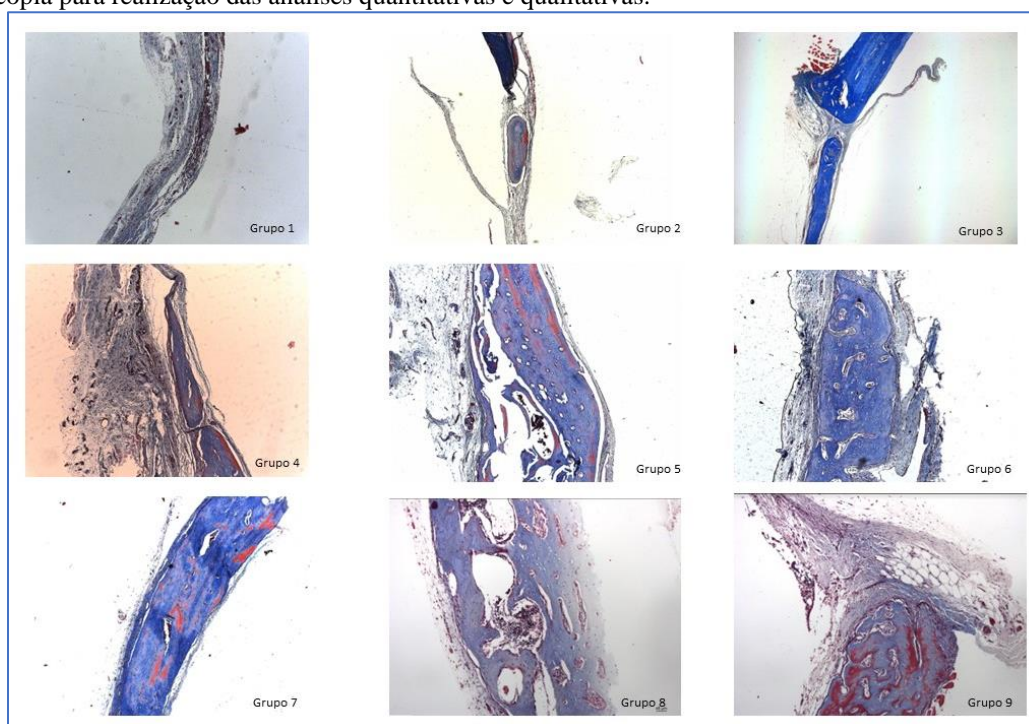
A quantificação do osso neoformado, em cada animal, foi realizada por meio de princípios morfométricos, utilizando-se o *software* AxioVision da Zeiss, cujo todo tecido ósseo neoformado era selecionado em toda extensão da área de reparo ósseo e quantificado, buscando deste modo, fornecer precisão nos resultados obtidos, pois foi avaliado este tecido em recuperação em toda a extensão do defeito ósseo.

4.9 Análise imunoistoquímica

Foi realizada a imunomarcagem de citocinas pró inflamatórias (interleucina 1, 6 e 10 e tnf alfa), fatores angiogênicos (CD31 e VEGFR2), osteoclastogênicos (OPG), osteogênicos (ostecalquina, osteopontina e RUNX2) e fatores TRAP. Os cortes foram mergulhados em solução de tampão citrato pH 6,0 em uma panela a vapor, própria para recuperação antigênica (Decloaking chamber, by Biocare Medical). Após o resfriamento e lavagem em PBS, foi realizado o bloqueio da peroxidase endogena com com solução de H₂O oxigenada por 20 minutos, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários por 1 hora, a diluição desses anticorpos seguiu o padrão de 1/200 µLitros. A seguir, os cortes foram lavados em PBS e incubados por 1 hora com o anticorpo secundário., seguindo o kit de imunoistoquímica abcam (ab236466 mouse and rabbit specif HRP/DAB IHC detection kit- micro-polymer). A reação foi revelada com solução de diaminobenzidina (0,5 mg/mL) em PBS por 1 minutos. Os cortes foram lavados em PBS, contracorados com hematoxilina de Harris, desidratados, diafanizados e cobertos com lamínulas utilizando-se Entellan (Merck).

Para elucidar as imagens obtidas para as análises, a figura 9, apresenta uma imagem de cada grupo, corado com tricômico de masson, observados em microscopia de luz.

Figura 9. Corte histológico, corado com tricômico de masson, referente a cada grupo analisado, observado em microscopia para realização das análises quantitativas e qualitativas.



Fonte: autoria própria

4.10 Análise estatística

A análise estatística a ser utilizada após a obtenção dos resultados consistirá na aplicação de testes paramétricos ou não-paramétricos, conforme a distribuição dos dados. As análises intra e inter-grupo foram realizadas com análise da Variância (ANOVA) com nível de significância de 5%. Quando o ANOVA detectar uma diferença significativa, comparações múltiplas foram realizadas utilizando o teste de Tukey ($p < 0,05$) (tabela 3).

Tabela 3. Análise estatística

1way ANOVA					
1	Table Analyzed	Data 1			
2					
3	One-way analysis of variance				
4	P value	< 0.0001			
5	P value summary	***			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
7	Number of groups	9			
8	F	48.37			
9	R square	0.8638			
10					
11	Bartlett's test for equal variances				
12	Bartlett's statistic (corrected)	94.65			
13	P value	< 0.0001			
14	P value summary	***			
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
16					
17	ANOVA Table	SS	df	MS	
18	Treatment (between columns)	2.701e+011	8	3.377e+010	
19	Residual (within columns)	4.259e+010	61	6.981e+008	
20	Total	3.127e+011	69		
21					
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
23	Grupo 1 vs Grupo 2	-15730	1.684	No	ns
24	Grupo 1 vs Grupo 3	-25616	2.742	No	ns
25	Grupo 1 vs Grupo 4	9390	1.005	No	ns
26	Grupo 1 vs Grupo 5	-44161	4.727	Yes	*
27	Grupo 1 vs Grupo 6	-181414	19.42	Yes	***
28	Grupo 1 vs Grupo 7	-45957	4.555	Yes	*
29	Grupo 1 vs Grupo 8	-141550	15.15	Yes	***
30	Grupo 1 vs Grupo 9	-31110	3.330	No	ns
31	Grupo 2 vs Grupo 3	-9886	1.058	No	ns
32	Grupo 2 vs Grupo 4	25120	2.689	No	ns
33	Grupo 2 vs Grupo 5	-28431	3.043	No	ns
34	Grupo 2 vs Grupo 6	-165685	17.74	Yes	***
35	Grupo 2 vs Grupo 7	-30227	2.996	No	ns
36	Grupo 2 vs Grupo 8	-125820	13.47	Yes	***
37	Grupo 2 vs Grupo 9	-15380	1.646	No	ns
38	Grupo 3 vs Grupo 4	35005	3.747	No	ns
39	Grupo 3 vs Grupo 5	-18545	1.985	No	ns
40	Grupo 3 vs Grupo 6	-155799	16.68	Yes	***
41	Grupo 3 vs Grupo 7	-20341	2.016	No	ns
42	Grupo 3 vs Grupo 8	-115934	12.41	Yes	***
43	Grupo 3 vs Grupo 9	-5494	0.5881	No	ns
44	Grupo 4 vs Grupo 5	-53550	5.732	Yes	**
45	Grupo 4 vs Grupo 6	-190804	20.42	Yes	***
46	Grupo 4 vs Grupo 7	-55346	5.485	Yes	**
47	Grupo 4 vs Grupo 8	-150939	16.16	Yes	***
48	Grupo 4 vs Grupo 9	-40499	4.335	No	ns
49	Grupo 5 vs Grupo 6	-137254	14.69	Yes	***
50	Grupo 5 vs Grupo 7	-1796	0.1780	No	ns
51	Grupo 5 vs Grupo 8	-97389	10.43	Yes	***
52	Grupo 5 vs Grupo 9	13051	1.397	No	ns
53	Grupo 6 vs Grupo 7	135458	13.42	Yes	***
54	Grupo 6 vs Grupo 8	39865	4.267	No	ns
55	Grupo 6 vs Grupo 9	150305	16.09	Yes	***
56	Grupo 7 vs Grupo 8	-95593	9.474	Yes	***
57	Grupo 7 vs Grupo 9	14847	1.471	No	ns
58	Grupo 8 vs Grupo 9	110440	11.82	Yes	***

4.11 Aspectos éticos

A metodologia aqui apresentado foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FORP - USP, com número de processo nº2017.1.294.58.4.

5. Contribuições Científicas

5. CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS

Constituem contribuições da pesquisa:

1. Como não há literatura até o momento, pesquisas que relacionaram o reparo ósseo em defeitos críticos com a associação da aplicação tópica de melatonina, rhBMP-2 e ROG, trata-se de uma pesquisa inédita.
2. Não há na literatura estudos que avaliaram por meio das metodologias descritas nesse estudo, o reparo ósseo nas associações por nós propostas.
3. Considerando a busca por novas técnicas biológicas que promovam o reparo ósseo e assim favoreçam a cicatrização de defeitos, esse estudo favorece a busca de técnicas alternativas seguras para o tratamento clínico de fraturas, defeitos ósseos e enxertos ósseos, comprovando ou não o uso seguro da associação de rhBMP-2 e da melatonina.
4. Estabelecimento da dose segura para a administração da melatonina, dessa forma conferindo parâmetros clínicos para a sua aplicação tópica associada a rhBMP-2.
5. E, por ser um procedimento terapêutico de fácil utilização, de custo reduzido e com possibilidade de uso prolongado, o uso da melatonina, abrirá novos horizontes, tanto na clínica odontológica como também em ambiente hospitalar.
6. Estabelecimento de metodologias de biologia molecular para estudos na área, bem como ampliação da capacidade de parcerias e projetos em nosso laboratório, com a aquisição deste conhecimento.

6. Resultados

6. RESULTADOS

Não houve nenhuma intercorrência durante o período de cicatrização, em nenhum dos animais, e não foram detectadas reações adversas em nenhum dos locais com defeitos ósseos.

Durante a análise dos resultados, de forma geral, foi evidente que a presença do Scaffold no local do defeito ósseo influenciou o processo de reparo, dificultando a biodisponibilização dos materiais, esse achado é justificado pelos resultados no grupo 2 (coágulo de sangue + Scaffold), cujo os resultados da formação óssea e da imunoistoquímica foram muito reduzidos em comparação com todos os outros grupos.

6.1 Resultados Análise qualitativa e quantitativa

As imagens dos cortes histológicos demonstram o aspecto da formação óssea na região de reparo. Para a análise foi observado a presença de tecido ósseo neoformado, mostrando uma maior quantidade de tecido ósseo nos grupos 6 e 8, que receberam melatonina nas concentrações de 1 e 100 μg , respectivamente, além da presença do Scaffold e da rhBMP2. A presença de células ósseas e sanguíneas, pode ser observada em toda extensão do reparo, como já previsto.

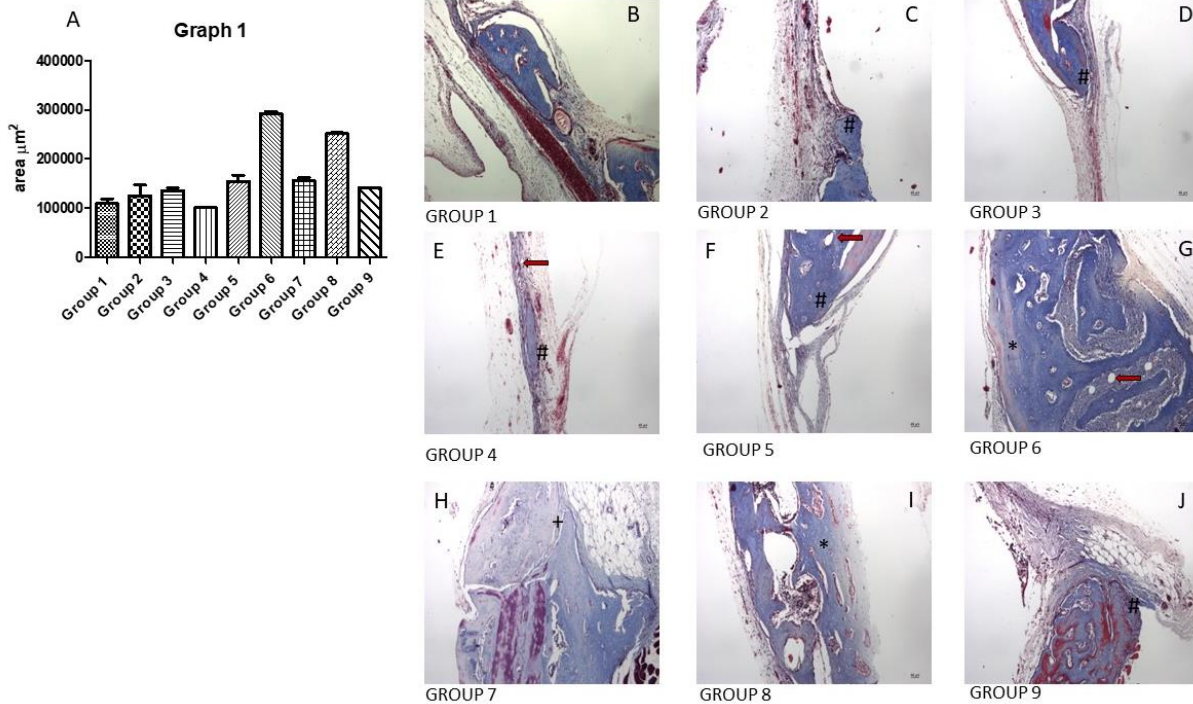
A Figura 10, apresenta um gráfico (gráfico 1 - A), o qual mostra a área de tecido ósseo neoformado em cada grupo estudado e imagens histológicas da área de recuperação óssea de cada grupo experimental (B-J).

O gráfico 1, apresenta os resultados estatísticos da análise quantitativa, enquanto as imagens histológicas, evidenciam os resultados da análise qualitativa.

Nas imagens histológicas, o tecido ósseo e as células sanguíneas podem ser vistos ao lado do tecido ósseo neoformado na área do defeito. A área neoformada do tecido ósseo foi significativamente maior nos grupos 6 e 8 (figura 10 – G e I), fica evidente a quantidade de tecido ósseo, além da presença de células ósseas e grande quantidade de osso neoformado. No gráfico 1, também pode ser observado, nos mesmos grupos (6 e 8), uma maior quantidade de formação óssea, a qual foi estatisticamente significativa, quando comparada com os outros grupos.

Figura 10. Aspectos quantitativos e qualitativos da região dos defeitos ósseos na calvária dos animais em todos os grupos experimentais. (A): O gráfico 1 mostra a área de tecido ósseo neoformado na região dos defeitos ósseos do grupo de controle e dos grupos experimentais. O gráfico revela que houve uma diferença significativa nos

grupos 6 e 8 em relação a todos os outros grupos. (B-J): A coloração tricrômio de Masson foi realizada para evidenciar a formação de tecido ósseo na área de reparo. Foram tiradas fotomicrografias para mostrar o tecido ósseo recém formado na área do defeito de cada grupo. A presença de células osteoblásticas e tecido ósseo recém formado pode ser observada, indicando a reparação óssea dos locais receptores. Coloração do tricrômio de Masson. Barra de escalas: 46 μm . *: maiores quantidades de tecido ósseo neoformado, indicando os melhores resultados da terapia utilizada. #: quantidades menores de tecido ósseo recém formado na região da ferida. +: grandes quantidades de tecido ósseo recém formado, mas sem diferença significativa. Seta vermelha: lacunas ósseas.



A análise estatística revelou uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle (grupo 1), e os grupos experimentais 5, 6, 7, e 8 (grupos com diferentes concentrações de melatonina em associação com rhBMP-2), indicando um efeito positivo da associação para o reparo ósseo. Outras diferenças observadas foram: grupo 2 vs. grupos 6 e 8; grupo 3 vs. grupos 6 e 8; grupo 4 vs. grupos 5, 6, 7 e 8; grupo 5 vs. grupos 6 e 8; grupo 6 vs. grupos 7 e 9; grupo 7 vs. grupo 8; e grupo 8 vs. grupo 9

6.2 Resultados Análise Imunoistoquímica

As reações da análise de imunoistoquímica, foram avaliadas em microscópio de luz convencional por dois observadores calibrados. Considerando apenas a área do reparo ósseo, cada corte histológico foi avaliado quanto à presença ou não de reatividade, a intensidade de reação, a proporção de células marcadas. Os fatores investigados foram: fatores angiogênicos (VEGF e CD31), osteoclastogênicos (OPG), osteogênicos (osteocalcina, osteopontina, runx2) e TRAP.

Os resultados obtidos pela análise da imunoistoquímica confirmaram as observações microscópicas de que a presença do Scaffold na lesão óssea prejudica a ação das substâncias

testadas para melhoria da regeneração óssea, já que, no grupo 2 (coágulo + Scaffold), a imunomarcagem de anticorpos foi muito baixa.

Para todas imagens representativas da imunohistoquímica (Figuras 11- 20), A mostra o grupo controle, B o controle negativo, C grupo 2, e D um grupo representando a reação mais frequente entre todos os grupos, que também pode ser observada na tabela 4. O grupo 2 foi escolhido para ser mostrado em todas as imagens por causa de sua coloração quantitativa, destacando-se pela baixa reação para todos os fatores investigados, indicando um efeito inibidor do Scaffold.

As imagens da imunohistoquímica dos fatores angiogênicos (VEGF e CD31) são mostradas nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Pode ser observado na Tabela 2 e nas imagens que a reação positiva desses fatores foi, geralmente, baixa. A Figura 2C mostra a coloração do grupo 2 (++), e D mostra a coloração do grupo 5 (++), que foi o padrão de coloração mais observado entre todos os grupos. A Figura 3C mostra a coloração do grupo 2 (+), e D mostra a coloração do grupo 6 (+), o padrão de coloração mais observado entre todos os grupos.

A imunomarcagem para osteoprogesterina (OPG), que é um fator de osteoclastogênese, é mostrado na Figura 13. Em C, a marcação no grupo 2 é representada como (+) e em D, o padrão de coloração mais observado entre os grupos (++++) é representado pelo grupo 6.

As figuras 14-16 mostram a reação positiva das interleucinas 1 β , 6, e 10, respectivamente. Em todos eles, o grupo 2 também mostrou uma marcação muito fraca. Para a interleucina 1 β , a marcação (++) foi a mais predominante em todos os grupos (Figura 14D). Para a interleucina 6, a marcação (++++) foi a mais comum (Figura 15D), assim como para a interleucina 10, para a qual a marcação (++++) também prevaleceu em todos os grupos (Figura 16D).

As figuras 17-19 mostram a imunomarcagem para fatores osteogênicos: osteocalcina, osteopontina, e RUNX2, respectivamente. Em todos eles, a menor marcação também ocorreu no grupo 2. A figura 18D mostra uma marcação significativa (++++) de osteopontina, que é um forte marcador de formação óssea, justificada pelo efeito do rhBMP-2.

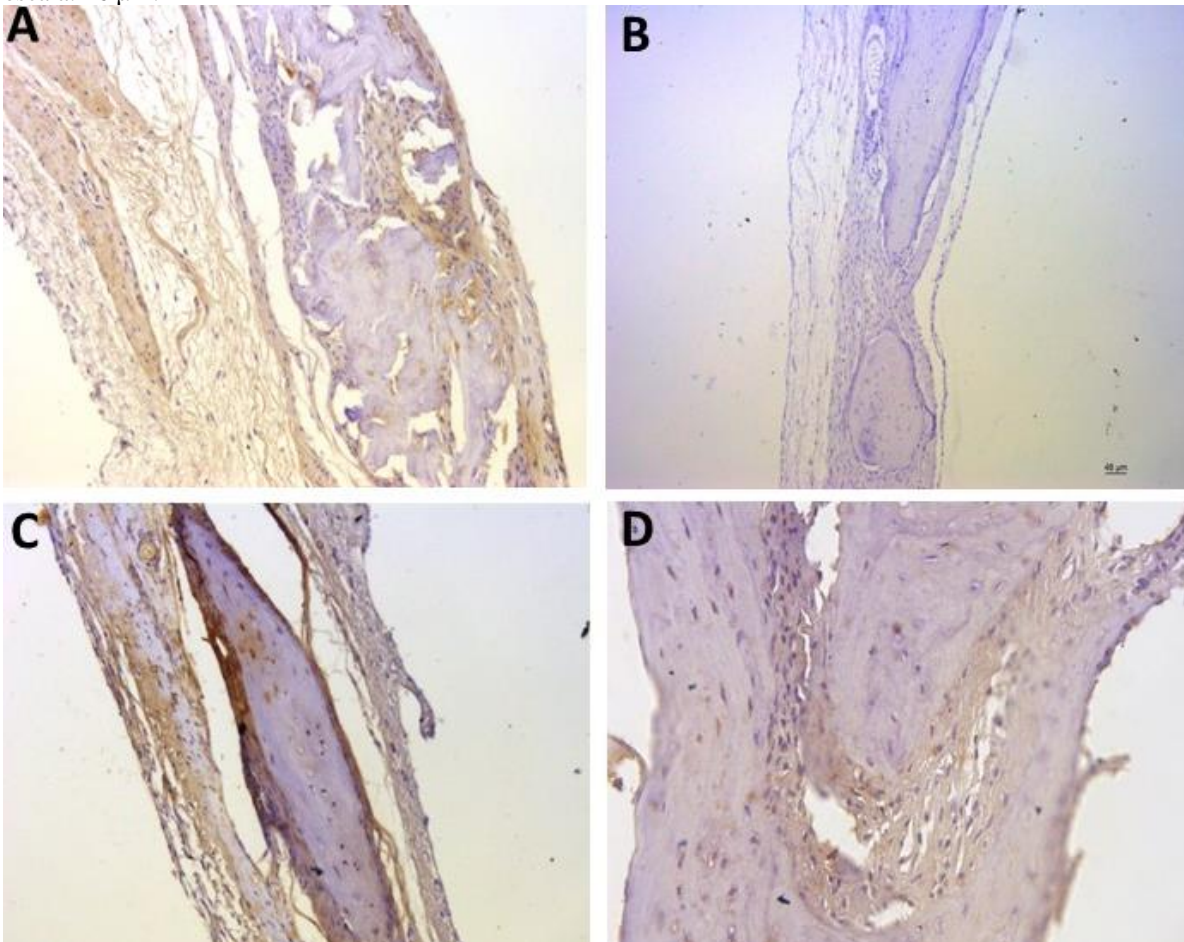
A figura 20 representa a imunomarcagem para TRAP. Mais uma vez, a menor marcação (+) ocorreu no grupo 2 (Figura 20C), e o padrão de coloração mais observado entre os outros grupos (++) , é representado pelo grupo 4 (Figura 20D).

Tabela 4. Intensidade de reação imunohistoquímica para todos os fatores investigados em todos os grupos experimentais.

Grupo	Grupo	Grupo	Grupo	Grupo	Grupo	Grupo	Grupo	Grupo
1	2	3	4	5	6	7	8	9

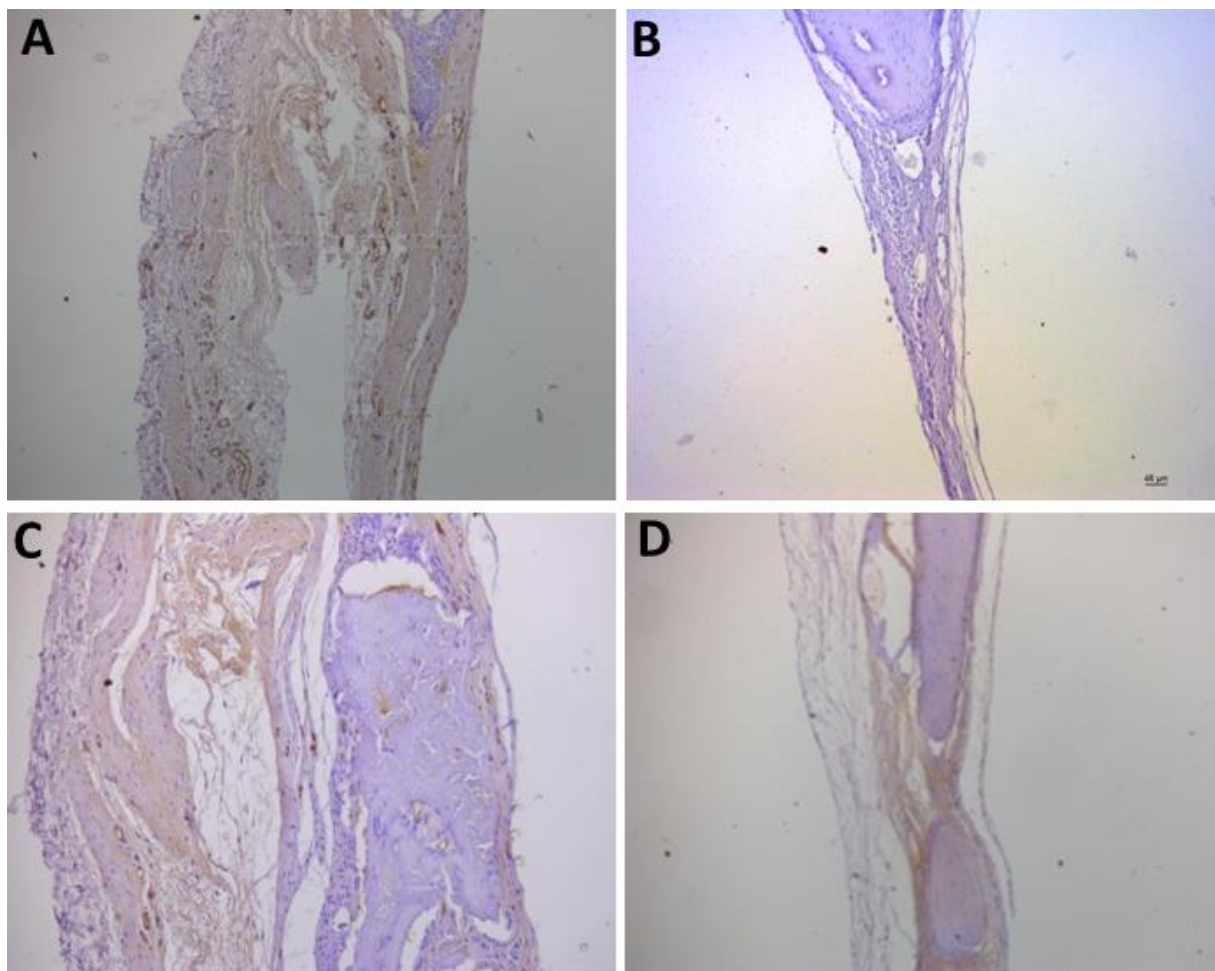
OPG	++++	+	+++	+++	+++	++++	++	++++	+++
CD31	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL1 β	++	++	++	+++	++	++	++	++	++
IL6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
IL10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Osteocalcina	+++	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++
Osteopontina	++++	++	++	++	++	++++	+++	++++	++++
RUNX2	++	+	++	++	++	+++	++	+++	+++
TRAP	++	+	++	++	++	++	++	++	++
VEGF	++	++	++	++	++	++	+++	++	++

Figura 11. Imagens representativas da imunistoquímica para coloração VEGF. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (++); (D) grupo 5 com marcação considerada (++) , o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris foi manchada. Barra de escala: 46 μ m.



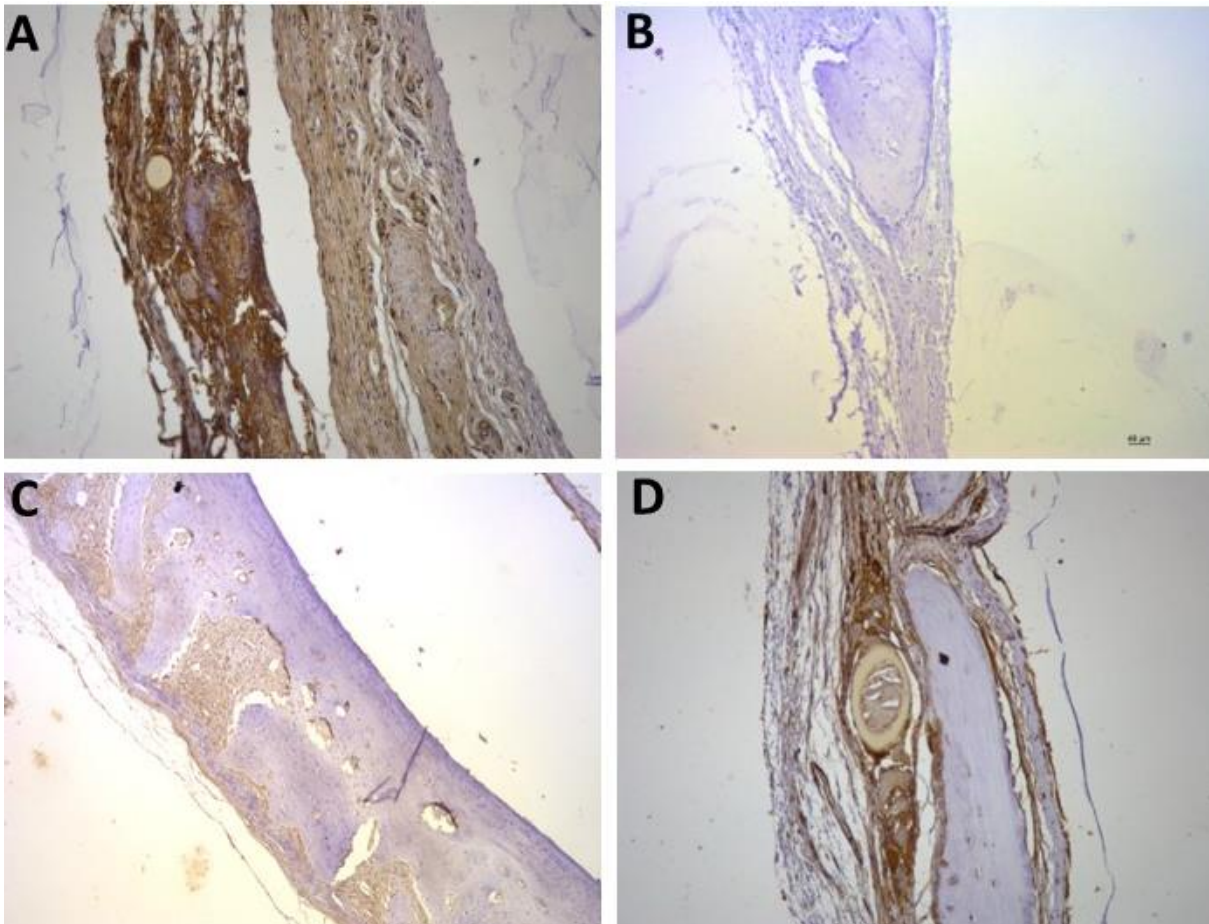
Fonte: autoria própria

Figura 12. Imagens representativas da imunistoquímica para coloração do CD31. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (+); (D) grupo 6 com marcação considerada (+); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris contra-manchada. Barra de escala: 46 μ m.



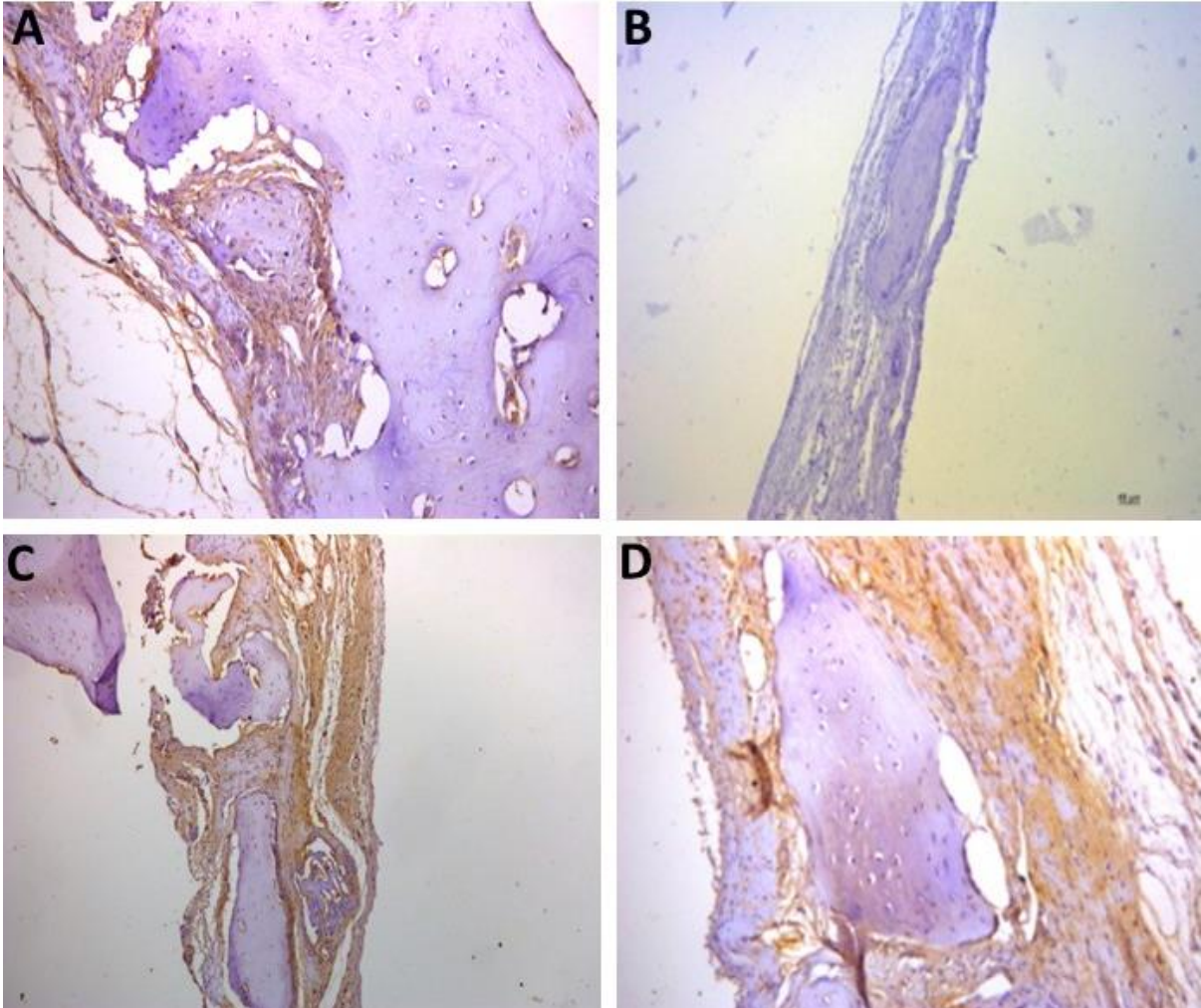
Fonte: autoria própria

Figura 13. Imagens representativas da imunistoquímica para coloração de OPG. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (+); (D) grupo 6 com marcação considerada (++++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris contra-manchada. Barra de escala: 46 μ m.



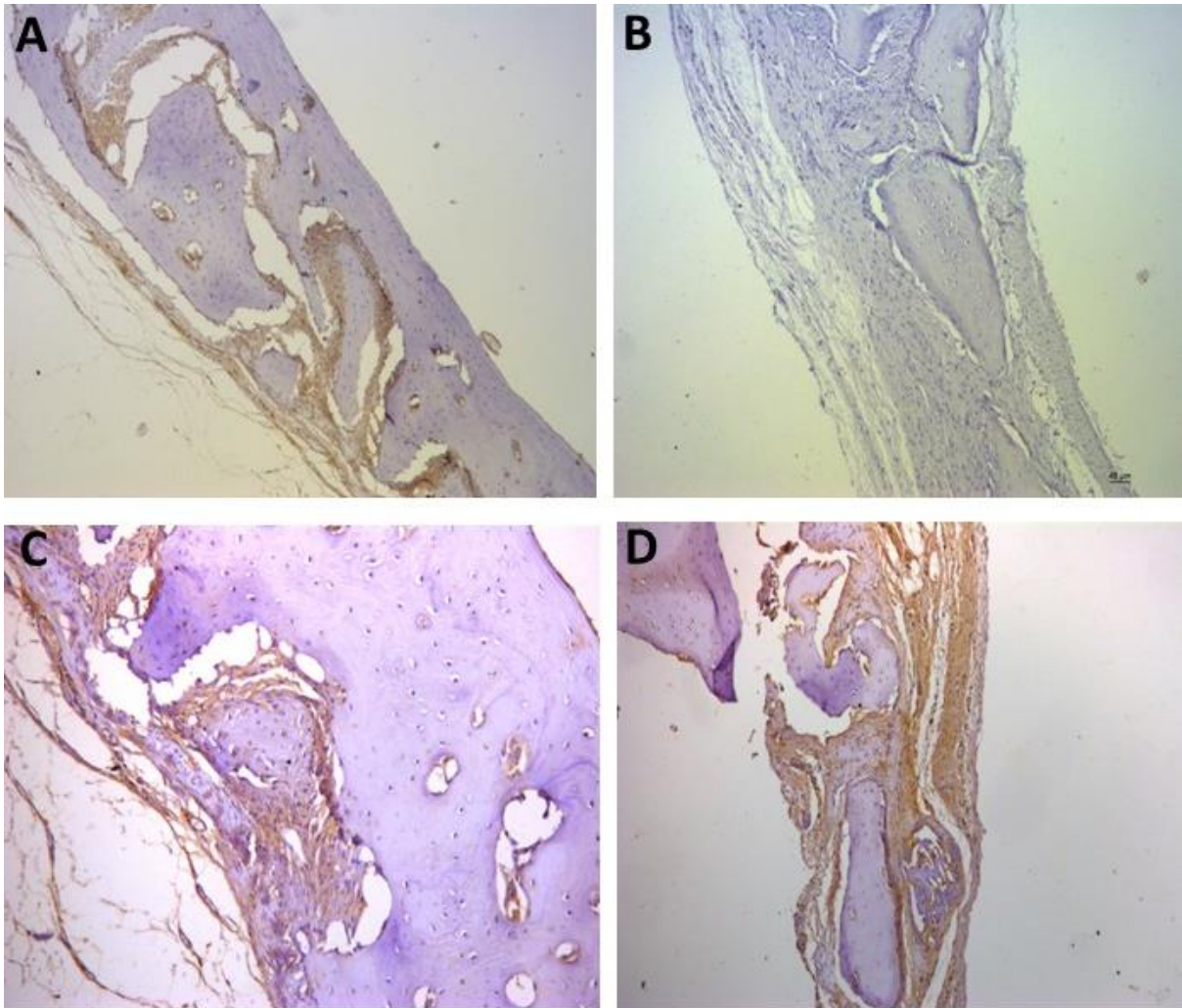
Fonte: autoria própria

Figura 14. Imagens representativas da imunohistoquímica para coloração IL1 β . (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (++); (D) grupo 7 com marcação considerada (++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris foi manchada. Barra de escala: 46 μ m.



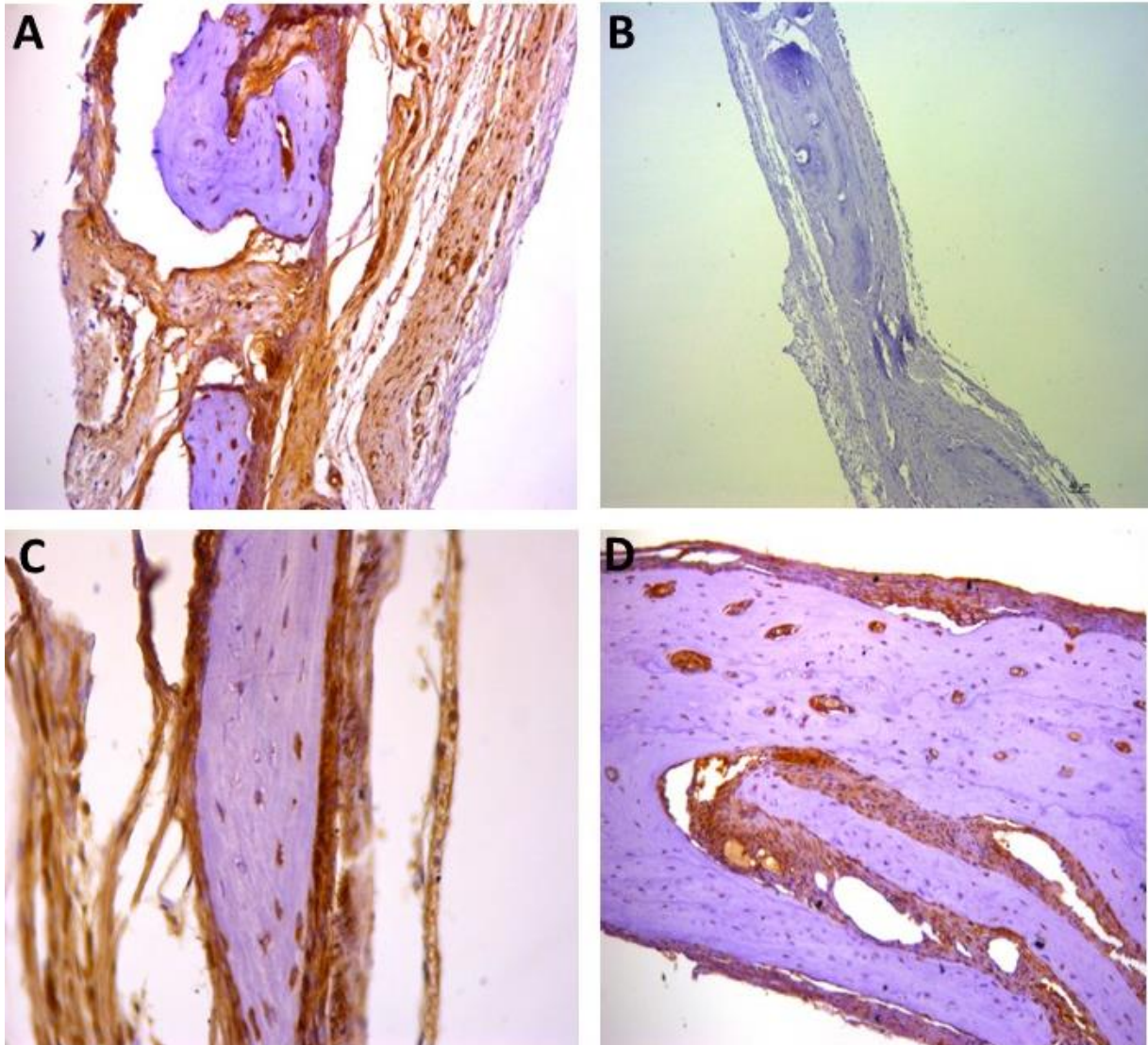
Fonte: autoria própria

Figura 15. Imagens representativas da imunohistoquímica para coloração de IL6. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (+++); (D) grupo 3 com marcação considerada (+++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris contra-manchada. Barra de escala: 46 μ m.



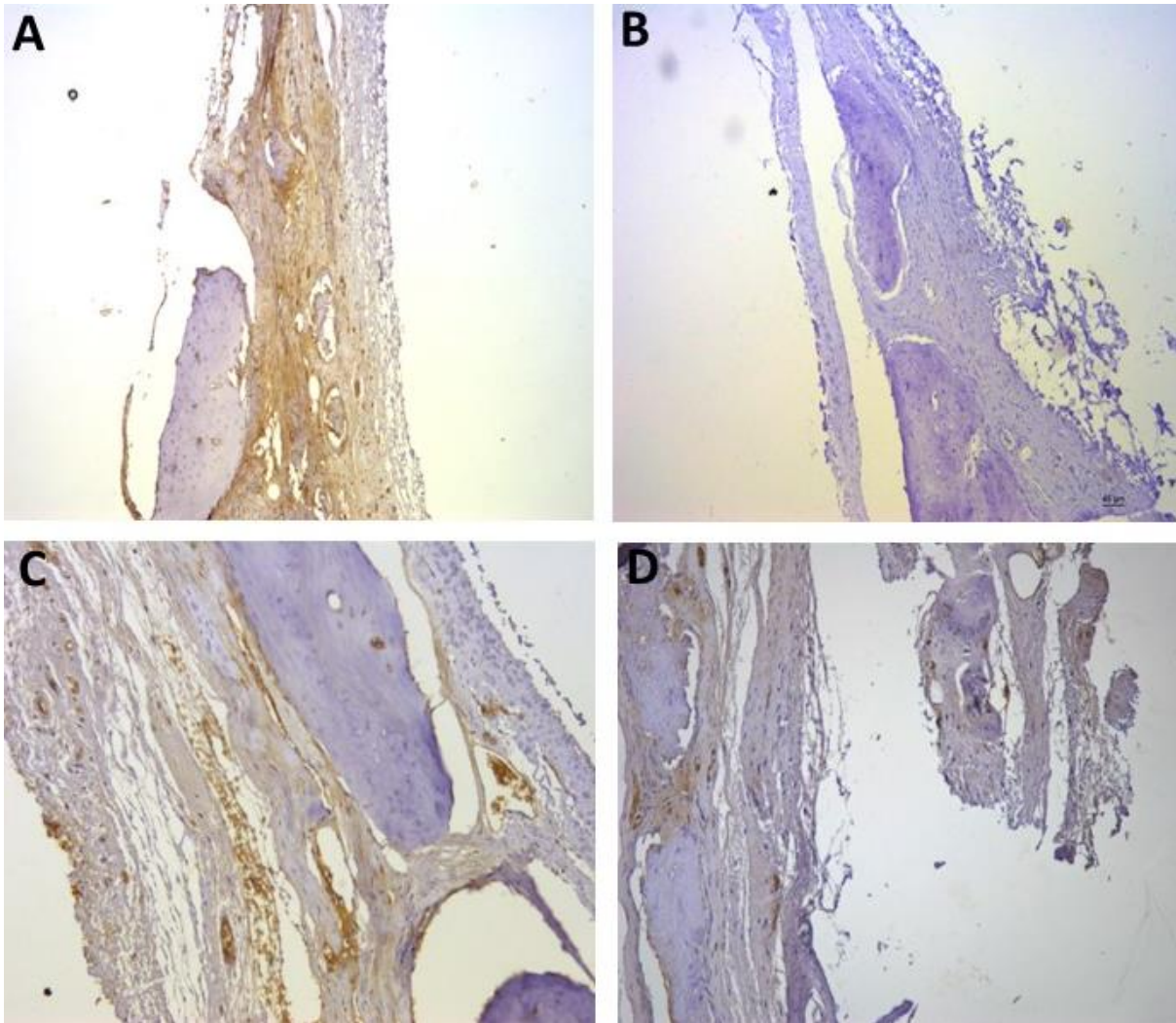
Fonte: autoria própria

Figura 16. Imagens representativas da imunohistoquímica para coloração de IL10. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (+++); (D) grupo 5 com marcação considerada (+++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris foi manchada. Barra de escala: 46 μ m.



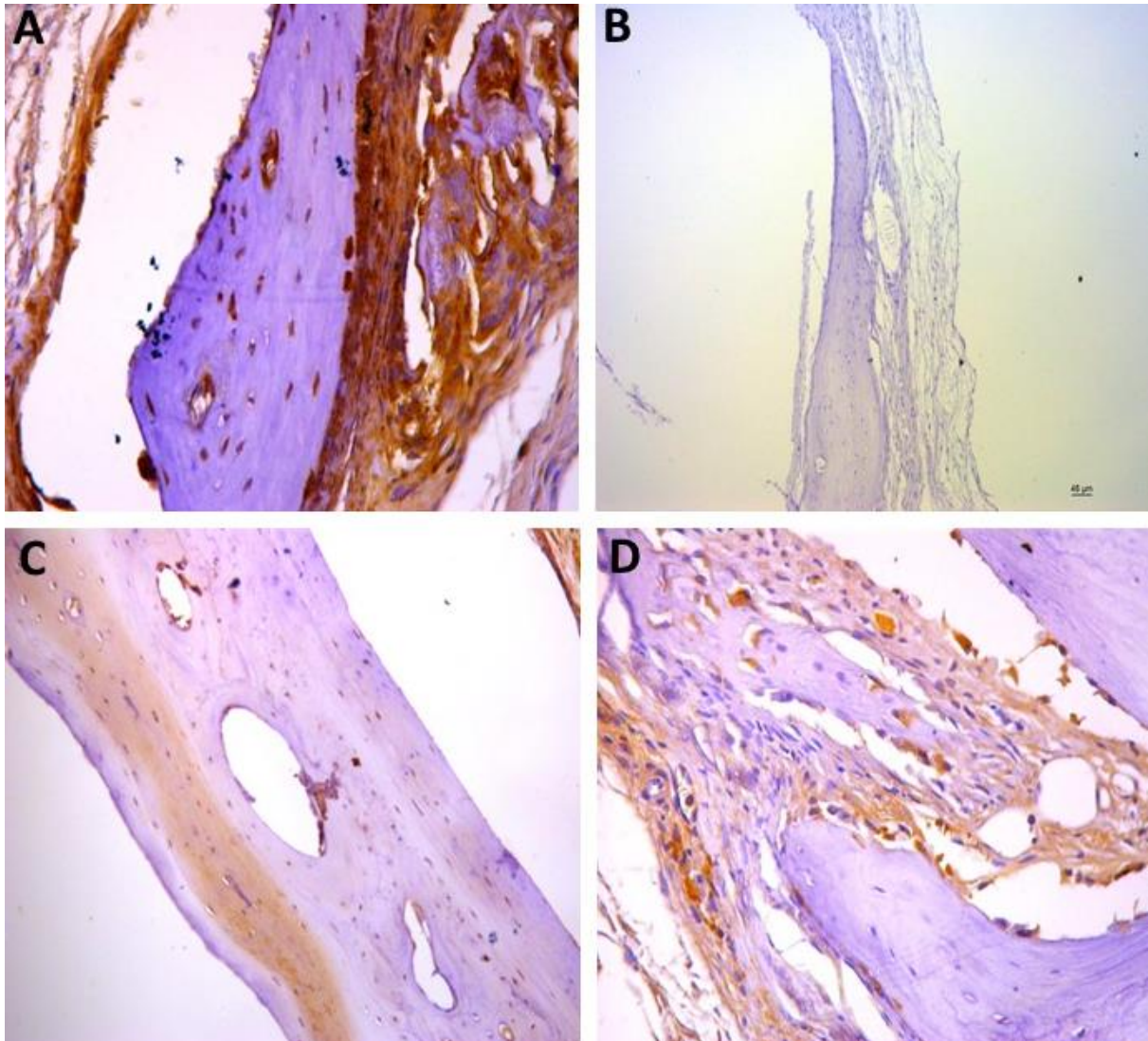
Fonte: autoria própria

Figura 17. Imagens representativas da imunohistoquímica para coloração de osteocalcina. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (+); (D) grupo 8 com marcação considerada (+++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris foi manchada. Barra de escala: 46 μ m.



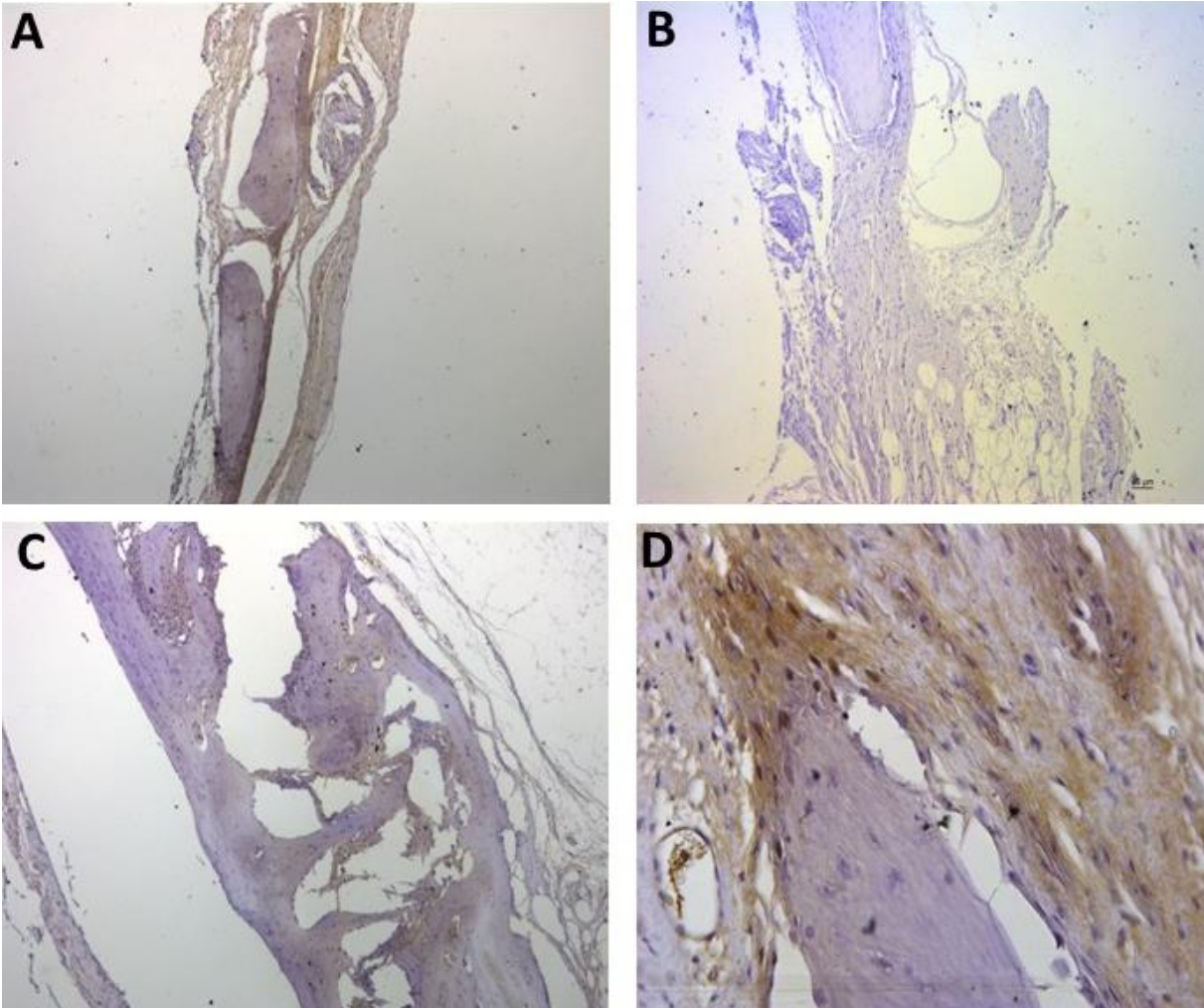
Fonte: autoria própria

Figura 18. Imagens representativas da imunohistoquímica para coloração de osteopontina. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (++); (D) grupo 9 com marcação considerada (+++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris contra-manchada. Barra de escala: 46 μ m.



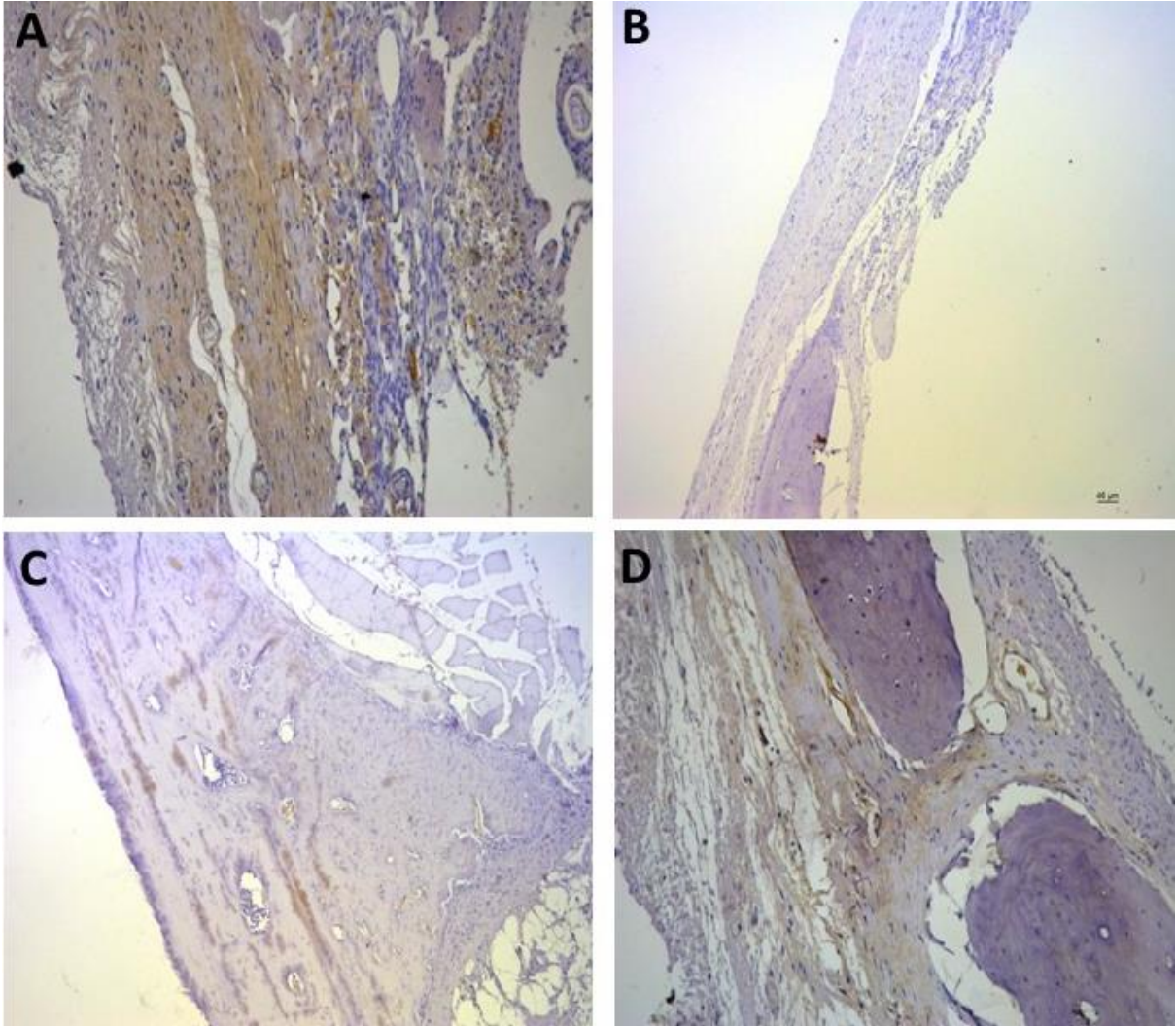
Fonte: autoria própria

Figura 19. Imagens representativas da imunohistoquímica para a coloração RUNX2. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (+); (D) grupo 3 com marcação considerada (++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris foi manchada. Barra de escala: 46 μ m.



Fonte: autoria própria

Figura 20. Imagens representativas da imunohistoquímica para coloração TRAP. (A) grupo controle; (B) controle negativo; (C) grupo 2 com marcação considerada (+); (D) grupo 4 com marcação considerada (++); o padrão de coloração mais observado entre os grupos analisados. A hematoxilina de Harris foi manchada. Barra de escala: 46 μ m.



Fonte: autoria própria

7. Discussão

7. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o uso tópico da melatonina em diferentes concentrações, associadas ou não ao rhBMP-2, para melhorar o reparo ósseo em defeitos ósseos cirúrgicos usando a técnica ROG. Este tratamento é promissor por ser uma nova técnica alternativa segura para o tratamento clínico de fraturas, defeitos ósseos e enxertos ósseos. Não há relatos na literatura que tenham avaliado a reparação óssea, nesse tipo de defeito, utilizando as metodologias descritas no presente estudo.

As análises de alta resolução utilizadas neste estudo permitiram uma melhor compreensão de como o tecido ósseo reagiu aos diferentes tratamentos, bem como avaliar as etapas biológicas do reparo ósseo. Isto porque a maioria dos estudos utiliza secções únicas ou múltiplas de tecido, reduzindo a sensibilidade dos dados histológicos. O uso das mensurações histológicas, como as aqui aplicadas utilizando microscópio e softwares de ponta associado aos conhecimentos histomorfométricos dos pesquisadores, expande a gama de variáveis investigadas e proporciona maior acurácia na quantificação da reação tecidual, melhorando os métodos de análise quantitativa ⁽¹⁰⁷⁾.

A implantação da modalidade da análise imunoistoquímica amplia o arcabouço de variáveis que podemos buscar, funciona como uma ferramenta nas pesquisas para compreensão e elucidação de como ocorre o reparo ósseo, além de uma maior precisão da reação do tecido como um todo, dentre as metodologias aplicadas.

Os defeitos ósseos em calvária de ratos são amplamente utilizados no meio científico de pesquisa para análise histológica e de imagem analítica devido à estabilidade dos ossos em termos de movimentos e devido a uniformidade da estrutura, além de possuir origem embriológica única por mecanismo de ossificação intramembranosa. O modelo experimental utilizado neste estudo foi projetado para reproduzir um defeito ósseo crítico, uma vez que estes são os defeitos mais complexos para regeneração, devido à dificuldade de cura espontânea completa. Os defeitos ósseos críticos na calvária são utilizados para avaliar diferentes materiais como alternativas viáveis e seguras para restaurar a arquitetura óssea, principalmente na região craniofacial ^(108,109).

Neste sentido, para escolher um material ou substância que favoreça a regeneração óssea, a segurança do material para o organismo é essencial. Portanto, é necessário levar em consideração algumas propriedades fundamentais do material escolhido, tais como biocompatibilidade, osteogênese, osteoindução e osteocondução ^(110,111).

Um dos grupos do estudo foi o coágulo sanguíneo autólogo, próprio do animal, que apresenta a capacidade de por si só ser um agente fisiológico para induzir a formação óssea, devido à presença de várias células que favorecem este processo. Grgurevic L., et al., (2020) demonstraram que o coágulo pode atuar como um transportador de rhBMP nativo para a formação óssea ⁽¹¹²⁾.

Há relatos de melatonina, ROG, e rhBMP-2 utilizados para proporcionar um reparo ósseo eficaz. Os autores afirmaram que a melatonina exerce um efeito osteogênico, enquanto que a rhBMP-2 atua por osteoindução, e a esponja de colágeno fornece osteocondução, ou seja, a primeira faz com que células mesenquimais indiferenciadas se diferenciem em tipos celulares produtores de matriz óssea e o segundo, cria um ambiente favorável para migração de células osteoapósitas. Atualmente, sabe-se que a melatonina tem propriedades relacionadas ao metabolismo ósseo, e seu uso favorece o reparo ósseo devido às propriedades osteogênicas e antiosteoclásticas ^(113,114,115).

Wang et al. (1990) demonstraram que a dose de rhBMP-2 é crítica para a formação óssea ⁽¹¹⁶⁾. Em nosso estudo, a escolha de uma dose de 5 µg de rhBMP-2 foi baseada em estudos de Kotake et al. (2015) e Gonzaga et al. (2019), que usaram 5 µg desta proteína e mostraram uma contribuição significativa da mesma para a formação óssea em defeitos críticos ⁽¹⁰⁹⁾.

A rhBMP-2 é uma proteína morfogenética amplamente estudada com um papel importante em processos biológicos, principalmente relacionados ao tecido ósseo. Ela apresenta um papel osteoindutor poderoso de reparar e regenerar o tecido ósseo, pois atua enviando sinais morfogênicos para migração, proliferação e diferenciação de células mesenquimais em tecido ósseo. Entretanto, seu uso sozinho tem a desvantagem de apresentar rápida dissolução no meio em que é aplicado, sendo portanto um material de alto custo, exigindo portanto um material carreador para que possibilite sua biodisponibilização lenta, gradual e segura ^(117,118).

A técnica de regeneração óssea guiada (ROG) tornou-se um procedimento clínico bem documentado e bem sucedido que foi desenvolvido para ajudar na reconstrução óssea, principalmente do osso alveolar na área odontológica. O princípio fundamental da ROG é funcionar como uma barreira, impedindo que tecidos não osteogênicos, como células epiteliais e conjuntivas, invadam a área de reparo ósseo. Além disso, ele também cria um compartimento bioativo com a capacidade de formar uma estrutura que garanta a osteocondução ⁽¹¹⁹⁾. Assim, o uso do ROG já está bem estabelecido na literatura para terapias destinadas ao reparo ósseo ^(120,121).

Jung et al. (2003) concluíram que a combinação de um substituto mineral ósseo xenogênico com rhBMP-2 pode melhorar o processo de maturação da regeneração óssea,

demonstrando o potencial do rhBMP-2 para melhorar e acelerar previsivelmente a terapia de regeneração óssea guiada ⁽¹²²⁾. Schorn et al. (2017) avaliaram a associação do rhBMP-2 e VEGF com um portador de colágeno e também tiveram bons resultados com a formação vertical do osso ⁽¹²³⁾. Wikesjö et al. (2004) também obtiveram bons resultados com o uso do rhBMP-2 associado à regeneração óssea ^(124,125,126, ,127,128).

Como já mencionado, as proteínas osteoindutoras requerem um transportador devido à sua curta meia vida biológica e para que sejam liberadas de forma gradual e prolongada. Elas também atuam como um sistema de entrega e como suporte para o crescimento celular. A combinação de uma proteína osteoindutora (rhBMP-2) com um material osteocondutor possibilita superar algumas das dificuldades encontradas com as técnicas atuais de regeneração óssea, justificando a escolha da ROG neste estudo.

Além de atuar sobre a diferenciação celular mesenquimal, a regulação osteoblástica, a quimiotaxia e a mitose durante a reparação óssea ⁽¹²⁹⁾, o uso do rhBMP-2 acelera efetivamente a regeneração óssea.

Diante de tudo isso, um grande reparo ósseo foi previsto nos grupos 3, 4, 5 e 9, pois eles apresentaram as associações isoladas entre melatonina e scaffold, e rhBMP-2 e scaffold. No grupo 9, no qual a associação era coágulo + scaffold + 5 µg rhBMP-2, não houve uma grande resposta de formação óssea, como observado nos grupos 3, 4 e 5 (coágulo + scaffold + melatonina em diferentes concentrações, 1,10 e 100 µg, respectivamente). Esperava-se que nestes grupos pudesse ser observada uma alta formação óssea devido aos efeitos osteogênicos do uso isolado de melatonina ou rhBMP-2, uma vez que são agentes que possibilitam a formação óssea na área de reparo. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Sampath et al. (1981) que revelaram que a rhBMP2 associado ao suporte de colágeno é capaz de induzir a formação óssea em diferentes locais, favorecendo a regeneração óssea ⁽¹³⁰⁾. Da mesma forma, Burkus et al. (2009) demonstraram que o uso de rhBMP-2, aplicado dentro de uma esponja de colágeno absorvível, foi capaz de induzir a formação óssea ⁽¹³¹⁾. A partir de nossos resultados, podemos inferir que a presença do scaffold inibiu a regeneração óssea no local do defeito, atuando, possivelmente, como uma barreira física para a migração e ação da melatonina e do rhBMP-2. Os grupos 6 (coágulo de sangue + scaffold + 1 µg de melatonina + 5 µg de rhBMP-2) e 8 (coágulo de sangue + scaffold + 100 µg de melatonina + 5 µg de rhBMP-2) apresentaram a mesma combinação de substâncias, com uma diferença na concentração de melatonina, e foram os únicos que apresentaram um aumento significativo na formação óssea em comparação com os outros grupos. Esta diferença significativa pode ser explicada pela ação do rhBMP-2, pois é, por si só, um indutor da formação óssea ^(132,133,134).

No presente estudo foi observado nos grupos 3, 4 e 5 que a melatonina praticamente não teve ação na regeneração óssea e na expressão gênica de fatores relacionados a melhora na reparação óssea, indicando mais uma vez que sua biodisponibilização foi altamente prejudicada pelo scaffold em nosso modelo experimental, diferindo dos estudos que revelaram a formação óssea apenas com o uso da melatonina ^(135,136).

A análise qualitativa revelou que os grupos experimentais 6, 7, 8 e 9 apresentaram visualmente uma maior quantidade de trabéculas ósseas reparadoras na área do defeito ósseo. Entretanto, ainda havia uma grande área a ser reparada quando comparada com os outros grupos.

A análise histomorfométrica, revelou a maior quantidade de tecido ósseo neoformado para o grupo 6 (coágulo de sangue + scaffold + 1 µg de melatonina + 5 µg de rhBMP-2), indicando que a dose mais baixa de melatonina utilizada, nas associações propostas, mostrou uma resposta osteogênica maior quando comparada com os outros grupos, este achado aponta que a menor dose de melatonina já é suficiente e segura para exercer efeitos osteogênicos, entretanto outros estudos ainda precisam ser realizados, visto que na metodologia aqui utilizada, a esponja de colágeno interferiu na resposta do reparo ósseo.

A imunoistoquímica foi realizada utilizando biomarcadores angiogênicos (CD31 e VEGF), osteoclastogênico (OPG), osteogênico (osteocalcina, osteopontin e RUNX2), pró-inflamatório (interleucina 1, 6 e 10 e TNF alfa) e TRAP. Nos resultados obtidos pela imunoistoquímica, é possível notar a fraca marcação dos fatores envolvidos na reparação óssea (fatores angiogênicos e osteogênicos), especialmente no grupo 2, o que reforça a hipótese de inibição da reparação óssea causada pelo uso do scaffold. Apesar disto, mais uma vez, os melhores resultados foram obtidos nos grupos 6 e 8, corroborando com as observações histológicas de um melhor processo de reparação óssea nos grupos tratados com melatonina 1 e 100 µg, associados ao rhBMP-2, respectivamente.

É importante ressaltar que as combinações de melatonina na menor dose, associado ao rhBMP2 na concentração de 5 µg representa um grande potencial de reparação óssea, pois apesar do efeito inibitório e do tempo curto adotado na metodologia, houve resultados significantes.

Apesar das diferentes situações metodológicas encontradas que resultaram nos dados aqui apresentados, este trabalho se mostrou inovador, pois mostrou o caminho para como estes estudos podem ser direcionados, tendo em vista que grande parte dos estudos relacionados com expressão gênica em ossos estão diretamente correlacionados com implantes ósseos ^(137,138,139, 140). Merece ser destacado que o modelo experimental aqui utilizado, o rato, não representa o

modelo ideal para estudos envolvendo cicatrização/reparação óssea, por ser um animal de metabolismo acelerado não possibilitando, portanto, o estudo preciso dos fenômenos individuais deste processo cicatricial, como os quais aqui abordados. Por outro lado, o rato possibilita um bom número amostral e, portanto, de efeito significativo em termos de resultados baseados nas metodologias aqui empregadas.

8. Conclusão

8. CONCLUSÃO

De acordo com as metodologias utilizadas e dentro dos limites que elas proporcionam, a associação da melatonina (1 μg) com 5 μg rhBMP-2, através da técnica de regeneração óssea guiada, foi capaz de demonstrar alguns efeitos ainda que leves na reparação óssea de defeitos ósseos críticos na calvária de ratos, em um curto espaço de tempo de reparo ósseo, mas este processo também foi inibido pela presença do scaffold, em todos os grupos. Deste modo, pesquisas futuras devem ser feitas, buscando-se produzir materiais dotados de características que favoreçam a formação do coágulo.

Referências Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS¹

1. LUDWIG, S.C.; KOWALSKI, J.M.; BODEN, S.D. Osteoinductive bone graft substitutes. **Eur Spine J.**, (Suppl 1):S119-25, 2000.
2. KURZ, L.T.; GARFIN, S.R.; BOOTH RE, J.R. Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. **Spine (Phila Pa 1976)**, v.14, n. 12, p.1324-31, 1989.
3. KIM, D.H.; RHIM, R.; LI, L.; MARTHA, J.; SWAIM, B.H.; BANCO, R.J.; JENIS, L.G.; TROMANHAUSER, S.G. Prospective study of iliac crest bone graft harvest site pain and morbidity. **Spine J.**, v. 9, n. 11, p. 886-92, 2009.
4. HENEGHAN, H.M. MCCABE JP. Use of autologous bone graft in anterior cervical decompression: morbidity & quality of life analysis. **BMC Musculoskelet Disord.**, v. 16, p. 10:158, 2009.
5. LEI, H.; GUI, L.; XIAO, R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. **Clin. Biochem.**, v. 42, p. 1452–1460, 2009.
6. PANDI-PERUMAL, S.R.; SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G.J.; CARDINALI, D.P.; POEGGELER, B.; Hardeland, R. Melatonin, Nature's most versatile biological signal? **FEBS J.**, v. 273, p. 2813–2838, 2006.
7. ZAWILSKA, J.B.; SKENE, D.J.; ARENDT, J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. **Pharm. Rep.**, v. 61, p. 383–410, 2009.
8. LIMA, F.B.; MACHADO, U.F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P.M.; SUMIDA, D.H. *et al.* Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am. J. Physiol.**, 275, 934–941, 1998.
9. CONTI, A.; CONCONI, S.; HERTENS, E.; SKWARLO-SONTA, K.; MARKOWSKA, M.; MAESTRONI, J.M. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. **J. Pineal. Res.**, v. 28, p. 193–202, 2000.
10. Hardeland, R.; Madrid, J.A.; Tan, D.X.; Reiter, R.J. Melatonin, the circadian multioscillator system and health, the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. **J. Pineal. Res.**, v. 52, p. 139–166, 2012.
11. GREENSPAN SL DRESNER-POLLAK, R.; PARKER, R.A.; London, D.; FERGUSON, L. Diurnal variation of bone mineral turnover in elderly men and women. **Calcif. Tissue Int.**, v. 60, p. 419–423, 1997.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

12. OSTROWSKA, Z.; KOS-KUDLA, B.; MAREK, B.; KAJDANIUK, D. Influence of lighting conditions on daily rhythm of bone metabolism in rats and possible involvement of melatonin and other hormones in this process. **Endocr. Regul.**, 37, 163–174, 2003.
13. KOYAMA, H.; NAKADE, O.; TAKADA, Y.; KAKU, T.; LAU, K.H. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. **J. Bone Min. Res.**, v. 17, p. 1219–1229, 2002.
14. NAKADE, O.; KOYAMA, H.; ARIJI, H.; YAJIMA, A.; KAKU, T. Melatonin stimulates proliferation and type I synthesis in human bone cells in vitro. **J. Pineal Res.**, v. 27, p. 106–110, 1999.
15. 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.
16. 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.
17. PARK, K.H.; KANG, J.W.; LEE, E.M.; KIM, J.S.; RHEE, Y.H.; KIM, M.; JEONG, S.J.; PARK, Y.G.; KIM, S.H. Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ERK/Wnt signaling pathways. **J. Pineal Res.**, v. 51, p. 187–194, 2011.
18. ZHANG, L.; SU, P.; XU, C.; CHEN, C.; LIANG, A.; DU, K.; PENG, Y.; HUANG, D. Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPAR-gamma expression and enhancing Runx2 expression. **J. Pineal. Res.**, v. 49, p. 364–372, 2010.
19. CUTANDO, A.; ARANA, C.; GÓMEZ-MORENO, G.; ESCAMES, G.; LÓPEZ, A.; FERRERA MJREITER, R.J.; ACU-A-CASTROVIEJO, D. Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. **J. Periodontol.**, v. 78, p. 576–583, 2007.
20. MEDIERO, A.; WILDER, T.; PEREZ-ASO, M.; CRONSTEIN, B.N. Direct or indirect stimulation of adenosine A2A receptors enhances bone regeneration as well as bone morphogenetic protein-2. **FASEB J.**, v. 29, p. 1577–1590, 2015.
21. RIPAMONTI, U.; REDDI, A.H. Periodontal regeneration, potential role of bone morphogenetic proteins. **J. Periodontal. Res.**, v. 29, p. 225–235, 1994, 1994.
22. ISSA, J.P.M.; DEFINO, H.L.A.; COUTINHO-NETTO, J.; VOLPON, J.B.; REGALO, S.C.H.; SIÉSSERE, S.; TIOSSI, R. Evaluation of rhBMP-2 and natural late as potential osteogenic proteins in critical size defects by histomorphometric methods. **Anat. Record.**, v. 293, p. 794–801, 2010.
23. SIÉSSERE, S.; SOUSA, L.G.; ISSA, J.P.M.; IYOMASA, M.M.; PITOL, D.L.; BARBOSA, A.P.A.; SEMPRINI, M.; SEBALD, W.; BENTLEY, M.V.; REGALO, S.C.H. Application of low-level laser irradiation (LLLI) and rhBMP-2 in critical bone defect of ovariectomized rats, histomorphometric evaluation. **Photomed. Laser Surg.**, v. 29, p. 453–458, 2011.

24. ISSA, J.P.; GONZAGA, M.; KOTAKE, B.G.; DE LUCIA, C.; ERVOLINO, E.; IYOMASA, M. Bone repair of critical size defects treated with autogenic, allogenic, or xenogenic bone grafts alone or in combination with rhBMP-2. **Clin. Oral. Impl. Res.**, v. 27, n. 5, p. 558–566, 2016.
25. HOLLINGER, J.O.; ULUDAG, H.; WINN, S.R. Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 31, n. 3, p. 303-318, 1998.
26. KIRKER-HEAD, C.A. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 43, n. 1, p. 65-92, 2000.
27. WIKESJÖ, U.M.E.; QAHASH, M.; POLIMENI, G.; SUSIN, C.; SHANAMAN, R.H.; ROHRER, M.D.; WOZNEY, J.M.; SALÃO, J. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2, histologic observations. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, n. 11, p. 1001–1010, 2008.
28. Kotake, B.G.; Salzedas, L.M.; Ervolino, E.; Calzzani, R.A.; Sebald, W.; Issa, J.P.M. Bone Recuperation After rhBMP-2 Insertion in Alcoholic Animals-Experimental Study. **Curr. Pharm. Des.** **2015**, *21*, 3557–3564.
29. SCHINDELER, A.; MCDONALD, M.M.; BOKKO, P.; LITTLE, D.G. Bone remodeling during fracture repair the cellular picture. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 19, n. 5, p. 459–466, **2008**.
30. GEIGER, M.; LI, R.H.; FRIESS, W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 55, n. 12, p. 1613-29, 2003.
31. TURRI, A.; ELGALI, I.; VAZIRISANI, F.; JOHANSSON, A.; EMANUELSSON, L.; DAHLIN, C.; THOMSEN, P.; OMAR, O. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment. **Biomaterials**, v. 84, p. 167–183, 2016.
32. GRUBER, R.; STADLINGER, B.; TERHEYDEN, H. Cell-to-cell communication in guided bone regeneration, molecular and cellular mechanisms. **Clin. Oral Implant. Res.**, v. 28, p. 1139–1146, 2017.
33. Haas, R.; Haidvogel, D.; Donath, K.; Watzek, G. Freeze-dried homogeneous and heterogeneous bone for sinus augmentation in sheep. Part I, histological findings. **Clin. Oral Implant. Res.** **2012**, *13*, 396–404.
34. GÓMEZ-MORENO, G.; AGUILAR-SALVATIERRA, A.; BOQUETE-CASTRO, A.; GUARDIA, J.; PIATTELLI, A.; PERROTTI, V. Outcomes of topical applications of melatonin in implant dentistry. **Implant. Dent.**, v. 24, n. 25–30, 2015.
35. RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, M.P.; CALVO-GUIRADO, J.L.; DE-VAL, J.E.M.S.; DELGADO-RUIZ, R.A.; NEGRI, B.; PARDO-ZAMORA, G. Melatonin promotes angiogenesis during repair of bone defects, A radiological and histomorphometric study in rabbit tibiae. **Clin. Oral Investig.**, v. 17, p. 147–158, 2013.
36. CUTANDO, A.; GÓMEZ-MORENO, G.; ARANA, C.; MUNOZ, L.; LOPEZ-PENA, M.; STEPHENSON, J. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. **J. Pineal. Res.**, v. 45, p. 174–179, 2008.

37. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. HISTOLOGIA BÁSICA. 13a. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; 2017.
38. COHEN, M.M. JR. The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. **Am J Med Genet A.**, v. 140, n. 23, p. 2646-706, 2006.
39. MACKIE, E.J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 35, n. 9, p. 1301-5, 2003.
40. CERRI, P.S. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.**, v. 6, n. 1, p. 833-40, 2005.
41. LECANDA, F.; AVIOLI, L.; CHENG, S.L. Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. **J. Cell Biochem.**, v. 67, n. 3, p. 386-96, 1997.
42. RAISZ, L.G.; RODAN, G.A. Embriology and cellular biology of bone. In: AVIOLI, L.; KRANE, S.M. Metabolic bone diseases and clinically related disorders. San Diego: **Academic Press.**, p. 1-22, 1998.
43. KATCHBURIAN, E.; CERRI, P.S. Formação e destruição óssea. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. Cirurgia para implantes. São Paulo: **Artes Médica**, p. 437-45, 2002.
44. RUGGIERI, I.N.R.; CÍCERO, A.M.; ISSA, J.P.M.; FELDMAN, S. Bone fracture healing: perspectives according to molecular basis. **J. Bone Miner Metab.**, v. 39, n. 3, p. 311-331, 2021.
45. CUI, J.; SHIBATA, Y.; ZHU, T.; ZHOU, J.; ZHANG, J. Osteocytes in bone aging: Advances, challenges, and future perspectives. **Ageing Res Rev.**, v. 77, p. 101608, 2022.
46. ZHANG, C.; XU, S.; ZHANG, S.; LIU, M.; DU, H.; SUN, R.; JING, B.; SUN, Y. Ageing characteristics of bone indicated by transcriptomic and exosomal proteomic analysis of cortical bone cells. **J. Orthop Surg Res.**, v. 14, n. 1, p. 129, 2019.
47. DELGADO-CALLE, J.; BELLIDO, T. The osteocyte as a signaling cell. **Physiol Rev.**, v. 102, n. 1, p. 379-410.
48. TRESGUERRES, F.G.F.; TORRES, J.; LÓPEZ-QUILES, J.; HERNÁNDEZ, G.; VEJA, J.A.; TRESGUERRES, I.F. The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. **Ann Anat.**, v. 227, p. 151422, 2020. doi: 10.1016/j.aanat.2019.151422. Epub 2019 Sep 26.
49. BELLIDO, T. Osteocyte-driven bone remodeling. **Calcif Tissue Int.**, v. 94, n. 1, p. 25-34.
50. KYLMAOJA, E.; NAKAMURA, M.; TUUKKANEN, J. Osteoclasts and Remodeling Based Bone Formation. **Curr Stem Cell Res Ther.**, v. 11, n. 8, p. 626-633, 2016.
51. KIM, J.M.; LIN, C.; STAVRE, Z.; GREENBLATT, M.B.; SHIM, J.H. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. **Cells.** v. 9, n. 9, p. 2073, 2020.
52. ANDERSEN, T.L.; DEL CARMEN OVEJERO, M.; KIRKEGAARD, T.; LENHARD, T.;

- FOGED, N.T.; DELAISSÉ, J.M. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. **Bone**, v. 35, n. 5, p. 1107-19, 2004.
53. SIDDIQUI, J.A.; PARTRIDGE, N.C. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. **Physiology (Bethesda)**. 2016 May;31(3):233-45.
54. MARTIN, T.; GOOI, J.H.; SIMS, NA. Molecular mechanisms in coupling of bone formation to resorption. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.**, n. 19, n. 1, p. 73-88, 2009.
55. FENG, X.; MCDONALD, J.M. Disorders of bone remodeling. **Annu Rev Pathol.**, v. 6, p. 121-45, 2011.
56. MUNDY, GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. **J Periodontal Res.**, v. 26, n. 3 Pt 2, p. 213-7, 1991.
57. ZHAO, T.; CHU, Z.; MA, J.; OUYANG, L. Immunomodulation Effect of Biomaterials on Bone Formation. **J. Funct Biomater.**, v. 13, n. 3, p. 103, 2022.
58. NAUTH, A.; SCHEMITSCH, E.; NORRIS, B.; NOLLIN, Z.; WATSON, J.T. Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? **J Orthop Trauma.**, v. 32, Suppl 1, p. S7-S11, 2018.
59. KEATING, J.F.; SIMPSON, A.H.; ROBINSON, C.M. The management of fractures with bone loss. **J. Bone Joint Surg Br.**, v. 87, n. 2, p. 142-50, 2005.
60. YU, F.; LIU, L.; XIA, L.; FANG, B. Establishment of a C57BL/6 Mandibular Critical-Size Bone Defect Model. **J. Craniofac Surg.**, v. 32, n. 7, p. 2562-2565, 2021 Oct 1;
61. DIMITRIOU, R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D.; GIANNOUDIS, P.V. Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC Med.**, v. 9, n. 66, p. 66, 2011.
62. VAN DER STOK, J.; VAN LIESHOUT, E.M.; EL-MASSOUDI, Y.; VAN KRALINGEN, G.H.; PATKA, P. Bone substitutes in the Netherlands - a systematic literature review. **Acta Biomater.**, v. 7, n. 2, p. 739-50, 2011.
63. GIANNOUDIS, P.V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury.**, v. 36, Suppl 3, p. S20-7, 2005.
64. URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science.**, v. 150, n. 3698, p. 893-9.
65. BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clin Orthop Relat Res.**, n. 174, p. 28-42, 1983.
66. LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin Orthop Relat Res.**, n. 395, p. 81-98, 2002.
67. MOUTHUY, P.A.; SNELLING, S.J.B.; DAKIN, S.G.; MILKOVIĆ, L.; GAŠPAROVIĆ, A.Č.; CARR, A.J.; ŽARKOVIĆ, N. Biocompatibility of implantable materials: An oxidative stress viewpoint. **Biomaterials.**, v. 109, p. 55-68, 2016.
68. BUSER, Z.; BRODKE, D.S.; YOUSSEF, J.A.; MEISEL, H.J.; MYHRE, S.L.;

- HASHIMOTO, R.; PARK, J.B.; TIM YOON, S.; WANG, J.C. Synthetic bone graft versus autograft or allograft for spinal fusion: a systematic review. **J. Neurosurg Spine.**, v. 25, n. 4, p. 509-516, 2016.
69. AZI, M.L.; APRATO, A.; SANTI, I.; KFURI, M. JR.; MASSE, A.; JOERIS, A. Autologous bone graft in the treatment of post-traumatic bone defects: a systematic review and meta-analysis. **BMC Musculoskelet Disord.**, v. 17, n. 1, p. 465, 2016.
70. YOUNGER, E.M.; CHAPMAN, M.W. Morbidity at bone graft donor sites. **J. Orthop Trauma.**, v. 3, n. 3, p. 192-5, 1989.
71. GOULET, J.A.; SENUNAS, L.E.; DESILVA, G.L.; GREENFIELD, M.L. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. **Clin Orthop Relat Res.**, n. 339, p. 76-81, 1997.
72. CALORI, G.M.; MAZZA, E.; COLOMBO, M.; RIPAMONTI, C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? **Injury.**, v. 42, Suppl 2, p. S56-63, 2011
73. SHIBUYA, N.; JUPITER, D.C. Bone graft substitute: allograft and xenograft. **Clin Podiatr Med Surg.**, v. 32, n. 1, p. 21-34, 2015.
74. ORNSTEIN, E. Hip revisions with impacted morselized allograft bone and cement. Patient outcome, prosthetic fixation and risks. **Acta Orthop Scand Suppl.**, v. 73, n. 306, p. 1-66, 2002.
75. BALDWIN, P.; LI, D.J.; AUSTON, D.A.; MIR, H.S.; YOON, R.S.; KOVAL, K.J. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. **J. Orthop Trauma.**, v. 33, n. 4, p. 203-213, 2019.
76. HOU, X.; ZHANG, L.; ZHOU, Z.; LUO, X.; WANG, T.; ZHAO, X.; LU, B.; CHEN, F.; ZHENG, L. Calcium Phosphate-Based Biomaterials for Bone Repair. **J. Funct Biomater.** v. 13, n. 4, p. 187, 2022.
77. AXELROD, J.; WEISSBACH, H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. **Science**, v. 131, n. 3409, p. 1312, 1960.
78. WANG, X.; LIANG, T.; ZHU, Y.; QIU, J.; QIU, X.; LIAN, C. *et al.* Melatonin prevents bone destruction in mice with retinoic acid-induced osteoporosis. **Mol Med.**, v. 25, n. 1, p. 43, 2019.
79. MENG, X.; LI, Y.; LI, S.; ZHOU, Y.; GAN, R.Y.; XU, D.P.; LI, H.B. Dietary sources and bioactivities of melatonin. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 367, 2017.
80. ARENDT, J.; AULINAS, A. Physiology of the Pineal Gland and Melatonin. In: FEINGOLD, K.R.; ANAWALT, B.; BOYCE, A.; CHROUSOS, G.; DE HERDER, W.W.; DHATARIYA, K. *et al.* In: **Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. 2022.**
81. JARZYNKA, M.J.; PASSEY, D.K.; JOHNSON, D.A.; KONDURU, N.V.; FITZ, N.F.; RADIO, N.M. *et al.* Microtubules modulate melatonin receptors involved in phase-shifting circadian activity rhythms: in vitro and in vivo evidence. **J Pineal Res.**, v. 46, n. 2, p. 161-71.

82. TORDJMAN, S.; CHOKRON, S.; DELORME, R.; CHARRIER, A.; BELLISSANT, E.; JAAFARI, N.; FOUGEROU, C. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. **Curr Neuropharmacol.**, v. 15, n. 3, p. 434-443, 2017.
83. WITT-ENDERBY, P.A.; RADIO, N.M.; DOCTOR, J.S.; DAVIS, V.L. Therapeutic treatments potentially mediated by melatonin receptors: potential clinical uses in the prevention of osteoporosis, cancer and as an adjuvant therapy. **J. Pineal Res.**, v. 41, n. 4, p. 297-305, 2006.
84. TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. **J. Pineal Res.**, v. 39, n. 2, p. 99-104, 2005.
85. NAJI, L.; CARRILLO-VICO, A.; GUERRERO, J.M.; CALVO, J.R. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. **Life Sci.**, v. 74, n. 18, p. 2227-36, 2004.
86. MARIA, S.; WITT-ENDERBY, P.A. Melatonin effects on bone: potential use for the prevention and treatment for osteopenia, osteoporosis, and periodontal disease and for use in bone-grafting procedures. **J. Pineal Res.**, v. 56, n. 2, p. 115-25, 2014.
87. MUNMUN, F.; WITT-ENDERBY, P.A. Melatonin effects on bone: Implications for use as a therapy for managing bone loss. **J. Pineal Res.**, v. 71, n. 1, p. e12749, 2021.
88. IKEGAME, M.; HATTORI, A.; ABATA, M.J.; KITAMURA, K.I.; TABUCHI, Y.; FURUSAWA, Y.; MARUYAMA, Y.; YAMAMOTO, T.; SEKIGUCHI, T. *et al.* Melatonin is a potential drug for the prevention of bone loss during space flight. **J. Pineal Res.**, v. 67, n. 3, p. e12594, 2019.
89. ZHOU, L.; CHEN, X.; YAN, J.; LI, M.; LIU, T.; ZHU, C.; PAN, G.; GUO, Q.; YANG, H.; PEI, M.; HE, F. Melatonin at pharmacological concentrations suppresses osteoclastogenesis via the attenuation of intracellular ROS. **Osteoporos Int.**, v. 28, n. 12, p. 3325-3337, 2017.
90. OSTROWSKA, Z.; KOS-KUDLA, B.; MAREK, B.; SWIETOCHOWSKA, E.; GÓRSKI, J. Assessment of the relationship between circadian variations of salivary melatonin levels and type I collagen metabolism in postmenopausal obese women. **Neuro Endocrinol Lett.**, v. 22, n. 2, p. 121-7, 2001.
91. SALAZAR, V.S.; GAMER, L.W.; ROSEN, V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 12, n. 4, p. 203-21, 2016.
92. CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G.R. Bone morphogenetic proteins. **Growth Factors**, v. 22, n. 4, p. 233-41, 2004.
93. EINHORN, T.A. Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. **J. Bone Joint Surg Am.**, v. 85-A, Suppl 3, p. 82-8, 2003.
94. OKAMOTO, M.; MURAI, J.; YOSHIKAWA, H.; TSUMAKI, N. Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. **J Bone Miner Res.**, v. 21, n. 7, p. 1022-33, 2006.

95. DE QUEIROZ, F.J.; DE LIMA, V.N.; BONARDI, J.P.; FILHO, O.M, QUEIROZ SBF. Bone regeneration with recombinant human bone morphogenetic protein 2: a systematic review. **J. Maxillofac Oral Surg.**, v. 17, n. 1, p. 13-18.
96. JOHNSON, T.B.; SIDERITS, B.; NYE, S.; JEONG, Y.H.; HAN, S.H.; RHYU, I.C. *et al.* Effect of guided bone regeneration on bone quality surrounding dental implants. **J. Biomech**, v. 80, p. 166-170, 2018.
97. BIBBO, C.; NELSON, J.; EHRlich, D.; ROUGEUX, B. Bone morphogenetic proteins: indications and uses. **Clin Podiatr Med Surg.**, v. 32, n. 1, p. 35-43, 2015.
98. JONES, AL. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in fracture care. **J. Orthop Trauma.**, v. 19, Suppl 10, p. S23-5, 2005.
99. KING, W.J.; KREBSBACH, P.H. Growth factor delivery: how surface interactions modulate release in vitro and in vivo. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 64, n. 12, p. 1239-56, 2012.
100. HALLORAN, D.; DURBANO, H.W.; NOHE, A. Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis. **J. Dev Biol.**, v. 8, n. 3, p. 19, 2020.
101. YANG, Z.; WU, C.; SHI, H.; LUO, X.; SUN, H.; WANG, Q.; ZHANG, D. Advances in Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration Techniques. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 10, p. 921576, 2022.
102. ELGALI, I.; OMAR, O.; DAHLIN, C.; THOMSEN, P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. **Eur J Oral Sci.** v. 125, n. 5, p. 315-337, 2017.
103. CHO, K.S.; CHOI, S.H.; HAN, K.H.; CHAI, J.K.; WIKESJÖ, U.M.; KIM, CK. Alveolar bone formation at dental implant dehiscence defects following guided bone regeneration and xenogeneic freeze-dried demineralized bone matrix. **Clin Oral Implants Res.**, v. 9, n. 6, p. 419-28, 1998.
104. LIU, J.; KERNS, D.G. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. **Open Dent J.**, v. 8, p. 56-65, 2014.
105. VORDEMVENNE, T.; WÄHNERT, D.; KOETTITZ, J.; MERTEN, M.; FOKIN, N.; BECKER, A *et al.* Bone Regeneration: A Novel Osteoinductive Function of Spongostan by the Interplay between Its Nano- and Microtopography. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 654, 2020.
106. CHVAPIL, M. Collagen sponge: theory and practice of medical applications. **J. Biomed Mater Res.**, v. 11, n. 5, p. 721-41.
107. HANKENSON, K.D.; ZIMMERMAN, G.; MARCUCIO, R. Biological perspectives of delayed fracture healing. **Injury**, v. 45, (Suppl. 2), p. S8–S15, 2014.
108. HOLLINGER, J.O.; KLEINSCHMIDT, J.C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. **J. Craniofac. Surg.**, v. 1, n. 1, p. 60–68, 1990.
109. GONZAGA, M.G.; DOS SANTOS KOTAKE, B.G.; DE FIGUEIREDO, F.A.T.; FELDMAN, S.; ERVOLINO, E.; DOS SANTOS, M.C.G.; ISSA, J.P.M. Effectiveness of

- rhBMP-2 association to autogenous, allogeneic, and heterologous bone grafts. **Microsc. Res. Tech.**, v. 82, n. 6, p. 689–695, 2019.
110. BURG, K.J.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2347–2359, 2000.
111. POLO-CORRALES, L.; LATORRE-ESTEVEZ, M.; RAMIREZ-VICK, J.E. Scaffold design for bone regeneration. **J. Nanosci. Nanotechnol**, v. 14, n.1, p. 15–56, 2014.
112. GRGUREVIC, L.; ERJAVEC, I.; GUPTA, M.; PECIN, M.; BORDUKALO-NIKSIC, T.; STOKOVIC, N.; VNUK, D.; FARKAS, V.; CAPAK, H.; MILOSEVIC, M. *et al.* Autologous blood coagulum containing rhBMP6 induces new bone formation to promote anterior lumbar interbody fusion (ALIF) and posterolateral lumbar fusion(PLF) of spine in sheep. **Bone**, v. 138, p. 115448, 2020. Epub 2020 May 22.
113. BASALOGLU, H.K.; TURGUT, M.; ŞIRIN, C.; UYANIKGIL, Y.; DEMIRCI, B.; CETIN, E.O. The influence of functional pinealectomy and exogenous melatonin application on healing of burr hole in adult rat calvaria: A histological and immunohistochemical study. **Folia Morphol. (Warsz)**, v. 81, n. 2, p. 271–279, 2022.
114. SHINO, H.; HASUIKE, A.; ARAI, Y.; HONDA, M.; ISOKAWA, K.; SATO, S. Melatonin enhances vertical bone augmentation in rat calvaria secluded spaces. **Med. Oral Patol Oral Cir. Bucal.**, v. 21, n. 1, p. e122-6, 2016.
115. LIU, P.I.; CHANG, A.C.; LAI, J.L.; LIN, T.H.; TSAI, C.H.; CHEN, P.C.; JIANG, Y.J.; LIN, L.W.; HUANG, W.C.; YANG, S.F. *et al.* Melatonin interrupts osteoclast functioning and suppresses tumor-secreted RANKL expression, implications for bone metastases. **Oncogene**, v. 40, n. 8, p. 1503–1515, 2021.
116. WANG, E.A.; ROSEN, V.; D'ALESSANDRO, J.S.; BAUDUY, M.; CORDES, P.; HARADA, T.; ISRAEL, D.I.; HEWICK, R.M.; KERNS, K.M.; LAPAN, P. *et al.* Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, n. 6, p. 2220–4, 1990.
117. SIMPSON, H. Bone consolidation is enhanced by rhBMP-2 in a rabbit model of distraction osteogenesis. **J. Orthop. Res.**, v. 20, n 4, p. 779–788, 2002.
118. CROTEAU, S.; RAUCH, F.; SILVESTRI, A.; HAMDY, R.C. Bone morphogenetic proteins in orthopedics: from basic science to clinical practice. **Orthopedics**, v. 22, n. 7, p. 686–697, 1999.
119. ELGALI, I.; OMAR, O.; DAHLIN, C.; THOMSEN, P. Guided bone regeneration: Materials and biological mechanisms revisited. **Eur. J. Oral. Sci.**, v. 125, n. 5, p. 315-337, 2017.
120. URBAN, I.A.; MONJE, A. Guided Bone Regeneration in Alveolar Bone Reconstruction. **Oral. Maxillofac. Surg. Clin. N. Am.**, v. 31, n. 2, p. 331–338, 2019.
121. SCHENK, R.K.; BUSER, D.; HARDWICK, W.R.; DAHLIN, C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects, a histologic study in the canine mandible. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implant.**, v. 9, p. 13–29, 1994.

122. JUNG, R.E.; GLAUSER, R.; SCHÄRER, P.; HÄMMERLE, C.H.; SAILER, H.F.; WEBER, F.E. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. **Clin. Oral. Implant. Res.**, v. 14, n. 5, p. 556–568, 2003.
123. SCHORN, L.; SPROLL, C.; OMMERBORN, M.; NAUJOKS, C.; KÜBLER, N.R.; DEPPRICH, R. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. **Head Face Med.**, v. 13, n. 11, 2017.
124. WIKESJÖ, U.M.; QAHASH, M.; THOMSON, R.C.; COOK, A.D.; ROHRER, M.D.; WOZNEY, J.M.; HARDWICK, W.R. rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration. **Clin. Oral. Implant. Res.**, v. 15, n. 2, p. 194–204, 2004.
125. CICCÌ, M.; FIORILLO, L.; CERVINO, G.; HABAL, M.B. Bone Morphogenetic Protein Application as Grafting Materials for Bone Regeneration in Craniofacial Surgery: Current Application and Future Directions. **J. Craniofac. Surg.**, v. 32, p. 787–793, 2021.
126. BODEN, S.D.; ZDEBLICK, T.A.; SANDHU, H.S.; HEIM, S.E. The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans, a preliminary report. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 25, n. 3, p. 376–381, 2000.
127. TALWAR, R.; DI SILVIO, L.; HUGHES, F.J.; KING, G.N. Effects of carrier release kinetics on bone morphogenetic protein-2-induced periodontal regeneration in vivo. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, n. 4, p. 340–347, 2001.
128. WOZNEY, J.M.; ROSEN, V.; CELESTE, A.J.; MITSOCK, L.M.; WHITTERS, M.J.; KRIZ, R.W.; HEWICK, R.M.; WANG, E.A. Novel regulators of bone formation, molecular clones and activities. **Science**, v. 242, n. 4885, p. 1528–1534, 1988.
129. TORIUMI, D.M.; KOTLER, H.S.; LUXENBERG, D.P.; HOLTROP, M.E.; WANG, E.A. Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 117, n. 10, p. 1101–1112, 1991.
130. SAMPATH, T.K.; REDDI, A.H. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, n. 12, p. 7599–7603, 1981.
131. BURKUS, J.K.; GORNET, M.F.; SCHULER, T.C.; KLEEMAN, T.J.; ZDEBLICK, T.A. Six-year outcomes of anterior lumbar interbody arthrodesis with use of interbody fusion cages and recombinant human bone morphogenetic protein-2. **JBJS**, v. 91, n. 5, p. 1181–1189, 2009.
132. CARLEVARO, M.F.; CERMELLI, S.; CANCEDDA, R. Descalzi Cancedda Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation, auto-paracrine role during endochondral bone formation. **J. Cell Sci.**, v. 113, (Pt 1), p. 59–69, 2000.
133. STREET, J.; BAO, M.; DE GUZMAN, L.; BUNTING, S.; PEALE, F.V., JR.; FERRARA, N.; STEINMETZ, H.; HOEFFEL, J.; CLELAND, J.L.; DAUGHERTY, A. *et al.* Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 15, p. 9656–9666, 2002.

134. COATES, P. Bone turnover markers. **Aust. Fam. Physician.**, v. 42, n. 5, p. 285–287, 2013.
135. CHEN, W.; CHEN, X.; CHEN, A.C.; SHI, Q.; PAN, G.; PEI, M.; YANG, H.; LIU, T.; HE, F. Melatonin restores the osteoporosis-impaired osteogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells by preserving SIRT1-mediated intracellular antioxidant properties. **Free Radic Biol. Med.**, v. 146, p. 92–106, 2020.
136. KESEMENLI, C.C.; NECMIOĞLU, S. The role of melatonin as a link between head injury and enhanced osteogenesis. **Med. Hypotheses**, v. 65, n. 3, p. 605–606, 2005.
137. BOSTANCI, N.; ILGENLI, T.; EMINGIL, G.; AFACAN, B.; HAN, B.; TÖZ, H. *et al.* Differential expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. **Periodontal Res.**, v. 42, n. 4, p. 287-93, 2007.
138. GÜNCÜ, G.N.; AKMAN, A.C.; GÜNDAY, S.; YAMALIK, N.; BERKER, E. Effect of inflammation on cytokine levels and bone remodelling markers in peri-implant sulcus fluid: a preliminary report. **Cytokine**, v. 5, n. 2, p. 313-6, 2012.
139. HEYDENRIJK, K.; MEIJER, H.J.A.; VAN DER REIJDEN, W.A.; RAGHOEBAR, G.M.; VISSINK, A.; STEGENGA, B. Microbiota Around Root-Form Endosseous Implants: A Review of the Literature. **International J. Oral Maxillofac Impl.**, v. 17, n. 6, p. 829–38, 2002.
140. ALBREKTSSON, T.; DAHLIN, C.; JEMT, T.; SENNERBY, L.; TURRI, A.; WENNERBERG, A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? **Clin Implant Dent Relat Res.**, v. 16, n. 2, p. 155-65, 2014.

Anexo

Apêndices

APÊNDICE A - Artigo Submetido ao Journal Biomolecules



Article

Histological and Immunohistochemical Analysis of the Effects of Topical Melatonin Treatment Associated with Collagen Sponge and rhBMP-2 Protein on Bone Remodeling

Leticia Ferreira Montarele¹, Dimitrius Leonardo Pitol¹, Bruno Fiorelini Pereira², Sara Feldman³ , Valéria Paula Sassoli Fazan⁴ and João Paulo Mardegan Issa^{1,*}

¹ Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FORP-USP), Ribeirão Preto 14040-904, Brazil

² Department of Biological Sciences, Universidade Federal de São Paulo—UNIFESP, Diadema 05468-901, Brazil

³ LABOATEM, Laboratório de Biologia e Engenharia de Tecidos, Faculdade de Medicina, Universidade Nacional de Rosário, Rosário S2002, Argentina

⁴ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto 14049-900, Brazil

* Correspondence: jpmissa@forp.usp.br



Citation: Montarele, L.F.; Pitol, D.L.; Pereira, B.F.; Feldman, S.; Fazan, V.P.S.; Issa, J.P.M. Histological and Immunohistochemical Analysis of the Effects of Topical Melatonin Treatment Associated with Collagen Sponge and rhBMP-2 Protein on Bone Remodeling. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1738. <https://doi.org/10.3390/biom12121738>

Academic Editor: Tae-Kang Kim

Received: 24 May 2022

Accepted: 18 August 2022

Published: 23 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Extensive bone defect healing is an important health issue not yet completely resolved. Different alternative treatments have been proposed but, in face of a critical bone defect, it is still very difficult to reach a complete regeneration, with the new-formed bone presenting all morphological and physiological characteristics of a normal, preinjury bone. Topical melatonin use has shown as a promising adjuvant for bone regeneration due to its positive effects on bone metabolism. Thus, to search for new, safe, biological techniques that promote bone repair and favor defect healing, we hypothesized that there is a synergistic effect of melatonin treatment associated with rhBMP-2 to guide bone regeneration. This study aimed to investigate bone repair effects of topical melatonin administration in different concentrations (1, 10, and 100 µg), associated or not with rhBMP-2. Surgical-induced bone defect healing was qualitatively evaluated through histopathological analysis by light microscopy. Additionally, quantitative stereology was performed in immunohistochemistry-prepared tissue to identify angiogenic, osteogenic, and osteoclastogenic factors. Quantification data were compared between groups by the ANOVA/Tukey test and differences were considered significant when $p < 0.05$. Our results showed that the presence of the scaffold in the bone defect hindered the process of bone repair because in the group treated with “blood clot + scaffold” the results of bone formation and immunolabeling were reduced in comparison with all other groups (treated with melatonin alone or in association with rhBMP-2). Statistical analysis revealed a significant difference between the control group (bone defect + blood clot), and groups treated with different concentrations of melatonin in association with rhBMP-2, indicating a positive effect of the association for bone repair. This treatment is promising once it becomes a new safe alternative technique for the clinical treatment of fractures, bone defects, and bone grafts. Our results support the hypothesis of the safe use of the association of melatonin and rhBMP-2 and have established a safe and effective dose for this experimental treatment.

Keywords: melatonin; rhBMP-2; bone remodeling; bone repair

1. Introduction

The critical bone defect is characterized by a large bone defect that cannot completely regenerate on its own due to the extent of the injury. Thus, different methods have been developed to establish safe therapeutic approaches, such as the use of synthetic or natural materials that help the bone neoformation process. Among the approaches already well-established in the literature for treating these critical/surgical bone defects are autografts,

allografts, and artificial materials that can be used alone or in association with bone grafting. However, these techniques present some disadvantages. Autografts usually cause insufficient bone tissue regeneration, resulting in donor site morbidity. Allografts can cause immunological rejection and inflammation. Fortunately, tissue engineering has been widely explored to overcome these restrictions [1].

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is a molecule widely present in nature, occurring in unicellular organisms, plants, fungi, and animals [2]. In most vertebrates, including humans, it is secreted by the pineal gland during the nighttime [3]. Melatonin has been linked to several specific and nonspecific biological processes such as aging, obesity, insulin sensitivity, sexual maturation, antidepressant actions, control of hormone secretions (growth, adrenal, and thyroid hormones), and has antioxidant, oncostatic and osteogenic properties [2–4].

Melatonin presents a circadian synchronizer function and can act in all peripheral tissues, including bone tissue [5,6] by keeping metabolism in synchrony with the light-dark cycle. This supports the idea that maximum bone growth may occur during the night when melatonin exhibits its highest plasma level. Bone tissue cells exhibit a rhythm that may be controlled by melatonin [7,8], suggesting that melatonin is an important endogenous biological factor for bone remodeling. Studies have suggested a beneficial effect of melatonin on bone metabolism, including anabolic effects and antiabsorptive effects, which result in osteogenesis. While the antiabsorptive effects are due to the action of melatonin on osteoclasts [9], the anabolic effects on bone remodeling promoted by melatonin are due to its action on osteoblasts. In vitro studies have shown that melatonin promotes proliferation [10] and differentiation [11–13] of osteoblast cells. The action of melatonin on osteoblastic cells is a determinant of whether mesenchymal stem cells are targeted for differentiation into osteogenic cells [14]. In vivo studies have shown that the topical application of melatonin can activate osteogenesis around titanium implants, thus favoring osseointegration [15]. Furthermore, melatonin-induced osteoblastic cell formation occurs through increased expression of bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-4) involved in osteoblast differentiation [13].

Various carriers, scaffolds, and growth factors such as bone morphogenetic proteins (BMPs) have been tested for bone defect repair [16]. Bone morphogenetic protein type 2, BMP-2, is found in small amounts in mesenchymal cells, collagen fibers, and noncollagenous cells of the bone matrix. BMP-2 is produced by recombinant technology and its osteoinductive role is due to its action on mesenchymal cells, transforming them into osteoprogenitor cells capable of forming bone [17–20]. However, its isolated topical use is contraindicated due to its rapid dissolution and degradation. Thus, BMP-2 use is recommended in association with biomaterial carriers such as hydroxyapatite, bioactive glass, tricalcium beta phosphate, mineralized and/or demineralized bovine bone, biodegradable polymers, and others [21]. A previous report from our group showed a significant contribution of the rhBMP-2 (5 µg) in critical bone defect repair in rat calvaries [22].

The guided bone regeneration (GBR) technique has shown promising results to enable the repair of large bone defects. Membranes and collagen sponges protect the repair sites from endothelial cells that do not support bone formation, prevent the migration of epithelial cells, and act to prevent initial bone reabsorption [23]. They can also act as a bioactive compartment [24,25]. In addition to these molecular mechanisms, GBR can support the mechanical stability of the bone defect site, favoring the bone remodeling process [26].

Because topically administered melatonin has shown satisfactory results for both dental implantation and injured bone recovery [27–29], the synergistic effects of melatonin treatment with a collagen sponge and BMP-2 on bone injury recovery were investigated.

This study aimed to evaluate the bone repair effects of different concentrations of topical melatonin administration, associated or not with rhBMP-2, in surgically induced bone defects, through the guided bone regeneration technique.

2. Materials and Methods

A total of 72 adult male Wistar albino rats (250 g) provided by the Central Animal Facility (USP RP—University of São Paulo) were used. These animals were kept in plastic cages (34 × 42 × 37 cm) with a maximum of 3 animals per cage, separated according to the experimental group. The cages were kept in an environment with a controlled temperature (22 ± 2 °C) and a light–dark cycle (12 h light and 12 h dark). The animals were fed with small rodent chow (Nuvital®) and water ad libitum throughout the experiment.

For all experimental procedures, the animals were anesthetized with an association of 80 mg/kg of ketamine hydrochloride (Cetamim—Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda, Cotia, SP, Brazil) and 6 mg/kg of xylazine hydrochloride (Zilazin—Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda, Cotia, SP, Brazil), injected in the biceps femoris of the right hind limb. When necessary, anesthesia was supplemented with half the initial applied dose.

Surgical technique: Anesthetized animals were submitted to trichotomy of the skin covering the central region of the calvaria and local disinfection with polyvinylpyrrolidone iodide (Indústria Química e Farmacêutica Rioquímica Ltd., São José do Rio Preto, SP, Brazil). A sagittal incision was made through the skin of the skull cap and periosteum. In the exposed calvaria, bone defects were made bilaterally, both equidistant from the median sagittal suture, using a 6 mm outer diameter drill (Kavo, São Paulo, Brazil), set at 3000 RPM. The calvaria was drilled, under constant and abundant irrigation with 0.9% saline solution.

Treatments and experimental groups: To investigate the isolated and synergistic osteogenic potential of melatonin on the calvaria bone lesion recovery, the animals were distributed into 9 groups, with 8 animals each. Melatonin (1, 10, and 100 µM), bone morphogenetic protein (5 µg BMP-2), and collagen sponge in the form of foam or scaffold (Lumina-Coat Criteria®, São Paulo, SP, Brazil) were applied bilaterally to each animal bone defect. The experimental groups were formed according to the treatment as shown in Table 1.

Table 1. Distribution of treatments and experimental groups.

Groups	Treatments
Group 1	blood clot
Group 2	blood clot + Scaffold
Group 3	blood clot + Scaffold + Melatonin 1 µg
Group 4	blood clot + Scaffold + Melatonin 10 µg
Group 5	blood clot + Scaffold + Melatonin 100 µg
Group 6	blood clot + Scaffold + Melatonin 1 µg + rhBMP-2
Group 7	blood clot + Scaffold + Melatonin 10 µg + rhBMP-2
Group 8	blood clot + Scaffold + Melatonin 100 µg + rhBMP-2
Group 9	blood clot + Scaffold + rhBMP-2

Postoperative care: After treatment, the edges of the incised skin were repositioned in the midline and sutured using 4.0 silk thread suture (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brazil). Then, each animal received analgesic treatment with a subcutaneous injection of dipyrone (100 mg/kg animal weight), and an intramuscular injection of the Pentabiotic Veterinary Small (Fort Dodge®, Campinas, SP, Brazil) antibiotic (0.1 mL/100 g body weight).

Euthanasia and samples processing: After two weeks of the bone defect surgery and treatment, the animals were anesthetized as previously described. After confirmation of the postural reflex and pain sensitivity loss, the animals were decapitated, and the head dissected to obtain the calvaria. Since each animal received the same treatment on both sides of the calvaria, the samples from the left side were used for histological and

immunohistochemical analysis for the investigated factors. Samples from the right side were saved for a molecular analysis that will be performed further on.

Histological processing: After decapitation of the animal under anesthesia, the calvaria was removed using appropriate sterile scissors and forceps. The soft tissues present were carefully separated from the bone tissue to obtain the bone fragment containing the defect with a safety margin. These fragments were immersed in the fixative solution (4% buffered paraformoldehyde) for 24 h. Then, the specimens were decalcified in 10% EDTA (neutral pH), changing the solutions once a week (30 to 40 days in total). The specimens were placed for histological processing in the Leica Tp 1020 automated tissue processor and then paraffin-embedded in the Leica central embedding unit. From each sample, semiserial sections of 5 μ m thickness were cut, stained by Masson's trichrome, and observed by light microscopy for bone tissue quantification.

Qualitative analysis by light microscopy: The qualitative analysis of the slices allowed the evaluation of the neoformed bone in the area where the bone defect was created, as well as the differentiation between the existing and the neoformed bone in the experimental groups. For this purpose, a light microscope (AxioImager Z2, Carl Zeiss, Germany) equipped with a digital camera was used. The digital images were analyzed with a 100 \times magnification objective to evaluate bone tissue by the Masson's trichrome staining method. The Zeiss software AxioVision was used to evaluate the images.

Quantitative analysis: The quantification of the newly formed bone in each animal was performed using stereological principles, with the software AxioVision (Carl Zeiss, Germany). Using the resources available in the microscope and the software, the entire extent of the bone defect was scanned, and two-dimensional and three-dimensional analyses were performed.

Immunohistochemical analysis: Immunolabeling of proinflammatory cytokine (interleukin 1, 6, and 10, and tnf alpha), angiogenic (CD31 and VEGFR2), osteoclastogenic (OPG), osteogenic (ostecalcin, osteopontin, and RUNX2), and TRAP factors was performed. After blocking the endogenous peroxidase with hydrogen peroxide (10 volumes) for 20 min and the specific bindings with PBS/BSA 2% for one hour each, the sections were immersed in citrate buffer (pH 6.0) solution in a steam chamber for antigen retrieval (Decloaking chamber, by Biocare Medical). After cooling and washing in PBS, the samples were incubated with the primary antibodies for 1 h, using the standard dilution of 1/200 μ L. Then, the sections were washed in PBS and incubated for 1 h with the secondary antibody. The abcam immunohistochemistry kit (ab236466 mouse- and rabbit-specific HRP/DAB IHC detection kit micropolymer) was used. The reaction was revealed with diaminobenzidine solution (0.5 mg/mL) in PBS for 1 min. The sections were washed in PBS, counterstained with Harris' hematoxylin, dehydrated, diaphanized, and covered with coverslips.

Statistical analysis: Quantitative data were submitted to the Shapiro–Wilk normality test, and later to the ANOVA/Tukey test to verify the variance between the groups. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The analyses were performed using the GraphPad Prism 5 software.

3. Results

The healing period was uneventful in all animals, and no adverse reactions were detected in any of the bone defect sites.

The presence of the scaffold in the bone defect hindered the process of bone repair, because in group 2 (blood clot + scaffold) the results of bone formation and immunolabeling were reduced in comparison with all other groups.

Qualitative and quantitative analysis:

The histological images demonstrate the aspect of bone formation in the repair region, showing a greater amount of bone tissue in groups 6 and 8, which received melatonin 1 and 100 μ g, respectively. The presence of bone and blood cells throughout the repair can be observed.

Figure 1 shows a graph with the neoformed bone tissue area and histological images of the bone recovery area of each experimental group. Bone tissue and blood cells can be seen alongside the neoformed bone tissue in the defect area. The neoformed bone tissue area was significantly larger in groups 6 and 8.

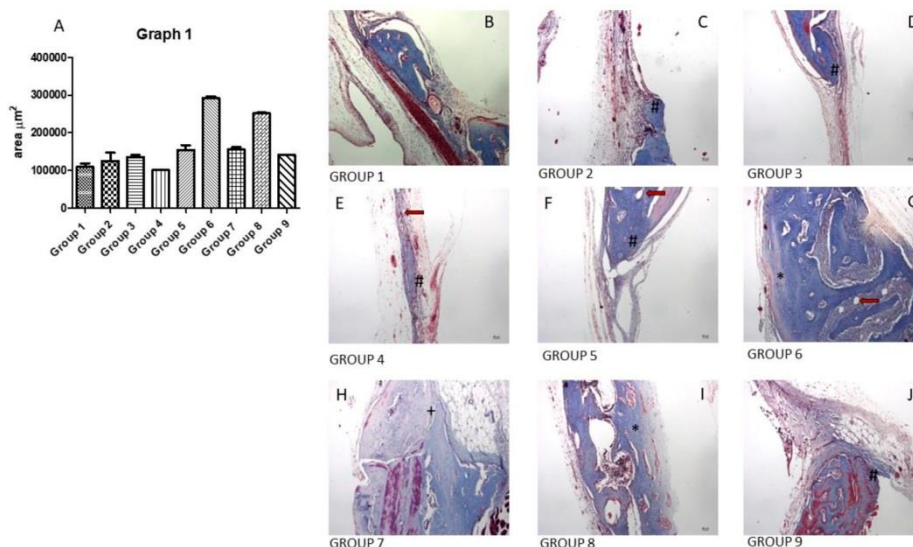


Figure 1. Quantitative and qualitative aspects of the bone defect region in the calvaria of the animals in all experimental groups. (A): Graph 1 shows the area of neoformed bone tissue in the bone defect region of the control group and the experimental groups. The graph reveals that there was a significant difference in groups 6 and 8 compared to all other groups. (B–J): Masson’s trichrome staining was performed to evidence the formation of bone tissue in the repair area. Photomicrographs were taken to show the newly formed bone tissue in the defect area of each group. The presence of osteoblastic cells and newly formed bone tissue can be observed, indicating bone repair of the recipient sites. Masson’s trichrome staining. Scale bar: 46 µm. *: greater amounts of neoformed bone tissue, indicating the best results of the therapy used. #: smaller amounts of newly formed bone tissue in the wound region. +: large amounts of newly formed bone tissue, but without significant difference. Red arrow: bone gaps.

Statistical analysis revealed a significant difference ($p < 0.05$) between the control group (group 1), and experimental groups 5, 6, 7, and 8 (groups with different concentrations of melatonin in association with rhBMP-2), indicating a positive effect of the association for bone repair. Other differences observed were: group 2 vs. groups 6 and 8; group 3 vs. groups 6 and 8; group 4 vs. groups 5, 6, 7, and 8; group 5 vs. groups 6 and 8; group 6 vs. groups 7 and 9; group 7 vs. group 8; and group 8 vs. group 9.

Immunohistochemistry Analysis:

The results obtained by immunohistochemistry confirmed the light microscopy observations that the presence of the scaffold in the bone lesion impairs the action of the substances tested for bone regeneration improvement, as, in group 2 (clot + scaffold), antibody labeling was very low.

For the representative immunohistochemistry images (Figures 2–11), A shows the control group, B the negative control, C group 2, and D a group representing the most frequent reaction among all groups. Group 2 was chosen to be shown in all images because its quantitative staining stood out for the low reaction for all investigated factors, indicating an inhibitory effect of the scaffold.

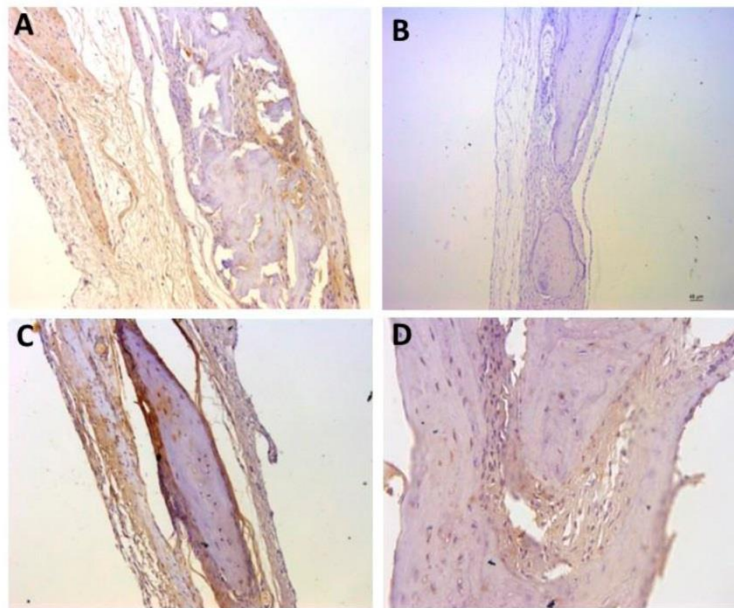


Figure 2. Representative immunohistochemistry images for VEGF staining. (A) control group; (B) negative control; (C) group 2 with marking considered (++); (D) group 5 with marking considered (++), the most observed staining pattern among the groups analyzed. Harris' hematoxylin counterstained. Scale bar: 46 μ m.

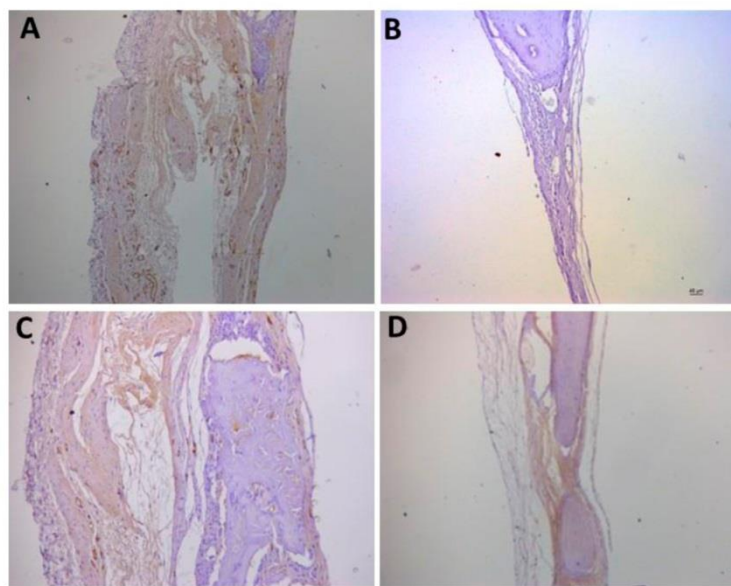


Figure 3. Representative immunohistochemistry images for CD31 staining. (A) control group; (B) negative control; (C) group 2 with marking considered (+); (D) group 6 with marking considered (+); the most observed staining pattern among the groups analyzed. Harris' hematoxylin counterstained. Scale bar: 46 μ m.

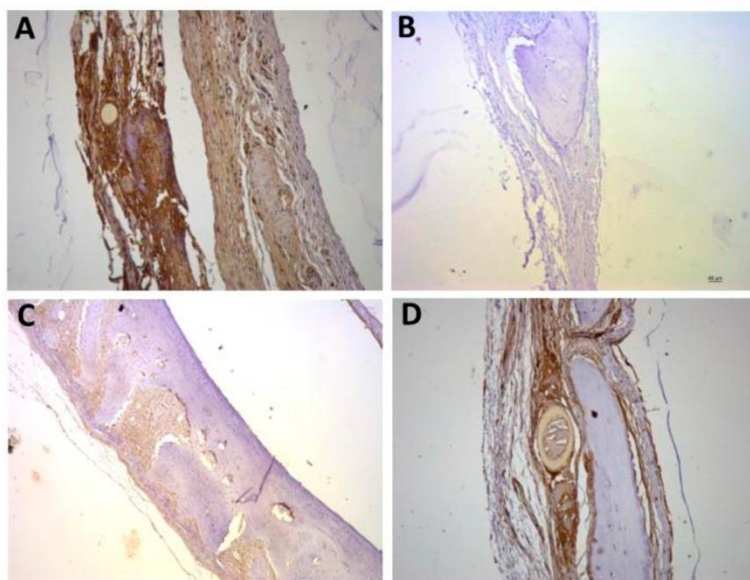


Figure 4. Representative immunohistochemistry images for OPG staining. (A) control group; (B) negative control; (C) group 2 with marking considered (+); (D) group 6 with marking considered (++++); the most observed staining pattern among the groups analyzed. Harris' hematoxylin counterstained. Scale bar: 46 μ m.

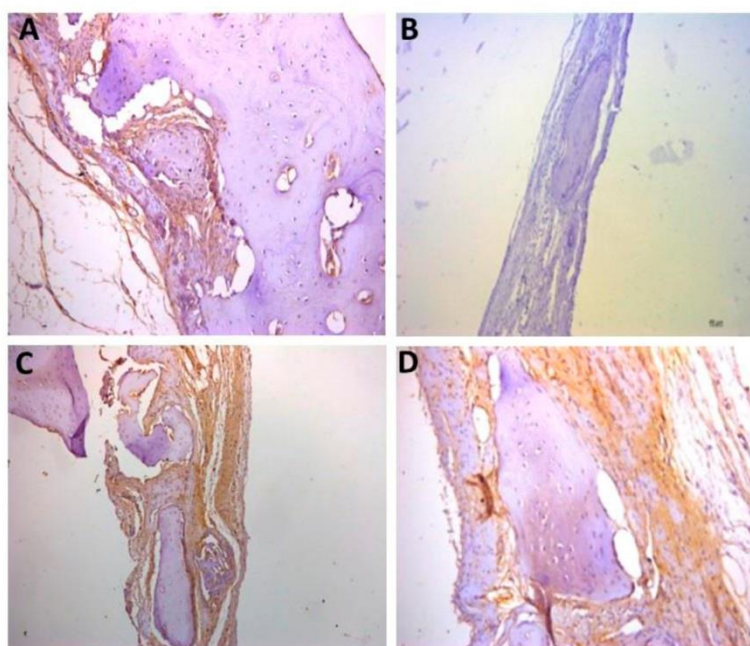


Figure 5. Representative immunohistochemistry images for IL1 β staining. (A) control group; (B) negative control; (C) group 2 with marking considered (++); (D) group 7 with marking considered (++); the most observed staining pattern among the groups analyzed. Harris' hematoxylin counterstained. Scale bar: 46 μ m.

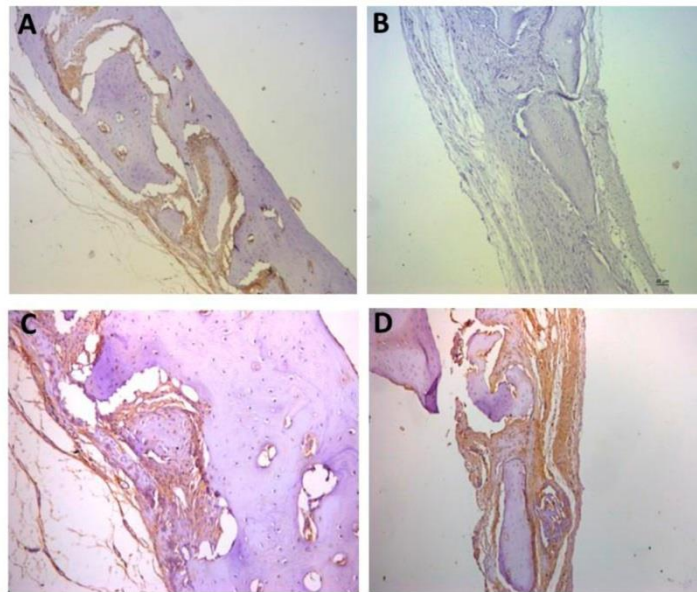


Figure 6. Representative immunohistochemistry images for IL6 staining. (A) control group; (B) negative control; (C) group 2 with marking considered (+++); (D) group 3 with marking considered (++++); the most observed staining pattern among the groups analyzed. Harris' hematoxylin counterstained. Scale bar: 46 μ m.

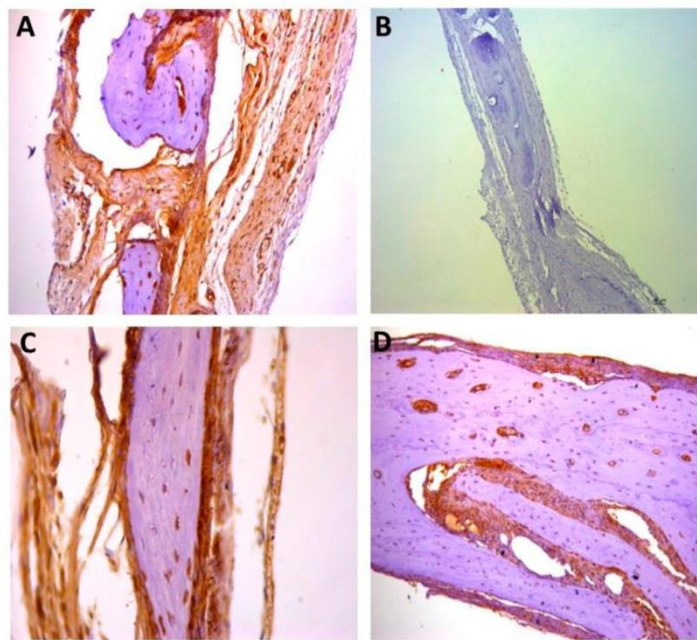


Figure 7. Representative immunohistochemistry images for IL10 staining. (A) control group; (B) negative control; (C) group 2 with marking considered (+++); (D) group 5 with marking considered (++++); the most observed staining pattern among the groups analyzed. Harris' hematoxylin counterstained. Scale bar: 46 μ m.

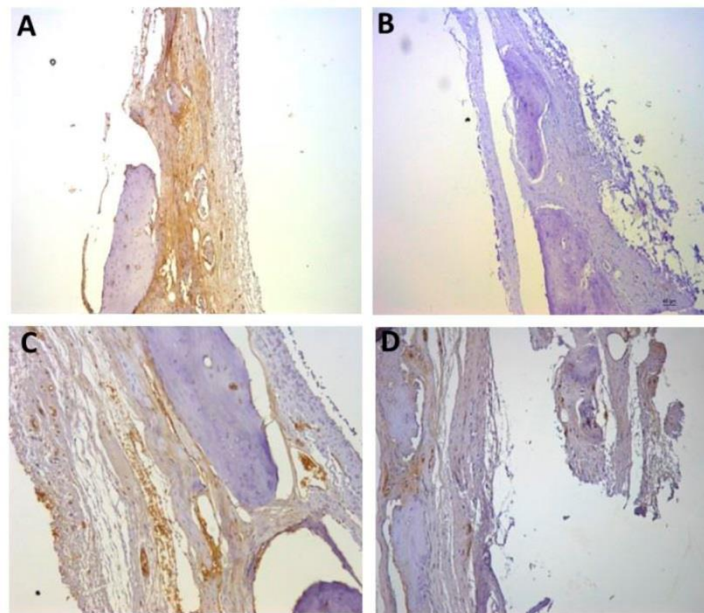


Figure 8. Representative immunohistochemistry images for osteocalcin staining. (A) control group; (B) negative control; (C) group 2 with marking considered (+); (D) group 8 with marking considered (+++); the most observed staining pattern among the groups analyzed. Harris' hematoxylin counterstained. Scale bar: 46 μ m.

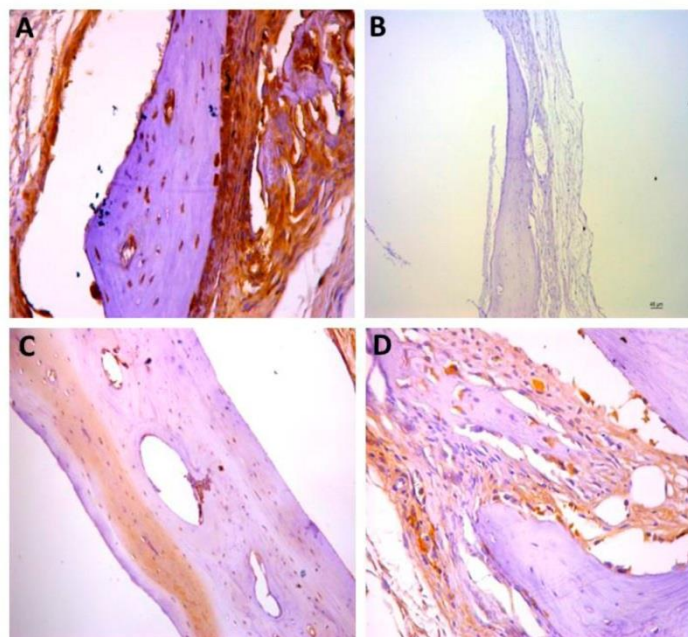


Figure 9. Representative immunohistochemistry images for osteopontin staining. (A) control group; (B) negative control; (C) group 2 with marking considered (++); (D) group 9 with marking considered (+++); the most observed staining pattern among the groups analyzed. Harris' hematoxylin counterstained. Scale bar: 46 μ m.

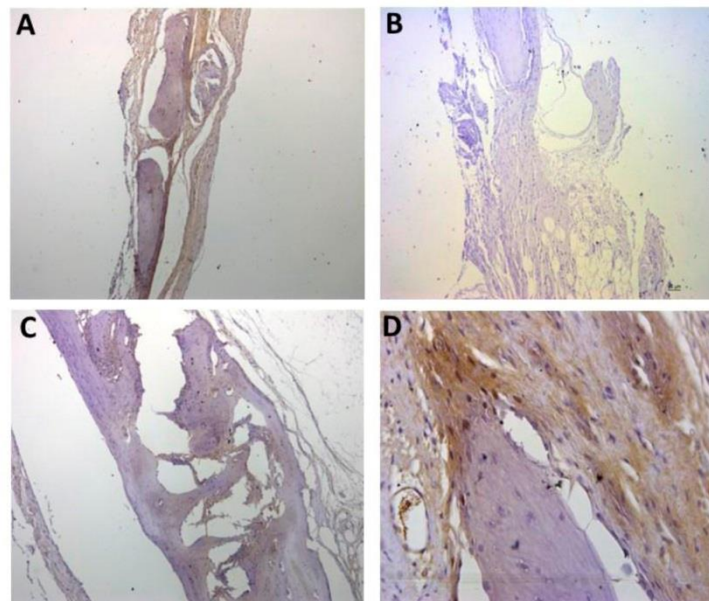


Figure 10. Representative immunohistochemistry images for RUNX2 staining. (A) control group; (B) negative control; (C) group 2 with marking considered (+); (D) group 3 with marking considered (++); the most observed staining pattern among the groups analyzed. Harris' hematoxylin counterstained. Scale bar: 46 μ m.

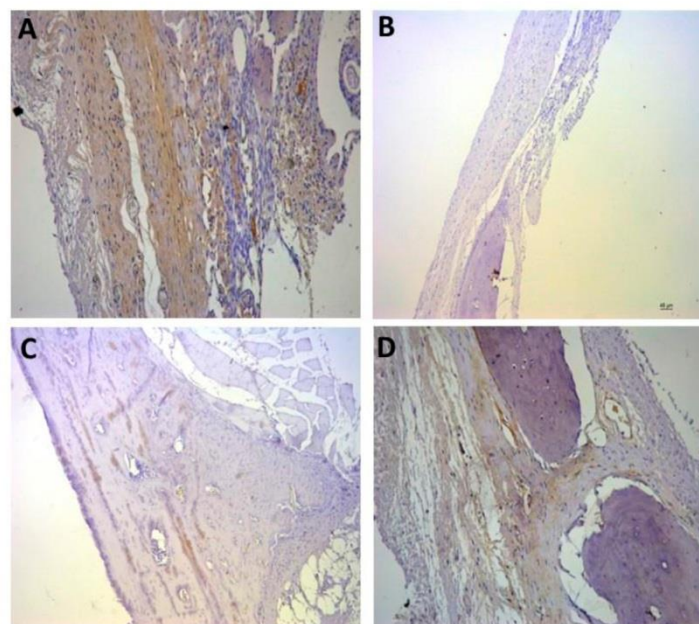


Figure 11. Representative immunohistochemistry images for TRAP staining. (A) control group; (B) negative control; (C) group 2 with marking considered (+); (D) group 4 with marking considered (++); the most observed staining pattern among the groups analyzed. Harris' hematoxylin counterstained. Scale bar: 46 μ m.

The images of the immunohistochemistry of angiogenic factors (VEGF and CD31) are shown in Figures 2 and 3, respectively. It can be observed in Table 2 and in the images that the positive reaction of these factors was generally low. Figure 2C shows the group 2 (++) staining, and D shows group 5 (++) staining, which was the most observed staining pattern among all groups. Figure 3C shows group 2 (+) staining, and D shows group 6 (+) staining, the most observed staining pattern among all groups.

Table 2. Immunohistochemistry reaction intensity for all investigated factors in all experimental groups.

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8	Group 9
OPG	++++	+	+++	+++	+++	++++	++	++++	+++
CD31	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL1 β	++	++	++	+++	++	++	++	++	++
IL6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
IL10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Osteocalcin	+++	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++
Osteoprogenitorin	++++	++	++	++	++	++++	+++	++++	++++
RUNX2	++	+	++	++	++	+++	++	+++	+++
TRAP	++	+	++	++	++	++	++	++	++
VEGF	++	++	++	++	++	++	+++	++	++

The immunolabeling for osteoprogenitorin (OPG), which is a factor for osteoclastogenesis, is shown in Figure 4. In C, the labeling in group 2 is represented as (+) and in D, the most observed staining pattern among the groups (++++) is represented by group 6.

Figures 5–7 show the positive reaction of interleukins 1 β , 6, and 10, respectively. In all of them, group 2 also showed very weak labeling. For interleukin 1 β , the marking (++) was the most predominant in all groups (Figure 5D). For interleukin 6, the marking (+++) was the most common (Figure 6D), as well as for interleukin 10, for which the marking (+++) also prevailed in all groups (Figure 7D).

Figures 8–10 show the immunostaining for osteogenic factors: osteopontin, osteocalcin, and RUNX2, respectively. In all of them the lowest labeling also occurred in group 2. Figure 9D shows significant labeling (++++) of osteopontin, which is a strong marker of bone formation, justified by the effect of rhBMP-2.

Figure 11 represents the immunostaining for TRAP. Once again, the lowest marking (+) occurred in group 2 (Figure 11C), and the most observed staining pattern among the other groups (++), is represented by group 4 (Figure 11D).

4. Discussion

The present study investigated the topical use of melatonin in different concentrations, associated or not with rhBMP-2, to improve bone repair in surgical bone defects using the GBR technique. This treatment is promising once it becomes a new, safe alternative technique for the clinical treatment of fractures, bone defects, and bone grafts. Our results proved the safe use of the proposed association and established a safe and effective dose for this experimental treatment. There are no literature reports that have evaluated bone repair using the methodologies described in the present study.

The high-power resolution histological analyses used in this study allowed a better comprehension of how the bone tissue reacted to the different treatments as well as to evaluate the biological stages of bone repair. This is because most studies use single or multiple nonserial tissue sections, reducing the sensitivity of the histological data. The use of stereology expands the range of investigated variables and provides greater accuracy in tissue reaction quantification, improving the quantitative analysis methods [30].

Rat calvaria defects are widely used for histological and imaging analysis due to the stability of the bones in terms of movements. The experimental model used in this study was designed to reproduce a critical bone defect since these are the most complex defects for

regeneration, due to the difficulty of spontaneous complete healing. Critical bone defects in the calvaria are used to evaluate different materials as viable and safe alternatives for restoring bone architecture, mainly in the craniofacial region [31,32].

To choose a material or substance that favors bone regeneration, the material's safety to the organism is fundamental. So, it is necessary to take into consideration some main properties of the chosen material, such as biocompatibility, osteogenesis, osteoinduction, and osteoconduction [33,34].

The autologous blood clot presents the capacity by itself to be a physiological agent to induce bone formation due to the presence of several cells that favor this process. Grgurevic L., et al. (2020) demonstrated that the clot can act as a native rhBMP transporter for bone formation [35].

There are reports of melatonin, GBR, and rhBMP-2 used in association to provide effective bone repair. The authors stated that melatonin exerts an osteogenic effect, while rhBMP-2 provides osteoinduction, and the collagen sponge provides osteoconduction. Currently, melatonin is known to have properties related to bone metabolism, and its use favors bone repair due to osteogenic and antiosteoclastic properties [9,36–38].

Wang et al. (1990) demonstrated that the dose of rhBMP-2 is critical for bone formation [39]. In our study, the choice of a dose of 5 µg of rhBMP-2 was based on studies from Kotake et al. (2015) and Gonzaga et al. (2019), that used 5 µg of this protein and showed a significant contribution of it for bone formation in critical defects [22,32].

rhBMP-2 is a widely studied morphogenetic protein with an important role in biological processes, mainly related to bone tissue. It presents an osteoinductive role capable of repairing and regenerating bone tissue as it acts by sending morphogenic signals for migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal cells into bone tissue. However, its use alone has the disadvantage of being of rapid dissolution in the medium in which it is applied, requiring a carrier [40,41].

The technique of guided bone regeneration (GBR) has become a well-documented and successful clinical procedure that has been developed to help the reconstruction of alveolar bone. The fundamental principle of GBR is to function as a barrier, preventing nonosteogenic tissues, such as epithelial and conjunctival cells, from invading the bone repair area. Moreover, it also creates a bioactive compartment with the ability to form a structure that ensures osteoconduction [42]. Thus, the use of GBR is already well-established in the literature for therapies aimed at bone repair [43,44].

Jung et al. (2003) concluded that the combination of a xenogenic bone mineral substitute with rhBMP-2 can enhance the maturation process of bone regeneration, demonstrating the potential of rhBMP-2 to predictably improve and accelerate guided bone regeneration therapy [45]. Schorn et al. (2017) evaluated the association of rhBMP-2 and VEGF with a collagen carrier and also had good results with vertical bone formation [46]. Wikesjö et al. (2004) also obtained good results with the use of rhBMP-2 associated with bone regeneration [47–51].

As already mentioned, osteoinductive proteins require a carrier due to their short biological half-life, and for them to be released in a gradual and prolonged manner. They also act as a delivery system and as a support for cell growth. The combination of an osteoinductive protein (rhBMP-2) with an osteoconductive material makes it possible to overcome some of the difficulties encountered with current bone regeneration techniques, justifying the choice of GBR in this study.

In addition to acting on mesenchymal cell differentiation, osteoblast regulation, chemotaxis, and mitosis during bone repair [52], the use of rhBMP-2 effectively accelerates bone regeneration.

Given all this, a great bone repair was predicted in groups 3, 4, 5, and 9, as they presented the isolated associations between melatonin and scaffold, and rhBMP-2 and scaffold. In group 9, in which the association was blood clot + scaffold + 5 µg rhBMP-2, there was no great bone formation response, as observed in groups 3, 4, and 5 (clot + scaffold + melatonin in different concentrations, 1, 10, and 100 µg, respectively). It was expected that in these groups high bone

formation could be observed due to the osteogenic effects of the isolated use of melatonin or rhBMP-2 since they are agents that enhance bone formation in the repair area. This result is in agreement with the findings obtained by Sampath et al. (1981) which revealed that BMP associated with collagen support is capable of inducing bone formation in different sites, favoring bone regeneration [53]. Likewise, Burkus et al. (2009) demonstrated that the use of rhBMP-2, applied within an absorbable collagen sponge, was able to induce bone formation [54]. From our results, we can infer that the presence of the scaffold inhibited bone regeneration at the defect site, maybe acting as a physical barrier for the melatonin and rhBMP-2 migration and action. Groups 6 (blood clot + scaffold + 1 µg of melatonin + 5 µg of rhBMP-2) and 8 (blood clot + scaffold + 100 µg of melatonin + 5 µg of rhBMP-2) presented the same substance combination, with a difference in the concentration of melatonin, and were the only ones that showed significantly increased bone formation compared to the other groups. This significant difference can be explained by the action of rhBMP-2, as it is, by itself, an inducer of bone formation [55–57].

It was observed in groups 3, 4, and 5 that melatonin had practically no action on bone regeneration, once again indicating that it was highly impaired by the scaffold in our experimental model, differing from studies that revealed bone formation with the use of melatonin alone [58,59].

The qualitative analysis revealed that experimental groups 6, 7, 8, and 9 visually presented a greater amount of reparative bone trabeculae in the area of the bone defect. However, there was still a large area to be repaired when compared to the other groups.

The histomorphometric analysis revealed the best result for group 6 (blood clot + scaffold + 1 µg of melatonin + 5 µg of rhBMP-2). The lowest dose of melatonin used showed a higher osteogenic response when compared to the other groups.

Immunohistochemistry was performed using biomarkers of angiogenic (cd31 and VEGF), osteoclastogenic (OPG), osteogenic (osteocalcin, osteopontin, and RUNX2), proinflammatory (interleukin 1, 6, and 10, and TNF alpha), and TRAP. In the results obtained by immunohistochemistry, it is possible to note the weak labeling of factors involved in bone repair (angiogenic and osteogenic factors), especially in group 2. This reinforces the hypothesis of inhibition of bone repair caused by the use of the scaffold. Despite this, once again, the best results were obtained in groups 6 and 8, reinforcing the histologic observations of a better regeneration process in groups treated with melatonin 1 and 100 µg, associated with rhBMP-2, respectively.

5. Conclusions

According to the methodologies used and the results obtained in this study, the association of melatonin (1 µg) with 5 µg rhBMP-2, through the technique of guided bone regeneration, was able to increase the bone repair of critical defects in rat calvaria, but this process was also inhibited by the presence of the scaffold, in all groups.

Author Contributions: L.F.M.: Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology Visualization, Writing—original draft, Writing—review & editing; D.L.P.: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software; B.F.P.: Data curation, Formal analysis, Methodology, Software; S.F.: Data curation, Validation; V.P.S.F.: Writing—review & editing, Visualization; J.P.M.I.: Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Resources, Supervision, Validation. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Foundation for Research of the State of São Paulo [grant number 2019/03699-1].

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of FORP-USP, process number n° 2017.1.294.58.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: FAPESP process number 2022/11444-6.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lei, H.; Gui, L.; Xiao, R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin. Biochem.* **2009**, *42*, 1452–1460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Pandi-Perumal, S.R.; Srinivasan, V.; Maestroni, G.J.; Cardinali, D.P.; Poeggeler, B.; Hardeland, R. Melatonin, Nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* **2006**, *273*, 2813–2838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Zawilska, J.B.; Skene, D.J.; Arendt, J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharm. Rep.* **2009**, *61*, 383–410. [[CrossRef](#)]
4. Lima, F.B.; Machado, U.F.; Bartol, I.; Seraphim, P.M.; Sumida, D.H.; Moraes, S.M.; Hell, N.S.; Okamoto, M.M.; Saad, M.J.; Carvalho, C.R.; et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am. J. Physiol.* **1998**, *275*, 934–941. [[CrossRef](#)]
5. Conti, A.; Conconi, S.; Hertens, E.; Skwarlo-Sonta, K.; Markowska, M.; Maestroni, J.M. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J. Pineal. Res.* **2000**, *28*, 193–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hardeland, R.; Madrid, J.A.; Tan, D.X.; Reiter, R.J. Melatonin, the circadian multioscillator system and health, the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J. Pineal. Res.* **2012**, *52*, 139–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Greenspan Sl Dresner-Pollak, R.; Parker, R.A.; London, D.; Ferguson, L. Diurnal variation of bone mineral turnover in elderly men and women. *Calcif. Tissue Int.* **1997**, *60*, 419–423. [[CrossRef](#)]
8. Ostrowska, Z.; Kos-Kudla, B.; Marek, B.; Kajdaniuk, D. Influence of lighting conditions on daily rhythm of bone metabolism in rats and possible involvement of melatonin and other hormones in this process. *Endocr. Regul.* **2003**, *37*, 163–174.
9. Koyama, H.; Nakade, O.; Takada, Y.; Kaku, T.; Lau, K.H. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J. Bone Min. Res.* **2002**, *17*, 1219–1229. [[CrossRef](#)]
10. Nakade, O.; Koyama, H.; Arijji, H.; Yajima, A.; Kaku, T. Melatonin stimulates proliferation and type I synthesis in human bone cells in vitro. *J. Pineal Res.* **1999**, *27*, 106–110. [[CrossRef](#)]
11. Roth, J.A.; Kim, B.G.; Lin, W.L.; Cho, M.I. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 22041–22047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. 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.* **2007**, *42*, 231–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Park, K.H.; Kang, J.W.; Lee, E.M.; Kim, J.S.; Rhee, Y.H.; Kim, M.; Jeong, S.J.; Park, Y.G.; Kim, S.H. Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ERK/Wnt signaling pathways. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 187–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Zhang, L.; Su, P.; Xu, C.; Chen, C.; Liang, A.; Du, K.; Peng, Y.; Huang, D. Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPAR-gamma expression and enhancing Runx2 expression. *J. Pineal. Res.* **2010**, *49*, 364–372. [[CrossRef](#)]
15. Cutando, A.; Arana, C.; Gómez-Moreno, G.; Escames, G.; López, A.; Ferrera MJ Reiter, R.J.; Acu-a-Castroviejo, D. Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. *J. Periodontol.* **2007**, *78*, 576–583. [[CrossRef](#)]
16. Mediero, A.; Wilder, T.; Perez-Aso, M.; Cronstein, B.N. Direct or indirect stimulation of adenosine A2A receptors enhances bone regeneration as well as bone morphogenetic protein-2. *FASEB J.* **2015**, *29*, 1577–1590. [[CrossRef](#)]
17. Ripamonti, U.; Reddi, A.H. Periodontal regeneration, potential role of bone morphogenetic proteins. *J. Periodontol. Res.* **1994**, *29*, 225–235. [[CrossRef](#)]
18. Issa, J.P.M.; Defino, H.L.A.; Coutinho-Netto, J.; Volpon, J.B.; Regalo, S.C.H.; Siéssere, S.; Tiozzi, R. Evaluation of rhBMP-2 and natural late as potential osteogenic proteins in critical size defects by histomorphometric methods. *Anat. Record.* **2010**, *293*, 794–801. [[CrossRef](#)]
19. Siéssere, S.; Sousa, L.G.; Issa, J.P.M.; Iyomasa, M.M.; Pitol, D.L.; Barbosa, A.P.A.; Semprini, M.; Sebald, W.; Bentley, M.V.; Regalo, S.C.H. Application of low-level laser irradiation (LLLI) and rhBMP-2 in critical bone defect of ovariectomized rats, histomorphometric evaluation. *Photomed. Laser Surg.* **2011**, *29*, 453–458. [[CrossRef](#)]
20. Issa, J.P.; Gonzaga, M.; Kotake, B.G.; de Lucia, C.; Ervolino, E.; Iyomasa, M. Bone repair of critical size defects treated with autogenic, allogenic, or xenogenic bone grafts alone or in combination with rhBMP-2. *Clin. Oral. Impl. Res.* **2016**, *27*, 558–566. [[CrossRef](#)]
21. Wikesjö, U.M.E.; Qahash, M.; Polimeni, G.; Susin, C.; Shanaman, R.H.; Rohrer, M.D.; Wozney, J.M.; Salão, J. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2, histologic observations. *J. Clin. Periodontol.* **2008**, *35*, 1001–1010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kotake, B.G.; Salzedas, L.M.; Ervolino, E.; Calzzani, R.A.; Sebald, W.; Issa, J.P.M. Bone Recuperation After rhBMP-2 Insertion in Alcoholic Animals-Experimental Study. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 3557–3564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Schindeler, A.; McDonald, M.M.; Bokko, P.; Little, D.G. Bone remodeling during fracture repair the cellular picture. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2008**, *19*, 459–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Turri, A.; Elgali, I.; Vazirisani, F.; Johansson, A.; Emanuelsson, L.; Dahlin, C.; Thomsen, P.; Omar, O. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment. *Biomaterials* **2016**, *84*, 167–183. [[CrossRef](#)]
25. Gruber, R.; Stadlinger, B.; Terheyden, H. Cell-to-cell communication in guided bone regeneration, molecular and cellular mechanisms. *Clin. Oral Implant. Res.* **2017**, *28*, 1139–1146. [[CrossRef](#)]
26. Haas, R.; Haidvogel, D.; Donath, K.; Watzek, G. Freeze-dried homogeneous and heterogeneous bone for sinus augmentation in sheep. Part I, histological findings. *Clin. Oral Implant. Res.* **2012**, *13*, 396–404. [[CrossRef](#)]
27. Gómez-Moreno, G.; Aguilar-Salvatierra, A.; Boquete-Castro, A.; Guardia, J.; Piattelli, A.; Perrotti, V. Outcomes of topical applications of melatonin in implant dentistry. *Implant. Dent.* **2015**, *24*, 25–30. [[CrossRef](#)]
28. Ramírez-Fernández, M.P.; Calvo-Guirado, J.L.; De-Val, J.E.M.S.; Delgado-Ruiz, R.A.; Negri, B.; Pardo-Zamora, G. Melatonin promotes angiogenesis during repair of bone defects, A radiological and histomorphometric study in rabbit tibiae. *Clin. Oral Investig.* **2013**, *17*, 147–158. [[CrossRef](#)]
29. Cutando, A.; Gómez-Moreno, G.; Arana, C.; Muñoz, L.; Lopez-Pena, M.; Stephenson, J. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. *J. Pineal. Res.* **2008**, *45*, 174–179. [[CrossRef](#)]
30. Hankenson, K.D.; Zimmerman, G.; Marcucio, R. Biological perspectives of delayed fracture healing. *Injury* **2014**, *45* (Suppl. 2), S8–S15. [[CrossRef](#)]
31. Hollinger, J.O.; Kleinschmidt, J.C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J. Craniofac. Surg.* **1990**, *1*, 60–68.
32. Gonzaga, M.G.; Dos Santos Kotake, B.G.; de Figueiredo, F.A.T.; Feldman, S.; Ervolino, E.; Dos Santos, M.C.G.; Issa, J.P.M. Effectiveness of rhBMP-2 association to autogenous, allogeneic, and heterologous bone grafts. *Microsc. Res. Tech.* **2019**, *82*, 689–695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Burg, K.J.; Porter, S.; Kellam, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2347–2359. [[CrossRef](#)]
34. Polo-Corrales, L.; Latorre-Esteves, M.; Ramirez-Vick, J.E. Scaffold design for bone regeneration. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14*, 15–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Grgurevic, L.; Erjavec, I.; Gupta, M.; Pecin, M.; Bordukalo-Niksic, T.; Stokovic, N.; Vnuk, D.; Farkas, V.; Capak, H.; Milosevic, M.; et al. Autologous blood coagulum containing rhBMP6 induces new bone formation to promote anterior lumbar interbody fusion (ALIF) and posterolateral lumbar fusion (PLF) of spine in sheep. *Bone* **2020**, *138*, 115448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Basaloglu, H.K.; Turgut, M.; Şirin, C.; Uyanikgil, Y.; Demirci, B.; Cetin, E.O. The influence of functional pinealectomy and exogenous melatonin application on healing of burr hole in adult rat calvaria: A histological and immunohistochemical study. *Folia Morphol.* **2022**, *81*, 271–279. [[CrossRef](#)]
37. Shino, H.; Hasuike, A.; Arai, Y.; Honda, M.; Isokawa, K.; Sato, S. Melatonin enhances vertical bone augmentation in rat calvaria secluded spaces. *Med. Oral Patol Oral Cir. Bucal.* **2016**, *21*, e122–e126. [[CrossRef](#)]
38. Liu, P.I.; Chang, A.C.; Lai, J.L.; Lin, T.H.; Tsai, C.H.; Chen, P.C.; Jiang, Y.J.; Lin, L.W.; Huang, W.C.; Yang, S.F.; et al. Melatonin interrupts osteoclast functioning and suppresses tumor-secreted RANKL expression, implications for bone metastases. *Oncogene* **2021**, *40*, 1503–1515. [[CrossRef](#)]
39. Wang, E.A.; Rosen, V.; D’Alessandro, J.S.; Bauduy, M.; Cordes, P.; Harada, T.; Israel, D.I.; Hewick, R.M.; Kerns, K.M.; LaPan, P.; et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 2220–2224. [[CrossRef](#)]
40. Simpson, H. Bone consolidation is enhanced by rhBMP-2 in a rabbit model of distraction osteogenesis. *J. Orthop. Res.* **2002**, *20*, 779–788.
41. Croteau, S.; Rauch, F.; Silvestri, A.; Hamdy, R.C. Bone morphogenetic proteins in orthopedics: From basic science to clinical practice. *Orthopedics* **1999**, *22*, 686–697. [[PubMed](#)]
42. Elgali, I.; Omar, O.; Dahlin, C.; Thomsen, P. Guided bone regeneration: Materials and biological mechanisms revisited. *Eur. J. Oral. Sci.* **2017**, *125*, 315–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Urban, I.A.; Monje, A. Guided Bone Regeneration in Alveolar Bone Reconstruction. *Oral. Maxillofac. Surg. Clin. N. Am.* **2019**, *31*, 331–338. [[CrossRef](#)]
44. Schenk, R.K.; Buser, D.; Hardwick, W.R.; Dahlin, C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects, a histologic study in the canine mandible. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implant.* **1994**, *9*, 13–29.
45. Jung, R.E.; Glauser, R.; Schärer, P.; Hämmerle, C.H.; Sailer, H.F.; Weber, F.E. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. *Clin. Oral. Implant. Res.* **2003**, *14*, 556–568. [[CrossRef](#)]
46. Schorn, L.; Sproll, C.; Ommerborn, M.; Naujoks, C.; Kübler, N.R.; Depprich, R. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. *Head Face Med.* **2017**, *13*, 11. [[CrossRef](#)]
47. Wikesjö, U.M.; Qahash, M.; Thomson, R.C.; Cook, A.D.; Rohrer, M.D.; Wozney, J.M.; Hardwick, W.R. rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration. *Clin. Oral. Implant. Res.* **2004**, *15*, 194–204. [[CrossRef](#)]
48. Ciccù, M.; Fiorillo, L.; Cervino, G.; Habal, M.B. Bone Morphogenetic Protein Application as Grafting Materials for Bone Regeneration in Craniofacial Surgery: Current Application and Future Directions. *J. Craniofac. Surg.* **2021**, *32*, 787–793. [[CrossRef](#)]
49. Boden, S.D.; Zdeblick, T.A.; Sandhu, H.S.; Heim, S.E. The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans, a preliminary report. *Spine* **2000**, *25*, 376–381. [[CrossRef](#)]

50. Talwar, R.; Di Silvio, L.; Hughes, F.J.; King, G.N. Effects of carrier release kinetics on bone morphogenetic protein-2-induced periodontal regeneration in vivo. *J. Clin. Periodontol.* **2001**, *28*, 340–347. [[CrossRef](#)]
51. Wozney, J.M.; Rosen, V.; Celeste, A.J.; Mitsuoka, L.M.; Whitters, M.J.; Kriz, R.W.; Hewick, R.M.; Wang, E.A. Novel regulators of bone formation, molecular clones and activities. *Science* **1988**, *242*, 1528–1534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Toriumi, D.M.; Kotler, H.S.; Luxenberg, D.P.; Holtrop, M.E.; Wang, E.A. Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **1991**, *117*, 1101–1112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Sampath, T.K.; Reddi, A.H. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 7599–7603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Burkus, J.K.; Gornet, M.F.; Schuler, T.C.; Kleeman, T.J.; Zdeblick, T.A. Six-year outcomes of anterior lumbar interbody arthrodesis with use of interbody fusion cages and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *JBJS* **2009**, *91*, 1181–1189. [[CrossRef](#)]
55. Carlevaro, M.F.; Cermelli, S.; Cancedda, R. Descalzi Cancedda Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation, auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 59–69. [[CrossRef](#)]
56. Street, J.; Bao, M.; de Guzman, L.; Bunting, S.; Peale, F.V., Jr.; Ferrara, N.; Steinmetz, H.; Hoeffel, J.; Cleland, J.L.; Daugherty, A.; et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 9656–9661. [[CrossRef](#)]
57. Coates, P. Bone turnover markers. *Aust. Fam. Physician* **2013**, *42*, 285–287.
58. Chen, W.; Chen, X.; Chen, A.C.; Shi, Q.; Pan, G.; Pei, M.; Yang, H.; Liu, T.; He, F. Melatonin restores the osteoporosis-impaired osteogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells by preserving SIRT1-mediated intracellular antioxidant properties. *Free Radic Biol. Med.* **2020**, *146*, 92–106. [[CrossRef](#)]
59. Kesemenli, C.C.; Necmioğlu, S. The role of melatonin as a link between head injury and enhanced osteogenesis. *Med. Hypotheses* **2005**, *65*, 605–606. [[CrossRef](#)]

APÊNDICE B - Artigo Submetido ao Journal of morphological Sciences

Journal of Morphological Sciences
J Morphol Sci
Brazilian Society of Anatomy

Review Article
J Morphol Sci 2022;39:420-430

Different Clinical Uses and Advantages of Melatonin

Letícia Ferreira Montarele¹, Dimitrius Leonardo Pitol¹, Bruno Fiorelini Pereira², Marina Paulini¹, Sara Feldman³, João Paulo Mardegan Issa¹

¹Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FORP USP) - Ribeirão Preto, SP, Brazil

²Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Diadema, SP, Brazil

³LABOATEM - Laboratório de Biologia e Engenharia de Tecidos, Faculdade de Medicina, Universidade Nacional de Rosário - Rosário, Argentina

Disclose and conflicts of interest: none to be declared by all authors

ABSTRACT

Introduction: Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), an endogenous hormone produced by the pineal gland and released exclusively at night, is known to influence many biological processes in the body, including circadian rhythms, the immune system, and neuroendocrine and cardiovascular functions, due to its great therapeutic potential and safety for application. This molecule is being widely studied in order to establish safe and effective therapeutic protocols for the treatment of several disorders, such as sleep disorders, cardiovascular diseases, metabolic bone diseases, covid-19, schizophrenia, neurofetal protection, among others. In view of this, the present article aims to demonstrate the numerous possible applications and their respective benefits of melatonin use.

Keywords: Melatonin; Clinical uses; Advantages; Review.

Introduction

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is a molecule widely present in nature, present in unicellular organisms, plants, fungi and animals¹. It was discovered in 1958 by Aaron Lerner, in which it is produced and secreted by pinealocytes, present in the pineal gland, from the amino acid tryptophan. Its higher plasmatic levels are found during the night period, with serum concentrations varying between 80 and 120 pg / ml, since the secretion is increased by darkness and suppressed by light, during the day the serum concentrations vary between 10-20 pg / ml². Its secretion is made by the pineal gland during the nocturnal phase of the day³. Its metabolism occurs directly at the site of production or in the liver, and

its effects occur through different pathways. It is important to point out that due to its rapid metabolism, some properties result from the action of its metabolites; the local concentration of melatonin and its metabolites define phenotypic regulations, acting in a receptor-dependent or receptor-independent manner⁴. Melatonin has long been recognized for its regulation of circadian and circannual functions, acting at different levels, regulating various biological functions (figure 1), with multiple sources and targets, being able to exert antioxidant, immunomodulatory, pro-apoptotic, antiproliferative, antiangiogenic effects, besides presenting other functions related to aging, obesity, insulin sensitivity, sexual maturation, antidepressant actions, antinociceptive, locomotor

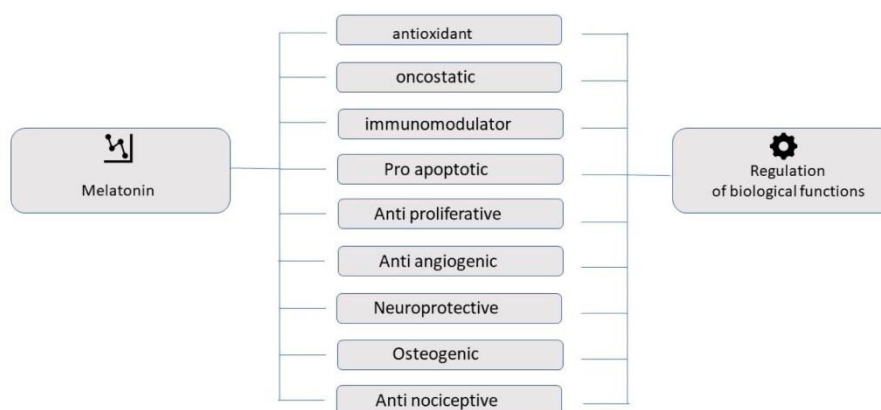


Figure 1. Schematic diagram demonstrating the biological functions related to melatonin. Source: personal collection.

activity regulators, neuroprotectors, pain modulators, blood pressure reducers, control of hormone secretions (growth, adrenal and thyroid hormones) and as an antioxidant, onco- static and osteogenic agent^{5,6}.

Melatonin, can act by different molecular pathways, whose most characterized is by the activation of specific membrane receptors, being them high-affinity ML1 sites and low-affinity ML2 sites⁷.

Melatonin levels decrease with age, so older adults are more likely to suffer from inadequate melatonin levels. Melatonin was first isolated in 1960 from 200,000 bovine pineal glands in a study that achieved a recovery of a few hundred micrograms, since then several studies, have been conducted about the use and benefits of melatonin. It is now known that exogenous melatonin supplementation is well tolerated and has no adverse effects in the short or long term⁸.

In view of this, melatonin is widely studied in the literature, and its various applications have been documented, in search of establishing new therapies, in the health area. In the specific literature, one can find several studies that relate the use of melatonin for the treatment of bone lesions, cancer, COVID-19, autism, schizophrenia, sleep disorders, cardiovascular diseases and osteoporosis, due to its main actions, as shown in the figure below (figure 2).

This article, however, aims to address the different applications of exogenous melatonin and describe its positive effects for the treatment of different disorders and pathologies.

Melatonin and bone tissue:

Melatonin has the function of synchronizing the circadian cycle of all peripheral tissues, including bone tissue⁹ by keeping metabolism in synchrony with the light-dark cycle. This will allow maximum bone growth to occur during the nocturnal phase of the day, when melatonin exhibits its highest plasma level. Reported that melatonin has shown great therapeutic potential in the bone microenvironment, with effects including regulation of bone metabolism, acceleration of osteoblastogenesis, inhibition of osteoclastogenesis and induction of apoptosis in mature osteoclasts, as well as suppression of osteolytic bone metastasis¹⁰. Several studies have suggested a beneficial effect of melatonin on bone metabolism, including anabolic effects and anti-absorptive effects, which result in osteogenesis. While the anti-absorptive effects are due to melatonin action on osteoclasts¹¹, promoting apoptosis in mature osteoclasts, consequently reducing their lifespan and suppressing bone resorption, the anabolic effects on bone remodeling promoted by melatonin are due to its action on osteoblasts¹².

In vitro studies have shown that melatonin promotes proliferation¹³ and differentiation¹⁴ of osteoblastic cells. The action of melatonin on osteoblastic cells is a determinant of whether mesenchymal stem cells are targeted for differentiation into osteogenic lineages¹⁵. In vivo studies have shown that topical application of melatonin is able to activate osteogenesis around titanium implants, thus allowing osseointegration¹⁶.

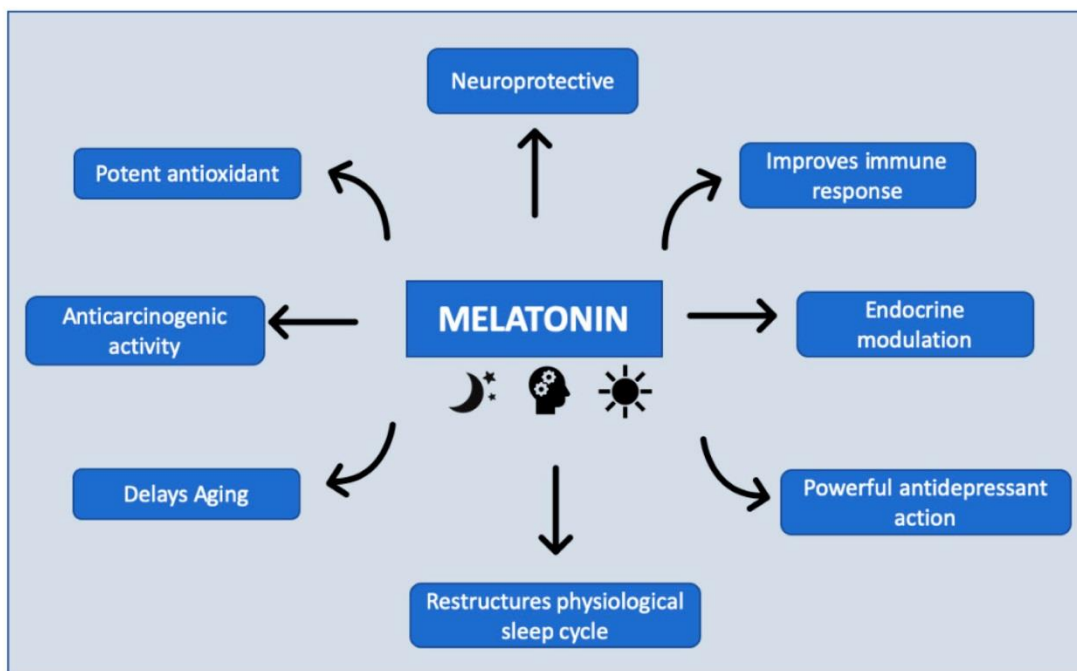


Figure 2. Actions of melatonin. Source: personal collection.

Thus, melatonin-induced osteoblastic cell formation occurs through increased expression of bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-4), involved in osteoblast differentiation¹⁴.

The homeostasis and maintenance of the bone microenvironment metabolism is kept in tune, with the help of melatonin, due to the beneficial effects, resulting from anabolic and antiresorptive actions. In humans, melatonin stimulates proliferation of bone cells and synthesis of Type I collagen in these cells and inhibits bone resorption by negatively regulating RANKL-mediated osteoclast formation and activation¹⁷.

The mechanisms of action for these effects, may be by three routes: increasing osteogenic differentiation markers (Runx2, Opn, and Ocn) and increasing osteoblast activity; inhibiting the expression of osteoclast differentiation markers (Calcr, Ctsk, and Rank); and, scavenging free radicals¹⁸.

Below is a figure demonstrating the bone neoformation induced by topical application of melatonin in critical defects of rat calvaria (figure 3), resulting from an ongoing research project by the research group of the department of Basic and Oral Biology, University of São Paulo of Ribeirão Preto. The figure, corroborates the idea that melatonin has osteogenic properties that favor bone repair, it can be observed the presence of a large area of newly formed bone, in addition to blood vessels and osteogenic cells.

Melatonin and osteoporosis:

Osteoporosis is a progressive bone disease, in which low bone mass and structural deterioration of bone tissue increase bone fragility and the subsequent risk of fracture. Like cardiovascular disease, osteoporosis is also responsible for a high rate of morbidity and mortality in the elderly population¹⁹.

Bone loss and osteoporosis resulting from aging is related to the reduction of melatonin. Since its discovery, a plethora of research has been conducted, due to the potential use of this molecule, since melatonin is able to regulate bone density, as it promotes the acceleration of osteoblastogenesis, suppression of osteoclast differentiation and osteoclastogenesis and induction of apoptosis in osteoclasts, and suppression of osteolytic bone metastasis, interesting properties for osteoporosis treatment²⁰.

Wang X and colleagues²¹, concluded that melatonin stimulates bone formation and reduces bone loss in ovariectomized rats, stemming from inhibiting osteoclast differentiation and promoting osteogenic differentiation.

In summary, current researches conclude that melatonin exhibits a great potential for osteoporosis treatment, considering that anti-osteoporotic drugs reduce the rate of bone loss and aid in fracture healing, but do not stimulate bone formation. Thus, melatonin emerges with great potential for the development of therapeutics that can effectively treat

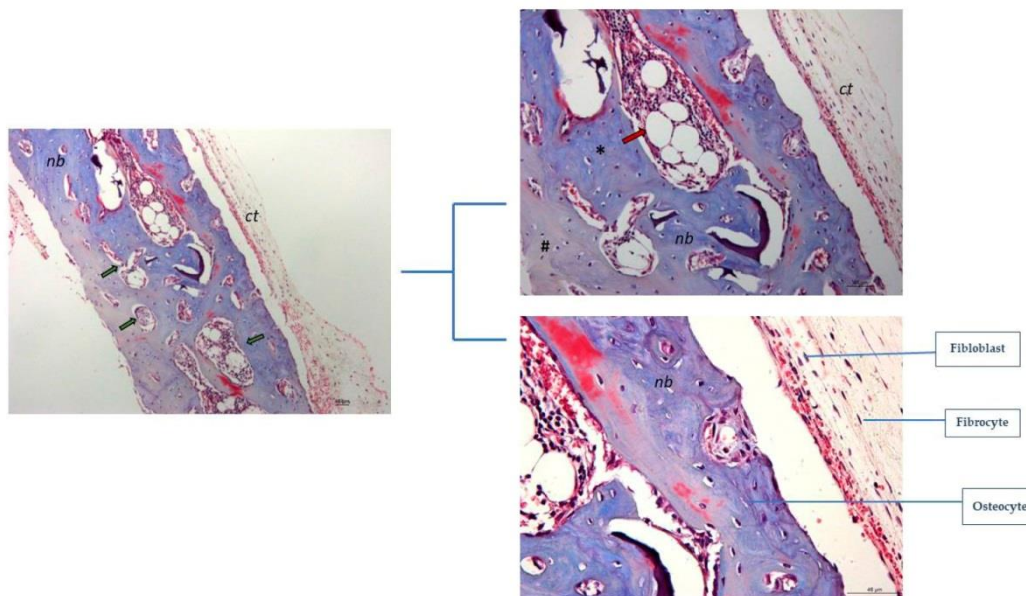


Figure 3. Image of experimental calvaria bone defect in rat, with topical application of melatonin. A: Neoformed bone at the extent of the defect (nb), with formation of bony tabulae (green arrows) and connective tissue adjacent to the defect area (ct). B: Formation of blood vessels (red arrow), neoformed bone (nb) with regions of more dense (*) and less dense (#) calcium deposition and connective tissue adjacent to the defect (ct). C: Presence of osteocytes in the bone matrix and fibroblasts and fibrocytes in the connective tissue. Staining: Masson's Trichrome. Magnification: 10x (A), 20x(B), 40x(C). Scale bars: 46 μ m. Source: personal collection. Thus, we conclude that melatonin is directly related to the bone repair process, presenting great therapeutic potential in the bone microenvironment, being directly related to the treatment of bone diseases.

bone loss-related pathologies such as osteoporosis and osteolysis²².

Melatonin and healthy ageing:

Aging is an extremely complex and multifactorial process, accompanied by circadian changes and closely associated with oxidative damage and mitochondrial dysfunction, which can lead to consequences such as metabolic disorders. In addition, aging has been associated with a significant reduction in sleep efficiency and continuity, which coincides with a significant reduction in the amplitude of the melatonin rhythm. Sleep cycle disturbances cause numerous pathophysiological changes that accelerate the aging process, in the central nervous system, sleep disruption impairs several functions, including the clearance of waste molecules. Melatonin deficiency may result in reduced antioxidant protection in the elderly, which may have significance not only for aging itself, but may also contribute to the incidence or severity of some age-related diseases²³.

In fact, aging may be a process resulting in part from relative melatonin deficiency, and melatonin may be effective in improving quality of life in the elderly^{24, 25}.

The decrease in plasma melatonin plays a particular role in the endocrine sequelae of aging. In addition, melatonin exerts a significant cytoprotective action by buffering free radicals and reversing inflammation through negative regulation of pro-inflammatory cytokines, suppression of low-grade inflammation, and prevention of insulin resistance.

There is a constant search for any therapeutic agent that improves the quality of life of the elderly. The administration of melatonin to elderly animals counteracts a significant number of senescence-related changes. In humans, melatonin is effective both as a chronobiotic and cytoprotective agent to

maintain healthy aging. Circulating levels of melatonin are consistently reduced in the metabolic syndrome, ischemic and nonischemic cardiovascular diseases, and neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's diseases.

Melatonin levels decrease considerably with aging, and its decline is associated with several age-related diseases. Several clinical trials have suggested the therapeutic potential of melatonin, due to its cytoprotective effects. However, more controlled studies are still needed, especially to establish the minimum necessary dose of melatonin^{26,27}.

The highest serum levels of melatonin occur at night, especially in winter, because of the longer nights. However, it is noted that this value decreases with aging, as shown in the figure below (figure 4)^{28,29}.

Melatonin and sleep disorders:

Due to the growing increase in sleep disorders, new treatment alternatives are being sought that aim to improve the quality of life of people who suffer from these pathologies. Currently, there are several drug treatments on the market for this purpose, however, these drugs have considerable side effects, so there is a growing demand for new therapeutic approaches that minimize these effects and do not have addictive potential³⁰.

As one ages, the ability to sleep decreases and, consequently, the incidence of sleep disorders gradually increases. It is known that melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is an endogenous hormone produced by the pineal gland its production is activated by the suprachiasmatic nucleus, inhibited by light and released exclusively at night, able to synchronize circadian rhythms and improve sleep quality, it is also already established in the literature that exogenous supplementation with melatonin has no adverse effects³¹.

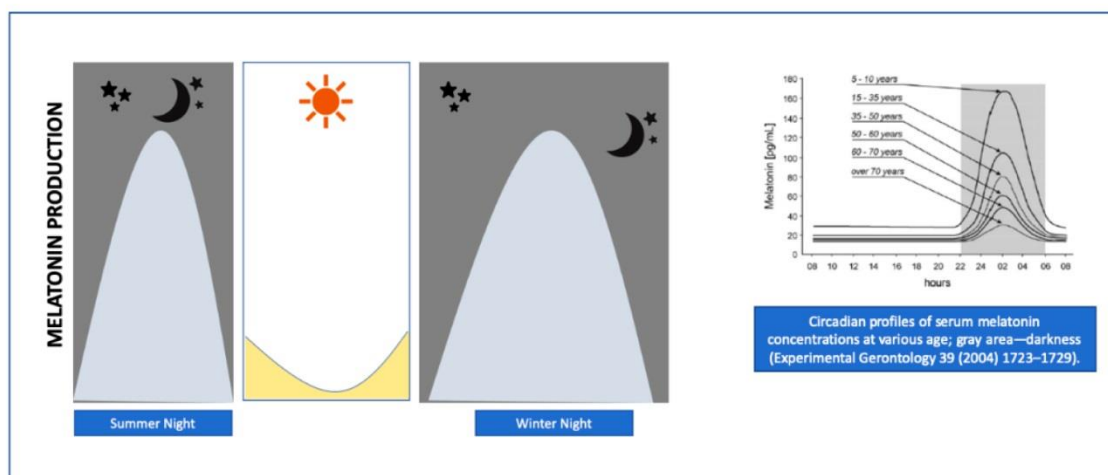


Figure 4. Melatonin production inversely proportional with age. Serum levels higher at night, especially in winter.

Supplementation with exogenous melatonin is able to alter sleep architecture, consequently improving its quality, as well as increasing sleep time and efficiency and decreasing sleep latency in patients suffering from sleep disorders, such as psychophysiological insomnia, and patients taking beta-blockers (suppression of endogenous secretion of nocturnal melatonin). In addition, melatonin is able to synchronize the sleep-wake cycle in blind individuals and in individuals suffering from jet lag and the onset of advanced sleep in individuals suffering from delayed sleep phase syndrome. These sleep restorative effects of exogenously administered melatonin represent a promising investigative route for early intervention to promote healthy physical and mental aging³².

The figure below (figure 4), represents a schematic of the production of melatonin by the suprachiasmatic nucleus, which occurs during the night.

Sleep Breathing Abnormalities:

Sleep breathing abnormalities (SBDs) include obstructive sleep apnea (OSA), central sleep apnea disorders, sleep-related hypoventilation disorders, and sleep-related hypoxemia disorders.

The treatments for these disorders have significant disadvantages, requiring new therapies. In view of this need, it was observed that melatonin had a beneficial effect on the complications caused by these disorders, both in animal models and in human clinical trials. In addition, melatonin prevents the development of secondary cardiovascular diseases.

Cardinali DP and colleagues³³, reported that the use of melatonin analog drugs also increased total sleep time and sleep efficiency, as well as in reducing

sleep latency, in patients with insomnia, but there is still a need for long-term studies of melatonin.

The table below, summarizes the effects of melatonin on some types of sleep disorders (table 1).

Melatonin and fetal neuroprotection:

It has been reported in the specific literature that melatonin is able to pass from the placenta to the fetus and display its effects, the use of melatonin during pregnancy and lactation period presents positive effects, and may decrease the risk of complication in risky pregnancies. The highest levels of melatonin in the gestational period are after 32 weeks³⁵, having as function to ensure the formation of the neural tube, protecting against damage and dysfunction caused by oxidative stress.

The human placenta produces melatonin through two en-zymes that metabolize serotonin into melatonin, serotonin N-acetyltransferase (AANAT) and N-acetylserotonin methyltransferase expressed in villoustrophoblasts³⁶. In the uterus of pregnant women, melatonin and oxytocin may act synergistically to promote and maintain strong uterine contractility³⁷.

Liu S and colleagues³⁸, reported in a rat study that in gestational diabetes, there is a decrease in melatonin levels, increasing glucose transport to the embryos, consequently increasing the oxidative status of the cells, decreasing free radical scavenging, increasing oxidative metabolism or both, which may lead to various diabetic embryopathies. Furthermore, they concluded that melatonin, may help protect the neural tube of the embryo, in diabetic pregnancy in addition to its high safety of use, with no adverse effects.

Table 1. Summarizes the effects of melatonin on some types of sleep disorders (33 e 34)

Sleep disorders	Effetcs of Melatoninn
Insomnia	<ol style="list-style-type: none"> 1. Improves the quality of sleep 2. Increase total sleep time 3. Improves sleep efficiency 4. Decreases sleep onset latency
SBDs (Sleep-related breathing disorders)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Lowers blood pressure 2. Increases blood flow in poorly perfused tissues 3. Antihypertensive effects 4. Management of cardiovascular diseases
Central hypersomnia disorders	<ol style="list-style-type: none"> 1. Decreases plasma levels of TNF-alpha and IL-1-beta 2. Increases BDNF, S100B and IL-10 3. Prevents neuronal dopamine loss or negative regulation of the dopaminetransporter 4. Antiapoptotic effects
CRSWDs (Circadian rhythm sleep-wake disorder (circadian rhythm sleep disorder)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Reduces nocturnal activity 2. Reduces activity and position changes during naps 3. Modulates the circadian rhythm of the sleep-wake cycle 4. Improves Sleep Efficiency
Parasomnias	<ol style="list-style-type: none"> 1. Decreases muscle tone during REM sleep 2. Reduces injuries 3. Less adverse effect

Evidence was found in *in vitro* studies that revealed that melatonin, when given during pregnancy, may help protect the developing fetal brain from injury due to its antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic potential³⁹.

Pre-eclampsia is a condition caused by placental dysfunction, which can put the fetus at risk due to increased oxidative stress, thus due to the protective potential of melatonin, its use may be beneficial.

Fetal brain protection against free radicals, induced by increased oxidative stress, occurs due to the antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of melatonin, in addition to the ability to indirectly increase gene expression⁴⁰.

Laste G *et al.*⁴¹ published a review on the importance of melatonin during risky pregnancies and suggested further studies related to this subject

Furthermore, in the literature, studies are found showing decreased maternal blood levels in preeclamptic pregnancies compared to normotensive pregnancies, so melatonin can be used as a potential treatment for preeclampsia⁴².

However, further studies are still needed to establish this therapy, which evaluate infants over a long period of time, defining the long-term effects of melatonin⁴³.

Melatonin and Cardiovascular Diseases:

Cardiovascular diseases are the main cause of mortality and morbidity, and the prognosis is not always so favorable, even with the evolution of treatments. Epidemiological studies indicate that melatonin is reduced in patients with some kind of cardiovascular disease, indicating an inverse relationship, supporting the idea that melatonin has a fundamental role of protective effect related to cardiovascular pathologies (hypertension, cardiovascular diseases, heart failure, arrhythmias, myocardial infarction, diabetes, obesity, etc). Melatonin presents a cardioprotective effect, due to the fact that it is an antioxidant and anti-inflammatory agent, being able to produce beneficial effects in lesions caused by ischemia/reperfusion (IR) injury in several organs, including heart, liver, kidney, intestine, testis, brain and lung^{44,45,46}.

Melatonin supplementation protects the heart in several experimental models, animal studies demonstrate the ability to regulate blood pressure with the presence of melatonin⁴⁷, as well as human studies have also shown favorable results for treating patients with hypertension and normotensive patients, with decreased blood pressure, decreased tachycardia, and increased antioxidant defense⁴⁸.

Studies have reported that melatonin prevents atherosclerotic progression through various signaling pathways by producing anti-inflammatory and anti-proliferative effects, which result in the reduction of atherosclerotic plaque lesions⁴⁹.

There are reports that melatonin has significant

effects on ischemia-reperfusion injury, chronic intermittent myocardial hypoxia injury, pulmonary hypertension, hypertension, heart valve disease, vascular disease, and lipid metabolism, and is an excellent therapeutic option because it is an inexpensive and well-tolerated drug⁵⁰.

Jiki and colleagues⁵¹, reported the beneficial cardioprotective effects of endogenous and supplemental melatonin for cardiovascular diseases, as well as its safety of consumption.

Despite the need for more randomized clinical trials for clinical practice, melatonin is known to decrease complications associated with infarction, myocardial injury, hypertrophy, and may have a synergistic effect with surgical or non-surgical treatment of these patients.

Melatonin and schizophrenia:

Schizophrenia is a chronic disorder that affects the ability to think, feel and behave clearly, its etiology and pathophysiology remain a challenge, as they are not fully known and present a combination of genetic, environmental and brain chemical alterations factors, therefore the existing treatments have limitations and tend to be needed throughout life, with a combination of drugs and therapies.

Some evidence has suggested that schizophrenic patients have reduced melatonin levels, a fact that considerably affects the quality of life of these patients⁵².

People with schizophrenia may have sleep disturbances as symptoms, and because of melatonin's ability to improve sleep quality, it can be used as a therapeutic to decrease these symptoms⁵³.

Although it has been shown that there is a relationship between melatonin and this disease, the findings of the studies are still inconclusive. Today, there are easy and inexpensive methods to measure melatonin, making it easier to conduct new research, since research on therapeutic applications is very scarce compared to the new research conducted on the role of melatonin as a marker for schizophrenia⁵⁴.

Melatonin and autism:

Autism is a health condition characterized by deficits in social communication (socialization and verbal and non-verbal communication) and behavior (restricted interest or hyper-focus and repetitive movements). Autistic children tend to have sleep disorders and consequently have reduced sleep quality, a fact that can further aggravate the symptoms of the autistic disorder.

The action of melatonin in different pathologies has been frequently studied, and it has been reported that in autistic patients, there seems to be a lower production of this hormone, instigating several studies with different formulations of the use of melatonin with immediate or prolonged release.

It has been reported that melatonin not only helps to minimize the problem, but also to reduce behavioral disturbances. Positive effects on sleep quality and latency, and improvement of behavioral impairments in autistic patients have been reported, however, more studies need to be conducted⁵⁵.

It is worth noting that the dosage, depends on the age and weight of the child and the effects of topical use of melatonin depend on several factors, such as age, time of administration, dose and association with other substances. In addition, the use of melatonin does not present any side effects.

Rossignol DA *et al.* (2011), reported that melatonin administration in autistic children improves behavior, sleep quality and decreases side effects in these children⁵⁵. In conclusion, melatonin is a safe, effective, well-tolerated, and potent therapeutic agent to aid in sleep disorders in children and adolescents with autism. Further exploration of the factors that influence the pharmacokinetics of melatonin may improve its use and the establishment of new therapeutics^{56,57}.

Melatonin and COVID-19

The COVID-19 pandemic has infected and killed millions of people worldwide. These large numbers necessitated the rapid development of clinical trials to evaluate therapies capable of reducing the alarmingly high mortality rate; as a result, a large number of drugs have been studied in patients with COVID-19.

Melatonin is known to have numerous beneficial effects for humans, considering viral infections, melatonin exhibits anti-inflammatory, antioxidant and immunosuppressive properties⁵⁸. It is possible to observe the decrease of melatonin in viral infections, a fact that reflects its importance, Simko F and collaborators identified that melatonin suppression, increases the susceptibility to SARS-CoV-2 infection⁵⁹.

The efficacy of melatonin as adjunctive therapy has been demonstrated in a variety of diseases, however, there are few studies evaluating the use of melatonin in patients with COVID-19⁶⁰.

Studies in animals, point to the efficacy and safety of melatonin for treating patients with COVID-19 by reducing viremia and viral load. In addition, melatonin brings other beneficial effects to COVID-19 patients, such as reducing vascular permeability, reducing anxiety, and improving sleep quality⁶¹.

In the paper Zhang R *et al.*⁶¹ demonstrated that oral melatonin, when added to standard treatment, was more effective than standard treatment alone in hospitalized patients with severe COVID-19. Better rates of thrombosis, sepsis, and mortality support the adjuvant efficacy of melatonin in attenuating this infectious disease. Given melatonin's superior performance as an inexpensive, highly safe and readily available drug, it is highly recommended that this be addressed in future studies.

Although the safety of melatonin, even at high doses, is already well established in the literature, monitoring of administration in patients with COVID-19 and further experimental and clinical studies are needed.

Melatonin and beverages (wine and beer):

The various beneficial effects of melatonin on the human body are already well established in the literature, including benefits in sleep quality and in the treatment of several pathologies, such as cardiovascular diseases, bone diseases, neurodegenerative diseases, Parkinson's, Alzheimer's, sleep disorders, among others.

Part of these effects is due to the antioxidant capacity of melatonin, which is able to act on reactive molecules.

In view of so many benefits, different ways of exogenous melatonin administration are being sought, one of them is through the consumption of wine and beer. Wine and beer are beverages that have melatonin and its intake can reach considerable plasma levels to exert the desired effects, thus, through diet, moderate consumption of these beverages is a good source of melatonin absorption⁶².

Melatonin and cancer treatment:

The conventional treatment against cancer, still has several disadvantages, such as decreased quality of life of patients and undesirable tissue responses, and even with treatment the prognosis often remains unfavorable. Thus, new approaches are desirable to improve the treatment and quality of life of cancer patients.

Currently, it is known that melatonin can also act in the treatment against cancer, since it has anti-cancer mechanisms. There are studies in literature that report these significant effects, especially in hormone-dependent neoplasms⁶³. The antitumor activity of melatonin is due to apoptosis regulation, angiogenesis inhibition, antioxidant activity, antimetastatic and circadian disruption prevention

The main advantage of the use of melatonin in cancer treatment and prevention is due to the ability to potentiate the therapeutic effects when associated with other conventional therapies, besides reducing the side effects of drugs, such as drug resistance and improving the quality of life of these patients. Sanchez-Barcelo EJ *et al.* (2012) reported the benefits of melatonin as an adjuvant in drug treatment and the lack of contraindications for continuous use, besides that melatonin is able to diffuse into various tissues and cells of the body, protecting against different damages, mainly due to radiation. A considerable number of clinical studies have suggested decreased side effects of chemotherapy and radiation therapy, and increased efficiency when melatonin is administered, due to its antioxidant role and ability to penetrate all types of cells in the body, protecting different organs against

radiation^{64,65,66}.

Studies have suggested that the anticancer effect of melatonin is not tissue-specific and its therapeutic and preventive properties have been reported as different types of cancer.

Farhood B *et al.* (2019), mentioned that melatonin, can modulate responses to radiation through various pathways, different from other conventional antioxidants, ensuring radioprotective and radiosensitive effects, decreasing undesirable reactions to different organs. In addition to all this, some studies have revealed that it has a synergistic effect with radiation on tumor cells⁶⁷.

Ahabrach H *et al.* (2021), concluded that circadian rhythm and blood melatonin concentration are altered in breast cancer patients, affecting quality of life, furthermore, he reported that due to the antioxidant role, new therapies can be developed⁶⁶.

New studies about the pharmacokinetics and bioavailability of exogenous melatonin need to be performed, as these are factors that are not yet fully understood and affected by factors that depend from person to person⁶⁸.

In summary, the safety, lack of contraindication and high efficiency of melatonin justifies its use in cancer prevention and treatment.

Melatonin and skin:

The skin plays an important role in protecting against damage from ultraviolet (UV) radiation, because besides being a target for the protective actions of melatonin, it is also a site of synthesis and metabolism⁶⁹.

Topical application of melatonin and its metabolites along with endogenous production has great potential

for defense against ultraviolet radiation due to its antioxidant effects⁷⁰. The radioprotective effect is given by melatonin and its metabolites⁷¹.

It is worth noting that some metabolites exhibit an even greater impact than melatonin alone, all of these metabolites can potentially affect mitochondrial functions in skin cells and consequently the skin phenotype⁷².

In addition to antioxidant and oncostatic effects, melatonin may play a role in regulating skin and barrier functions⁶⁹.

In mammals, the skin is able to synthesize and metabolize melatonin, and its cutaneous effects are a consequence of its local concentration and of its metabolites. Protection against UV damage also occurs through the effect of melatonin and its metabolites.

However, that of topically applied melatonin and its derivatives needs further evaluation and more assessments in future clinical trials.

Future prospects:

Due to the enormous potential presented by melatonin and its safety profile already established in literature, there are numerous therapeutic applications for melatonin. Emerging researches aim to establish different therapies with exogenous melatonin alone or in association that allow greater safety, better effectiveness and fewer adverse effects for drug manufacturing, for treatment of pathologies of various classes, besides the protective effect and improvement in biological functions related to this endogenous hormone

The table below (Table 2), summarizes all the applications of melatonin and its respective effects, cited in this article.

Table 2. Summarizes all the applications of melatonin and its respective effects, cited in this article.

Applications of Meltonin	Effect of melatonin	References
Bone Metabolism	<ul style="list-style-type: none"> • Increase in markers of osteogenic differentiation • Increased osteoblast activity • Inhibition of the expression of osteoclast differentiation markers • Inhibition of free radicals 	Nakade <i>et al.</i> , 1999 ¹³ Roth <i>et al.</i> , 1999 ¹⁷ Park <i>et al.</i> , 2011 ¹⁴
Osteoporosis	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulates bone formation • Reduces bone loss • Inhibition of osteoclast differentiation • Promotion of osteogenic differentiation. 	Coyle D. <i>et al.</i> , 2019 ¹⁹ MacDonald IJ <i>et al.</i> , 2021 ²⁰
Sleep disorders	<ul style="list-style-type: none"> • Improves sleep quality and efficiency • Reduce nocturnal activity • Reduces muscle tone during REM sleep • Reduces blood pressure • Decreases sleep onset latency 	Xie Z <i>et al.</i> , 2017 ³⁰ Zisapel N., 2018 ³¹
Cardiovascular disease	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidant agent • Anti-inflammatory agent • Anti-proliferative agent 	Reiter RJ. <i>et al.</i> , 2014 ³⁷
Autism	<ul style="list-style-type: none"> • Therapeutic benefits of melatonin have been observed for sleep disorders in autism, notably on sleep latency and sleep quality. 	Palagini L. <i>et al.</i> , 2021 ⁷¹ Rossignol DA, <i>et al.</i> , 2011 ⁵³

COVID-19	<ul style="list-style-type: none"> • Indirect antiviral actions • Anti inflammatory, anti oxidant, immune strengthening 	Ameri A. et al., 2021 ⁵⁶
Schizophrenia	<ul style="list-style-type: none"> • Potential for a possible therapeutic and/or adjuvant agent in the management of schizophrenia. 	Morena-Fumero AL. et al., 2013 ⁵²
Cancer	<ul style="list-style-type: none"> • Adjuvant action with chemotherapy to enhance therapeutic effects. 	Kubatka P. et al., 2018 ⁶¹ Farhood B. et al, 2019 ⁶⁴
Drinks	<ul style="list-style-type: none"> • Melatonin concentrations in wine and beer make them two excellent vehicles for incorporating melatonin into the diet naturally. 	Marhuenda J. et al., 2021 ⁶⁰
Pregnancy at risk	<ul style="list-style-type: none"> • Decreases the risk of injury to the fetus • Treatment for pre-eclampsia • Protection against oxidative stress 	Laste G. et al., 2021 ⁴¹ Lanoix D et al., 2012 ⁴²
Skin	<ul style="list-style-type: none"> • Protection against ultraviolet radiation • Tissue homeostasis • Antioxidant defense 	Slominski, A. T et al., 2017 ⁶⁹ Fischer TW et al., 2006 ⁶⁷

Conclusion

In view of all the above, it is evident the great therapeutic potential associated with melatonin and the great importance of studies on these various applications, to discover safe and effective parameters in the establishment of new therapies.

Acknowledgments

We are thankful FAPESP for financial support (2019/03699-1)

Funding

Please add: This research was funded by FAPESP (2019/03699-1).

References

- Pandi-Perumal SR, BaHammam AS, Ojike NI, Akinseye OA, Kendzerska T, Buttoo K, Dhandapani PS, Brown GM, Cardinali DP. Melatonin and Human Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2017 Mar;22(2):122-132.
- Touitou Y, Bogdan A, Auzéby A, Selmaoui B. Mélatonine et vieillissement [Melatonin and aging]. *Thérapie.* 1998 Sep-Oct;53(5):473-8. French. PMID: 9921040.
- Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep.* 2009; 61:383-410
- Slominski, A. T., Semak, I., Fischer, T. W., Kim, T. K., Kleszczyński, K., Hardeland, R., & Reiter, R. J. (2017). Metabolism of melatonin in the skin: Why is it important?. *Experimental dermatology*, 26(7), 563-568.
- Lima FB, Machado UF, Bartol I, Seraphim PM, Sumida DH, Moraes SM, Hell NS, Okamoto MM, Saad MJ, Carvalho CR, Cipolla-Neto J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Physiol.* 1998;275(6):934-41.
- Bonmati-Carrion MA, Tomas-Loba A. Melatonin and Cancer: A Polyhedral Network Where the Source Matters. *Antioxidants (Basel).* 2021 Feb 1;10(2):210.
- Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougereou C. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Curr Neuropharmacol.* 2017 Apr;15(3):434- 443
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem.* 1960 Jul;235:1992-7.
- Hardeland R, Madrid JA, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res.* 2012; 52:139-166.
- Liu PI, Chang AC, Lai JL, Lin TH, Tsai CH, Chen PC, Jiang YJ, Lin LW, Huang WC, Yang SF, Tang CH. Melatonin interrupts osteoclast functioning and suppresses tumor-secreted RANKL expression: implications for bone metastases. *Oncogene.* 2021 Feb;40(8):1503-1515.
- Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KH. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(7):1219-29.
- Liu PI, Chang AC, Lai JL, Lin TH, Tsai CH, Chen PC, Jiang YJ, Lin LW, Huang WC, Yang SF, Tang CH. Melatonin interrupts osteoclast functioning and suppresses tumor-secreted RANKL expression: implications for bone metastases. *Oncogene.* 2021 Feb;40(8):1503-1515.
- Nakade O, Koyama H, Arijji H, Yajima A, Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res.* 1999; 27:106-10.
- Park KH, Kang JW, Lee EM, Kim JS, Rhee YH, Kim M, Jeong SJ, Park YG, Kim SH. Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ERK/Wnt signaling pathways. *J Pineal Res.* 2011; 51:187-94.
- Zhang L, Su P, Xu C, Chen C, Liang A, Du K, Peng Y, Huang D. Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPAR-gamma expression and enhancing Runx2 expression. *J Pineal Res.* 2010; 49:364-72.
- Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Muñoz F, Lopez-Peña M, Stephenson J. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. *J Pineal Res.* 2008;45:174- 9.
- Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI (1999) Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem.* 1999; 274:22041-47.
- Wang X, Liang T, Zhu Y, Qiu J, Qiu X, Lian C, Gao B, Peng Y, Liang A, Zhou H, Yang X, Liao Z, Li Y, Xu C, Su P, Huang D. Melatonin prevents bone destruction in mice with retinoic acid- induced osteoporosis. *Mol Med.* 2019 Aug 28;25(1):43.
- Coyle D. Cost-Effectiveness of Pharmacological Treatments for Osteoporosis Consistent with the Revised Economic Evaluation Guidelines for Canada. *MDM Policy Pract.* 2019;4:2381468318818843.
- MacDonald IJ, Tsai HC, Chang AC, Huang CC, Yang SF, Tang CH.

- Melatonin Inhibits Osteoclastogenesis and Osteolytic Bone Metastasis: Implications for Osteoporosis. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 30;22(17):9435.
21. Wang X, Liang T, Zhu Y, Qiu J, Qiu X, Lian C, Gao B, Peng Y, Liang A, Zhou H, Yang X, Liao Z, Li Y, Xu C, Su P, Huang D. Melatonin prevents bone destruction in mice with retinoic acid- induced osteoporosis. *Mol Med.* 2019 Aug 28;25(1):43.
22. MacDonald JJ, Tsai HC, Chang AC, Huang CC, Yang SF, Tang CH. Melatonin Inhibits Osteoclastogenesis and Osteolytic Bone Metastasis: Implications for Osteoporosis. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 30;22(17):9435
23. Karasek M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp Gerontol.* 2004 Nov-Dec;39(11-12):1723-9.
24. Cardinali DP, Furio AM, Reyes MP. Clinical perspectives for the use of melatonin as a chronobiotic and cytoprotective agent. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec;1057:327-36.
25. Haimov I, Laudon M, Zisapel N, Souroujon M, Nof D, Shlitner A, Herer P, Tzischinsky O, Lavie P. Sleep disorders and melatonin rhythms in elderly people. *BMJ.* 1994 Jul 16;309(6948):167.
26. Cardinali DP. Melatonin and healthy aging. *Vitam Horm.* 2021;115:67-88.
27. Öztürk G, Akbulut KG, Güney Ş. Melatonin, aging, and COVID-19: Could melatonin be beneficial for COVID-19 treatment in the elderly? *Turk J Med Sci.* 2020 Oct 22;50(6):1504-1512.
28. Danilenko KV, Kobelev E, Zhanaeva SY, Aftanas LI. Winter-summer difference in post-awakening salivary α -amylase and sleepiness depending on sleep and melatonin. *Physiol Behav.* 2021 Oct 15;240:113549.
29. Olcese J, Jockers R. Editorial: Melatonin in Health and Disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Nov 26;11:613549.
30. Xie Z, Chen F, Li WA, Geng X, Li C, Meng X, Feng Y, Liu W, Yu F. A review of sleep disorders and melatonin. *Neurol Res.* 2017 Jun;39(6):559-565.
31. Zisapel N. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *Br J Pharmacol.* 2018 Aug;175(16):3190-3199.
32. Stanford SC. Recent developments in research of melatonin and its potential therapeutic applications. *Br J Pharmacol.* 2018 Aug;175(16):3187-3189.
33. Cardinali DP, Srinivasan V, Brzezinski A, Brown GM. Melatonin and its analogs in insomnia and depression. *J Pineal Res.* 2012 May;52(4):365-75.
34. Xie Z, Chen F, Li WA, Geng X, Li C, Meng X, Feng Y, Liu W, Yu F. A review of sleep disorders and melatonin. *Neurol Res.* 2017 Jun;39(6):559-565.
35. Nakamura Y, Tamura H, Kashida S, Takayama H, Yamagata Y, Karube A, Sugino N, Kato H. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. *J Pineal Res.* 2001 Jan;30(1):29-33.
36. Lanoix D, Beghdadi H, Lafond J, Vaillancourt C. Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. *J Pineal Res.* 2008 Aug;45(1):50-60.
37. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update.* 2014 Mar-Apr;20(2):293-307.
38. Liu S, Guo Y, Yuan Q, Pan Y, Wang L, Liu Q, Wang F, Wang J, Hao A. Melatonin prevents neural tube defects in the offspring of diabetic pregnancy. *J Pineal Res.* 2015 Nov;59(4):508-17.
39. Wilkinson D, Shepherd E, Wallace EM. Melatonin for women in pregnancy for neuroprotection of the fetus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 Mar 29;3(3):CD010527.
40. Sagrillo-Fagundes L, Assunção Salustiano EM, Ruano R, Markus RP, Vaillancourt C. Melatonin modulates autophagy and inflammation protecting human placental trophoblast from hypoxia/reoxygenation. *J Pineal Res.* 2018 Nov;65(4):e12520.
41. Laste G, Silva AAD, Gheno BR, Rychcik PM. Relationship between melatonin and high-risk pregnancy: A review of investigations published between the years 2010 and 2020. *Chronobiol Int.* 2021 Feb;38(2):168-181
42. Lanoix D, Beghdadi H, Lafond J, Vaillancourt C. Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. *J Pineal Res.* 2008 Aug;45(1):50-60.
43. Ghotbizadeh Vahdani F, Hantoushzadeh S, Nazari F. Melatonin as fetal neuroprotection: Links and risks. *Biomed J.* 2020 Dec;43(6):496-497.
44. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Sanchez-Sanchez JJ, Kaski JC, Reiter RJ. Melatonin and circadian biology in human cardiovascular disease. *J Pineal Res.* 2010 Aug;49(1):14-22.
45. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ. The potential usefulness of serum melatonin level to predict heart failure in patients with hypertensive cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2014 Jun 15;174(2):415-7.
46. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Piccolo R, Galasso G, Reiter RJ. Melatonin is associated with reverse remodeling after cardiac resynchronization therapy in patients with heart failure and ventricular dyssynchrony. *Int J Cardiol.* 2016 Oct 15;221:359-63.
47. Simko F, Pechanova O, Repova Bednarova K, Krajcovicova K, Celec P, Kamodyova N, Zorad S, Kucharska J, Gvozdzakova A, Adamcova M, Paulis L. Hypertension and cardiovascular remodelling in rats exposed to continuous light: protection by ACE- inhibition and melatonin. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:703175.)
48. Green EA, Black BK, Biaggioni I, Paranjape SY, Bagai K, Shibao C, Okoye MC, Dupont WD, Robertson D, Raj SR. Melatonin reduces tachycardia in postural tachycardia syndrome: a randomized, crossover trial. *Cardiovasc Ther.* 2014 Jun;32(3):105- 12.
49. Pourhanifeh MH, Dehdashtian E, Hosseinzadeh A, Sezavar SH, Mehrzadi S. Clinical Application of Melatonin in the Treatment of Cardiovascular Diseases: Current Evidence and New Insights into the Cardioprotective and Cardiotherapeutic Properties. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2022 Feb;36(1):131-155.
50. Sun H, Gusdon AM, Qu S. Effects of melatonin on cardiovascular diseases: progress in the past year. *Curr Opin Lipidol.* 2016 Aug;27(4):408-13.
51. Jiki Z, Lecour S, Nduhirabandi F. Cardiovascular Benefits of Dietary Melatonin: A Myth or a Reality? *Front Physiol.* 2018.
52. Shamir E, Laudon M, Barak Y, Anis Y, Rotenberg V, Elizur A, Zisapel N. Melatonin improves sleep quality of patients with chronic schizophrenia. *J Clin Psychiatry.* 2000 May;61(5):373-7
53. Uguz AC, Demirci K, Espino J. The Importance of Melatonin and Mitochondria Interaction in Mood Disorders and Schizophrenia: A Current Assessment. *Curr Med Chem.* 2016;23(20):2146-58.
54. Morera-Fumero AL, Abreu-Gonzalez P. Papel da melatonina na esquizofrenia. *Int J Mol Sei.* 2013;14(5):9037-9050. Publicado em 25 de abril de 2013.
55. Rossignol DA, Frye RE. Melatonin in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol.* 2011 Sep;53(9):783-792
56. Lalanne S, Fougerou-Leurent C, Anderson GM, Schroder CM, Nir T, Chokron S, Delorme R, Claustrat B, Bellissant E, Kermarrec S, Franco P, Denis L, Tordjman S. Melatonina: da farmacocinética ao uso clínico no autismo Desordem do Espectro. *Int J Mol Sci.* 2 de fevereiro de 2021;22(3):1490.
57. Yenen AS, Çak HT. Melatonin and Circadian Rhythm in Autism Spectrum Disorders. *Turk Psikiyatri Derg.* 2020 Fall;31(3):201-211. English, Turkish.
58. Anderson G, Reiter RJ. Melatonin: Roles in influenza, Covid-19, and other viral infections. *Rev Med Virol.* 2020 May;30(3):e2109.
59. Simko F, Reiter RJ. Is melatonin deficiency a unifying pathomechanism of high risk patients with COVID-19? *Life Sci.* 2020 Sep 1;256:117902
60. Ameri A, Asadi MF, Kamali M, Vatankhah M, Ziaei A, Safa O, Mahmudi M, Fathalipour M. Evaluation of the effect of melatonin in patients with COVID-19-induced pneumonia admitted to the Intensive Care Unit: A structured summary of a study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2021 Mar 8;22(1):194.
61. Zhang R, Wang X, Ni L, Di X, Ma B, Niu S, Liu C, Reiter RJ. COVID-19: Melatonin as a potential adjuvant treatment. *Life Sci.* 2020 Jun 12;250:117583.
62. Marhuenda J, Villaño D, Arcusa R, Zafrilla P. Melatonin in Wine and Beer: Beneficial Effects. *Molecules.* 2021 Jan 11;26(2):343.
63. Kubatka P, Zubor P, Busselberg D, Kwon TK, Adamek M, Petrovic D, Opatrilova R, Gazdikova K, Caprnda M, Rodrigo L, Danko J, Kruzliak P. Melatonin and breast cancer: Evidences from preclinical and human studies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018 Feb;122:133-143
64. Li Y, Li S, Zhou Y, Meng X, Zhang JJ, Xu DP, Li HB. Melatonin for

- the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget*. 2017 Jun 13;8(24):39896-39921
65. Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C, Reiter RJ. Melatonin uses in oncology: breast cancer prevention and reduction of the side effects of chemotherapy and radiation. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012 Jun;21(6):819-31
66. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan DX, Acuna-Castroviejo D, Qin L, Yang SF, Xu K. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2017 Apr 17;18(4):843.
67. Farhood B, Goradel NH, Mortezaee K, Khanlarkhani N, Salehi E, Nashtaei MS, Mirtavoos-Mahyari H, Motevaseli E, Shabeeb D, Musa AE, Najafi M. Melatonin as an adjuvant in radiotherapy for radioprotection and radiosensitization. *Clin Transl Oncol*. 2019 Mar;21(3):268-279.
68. Ahabrach H, El Mlili N, Errami M, Cauli O. Circadian Rhythm and Concentration of Melatonin in Breast Cancer Patients. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2021;21(10):1869-1881.
69. Talib WH, Alsayed AR, Abuawad A, Daoud S, Mahmud AI. Melatonin in Cancer Treatment: Current Knowledge and Future Opportunities. *Molecules*. 2021 Apr 25;26(9):2506.
70. Fischer TW, Sweatman TW, Semak I, Sayre RM, Wortsman J, Slominski A. Constitutive and UV-induced metabolism of melatonin in keratinocytes and cell-free systems. *FASEB J*. 2006 Jul;20(9):1564-6
71. Slominski AT, Kleszczyński K, Semak I, Janjetovic Z, Zmijewski MA, Kim TK, Slominski RM, Reiter RJ, Fischer TW. Local melatoninergic system as the protector of skin integrity. *Int J Mol Sci*. 2014 Sep 30;15(10):17705-32.
72. Slominski, A. T., Zmijewski, M. A., Semak, I., Kim, T. K., Janjetovic, Z., Slominski, R. M., & Zmijewski, J. W. (2017). Melatonin, mitochondria, and the skin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 74(21), 3913-3925.
73. Slominski AT, Zmijewski MA, Semak I, Kim TK, Janjetovic Z, Slominski RM, Zmijewski JW. Melatonin, mitochondria, and the skin. *Cell Mol Life Sci*. 2017 Nov;74(21):3913-3925.
74. Palagini L, Manni R, Aguglia E, Amore M, Brugnoli R, Bioulac S, Bourgin P, Micoulaud Franchi JA, Girardi P, Grassi L, Lopez R, Mencacci C, Plazzi G, Maruani J, Minervino A, Philip P, Royant Parola S, Poirot I, Nobili L, Biggio G, Schroder CM, Geoffroy PA. International Expert Opinions and Recommendations on the Use of Melatonin in the Treatment of Insomnia and Circadian Sleep Disturbances in Adult Neuropsychiatric Disorders. *Front Psychiatry*. 2021 Jun 10;12:688890.

Mini Curriculum and Author's Contribution

1. Leticia Ferreira Montarele: Conceptualization, writing—original draft preparation, writing—review and editing, data search, English review and translation, images. ORCID: 0000-0003-0591-6379.
2. Bruno Fioreli Pereira: Conceptualization, validation, writing—review and editing, visualization, English review and translation. ORCID: 0000-0003-0416-7281.
3. Dimitrius Leonardo Pitol: Conceptualization, writing—review and editing, visualization, English review and translation. ORCID: 0000-0001-5943-2359.
4. Marina Paulini: Conceptualization, writing—original draft preparation, data search, English review and translation, images. ORCID: 0000-0002-4299-8484.
5. Sara Feldman: Conceptualization, validation, visualization, English review and translation. ORCID: 0000-0001-9804-8421.
6. João Paulo Mardegan Issa: Conceptualization, validation, writing—original draft preparation, writing—review and editing, English review and translation, supervision. ORCID: 0000-0002-1056-0795.

Received: July 14, 2022
Accepted: July 27, 2022

Corresponding author
João Paulo Mardegan Issa
E-mail: jpmisssa@forp.usp.br