

RODRIGO MARTINS DOS SANTOS

**EFEITOS DA MELATONINA NA SINALIZAÇÃO
INSULÍNICA DE RATOS COM DOENÇA PERIODONTAL E
PINEALECTOMIZADOS**

Araçatuba

2018

RODRIGO MARTINS DOS SANTOS

**EFEITOS DA MELATONINA NA SINALIZAÇÃO
INSULÍNICA DE RATOS COM DOENÇA PERIODONTAL E
PINEALECTOMIZADOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, para obtenção do título de "Mestre em Ciências Fisiológicas".

Orientadora: Profa. Titular Dóris Hissako Sumida.

Araçatuba

2018

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S237e Santos, Rodrigo Martins dos.
Efeitos da melatonina na sinalização insulínica de ratos com doença periodontal e pinealectomizados / Rodrigo Martins dos Santos. - Araçatuba, 2018
62 f. : il. ; tab.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Doris Hissako Sumida

1. Melatonina 2. Resistência à insulina 3. Colesterol
4. Glândula pineal 5. Doenças periodontais I. T.

CDD 612

Dados curriculares

Nascimento: 13.05.1991- Ilha Solteira –SP

Filiação: Vilma Gonçalves Martins Santos

José dos Santos

2011/2015: Curso de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS

2016/2018: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Dedicatória

A Deus e minha família por sempre acreditarem na minha vitória

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me oferecer o dom da vida e do aprendizado e oportunidade de prosseguir em meus estudos.

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, pela possibilidade de realizar este curso.

À Diretoria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP: Prof. Titular Wilson Roberto e ao Vice-Diretor Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho.

Ao apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de mestrado.

À FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP) e a Pró-Reitoria de Pós-graduação da UNESP (PROPG-UNESP), pelo apoio financeiro durante as viagens para realização de disciplinas.

Agradecimento especial a minha família: minha Mãe Vilma, meu pai José, minhas irmãs Jaqueline e Vanessa e meu irmão Wagner, e ao meu avô Waldemar, agradeço a todos pelo apoio, incentivo e toda fé depositada em mim. Sem vocês essa jornada não seria possível. Amo vocês!

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Doris Hissako Sumida, pela confiança em mim depositada e pelos ensinamentos transmitidos ao longo destes dois anos de mestrado.

À professora Dr^a Suely Regina Mogami Bomfim pelos pareceres semestrais do projeto.

A Daniela Vieira, Sueli Ap. Vieira, João Vieira, Patrícia Vieira e seus demais familiares, que prontamente receberam-me em suas residências durante o período em que permaneci em São Paulo, um período um pouco agitado e cheio de novidades. Sem ajuda de vocês esta jornada não seria concluída. Sou-lhes eternamente grato.

Aos amigos do laboratório Fernando Marani, Fernando Yamamoto Chiba, Renato Felipe Pereira, Maria Sara de Lima Coutinho Mattera, Thais Verônica Tsosoura, Mariana Lopes Benites, Ângelo César Fernandes Jacomossi por todo o ensinamento transmitido. Aos alunos de iniciação científica Bianca Belardi, Beatriz Costa, Jhenifer Haiane, Mariana Caioá e Renan Akira, os quais nestes dois anos me prestaram toda ajuda necessária.

Agradecimento especial à minha namorada, Marjorie Oliveira Gallinari, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos de dificuldade e superação pelos quais passei ao longo desta jornada acadêmica, tanto no âmbito acadêmico como pessoal. Uma pessoa muito especial em minha vida pela qual tenho um imenso carinho, amor e muita gratidão. Que você esteja sempre ao meu lado! Eu te amo!

Agradecimento especial a Gestter Willian Lattari Tessarin pela amizade, companheirismo em todas as horas, por todo conhecimento transmitido, o qual logo mais o tornará um excelente professor, pesquisador e pessoa.

Agradecimento especial a Fernando Marani pela amizade e companheirismo e toda ajuda desde o primeiro em que ingressamos no mestrado. Aprendemos um com outro tanto no lado científico quando no pessoal. Obrigado!

Agradecimento especial a Marcos Braúna e Alex Borges do Amaral, por toda ajuda desde a chega na cidade de Araçatuba e pelo companheirismo durante a nossa estadia na república.

A todos os professores do departamento de Ciências Básicas: Sandra Helena Penha de Oliveira, Ana Cláudia Nakamune, Cristina Antoniali Silva, Wilson Galhego Garcia, Rita Cássica Menegati Dornelles, João Carlos Callera, João César Bedran de Castro, Antônio Hernandez Chaves Neto, Edilson Ervolino, Roberta Okamoto, Mariza Akemi Matsumoto, Paulo Roberto Botacin, Cláudio Aparecido Casatti, José Américo de Oliveira e Roelf Justino Cruz Rizzolo por somarem seus conhecimentos durante meu aprendizado.

A todos os funcionários da UNESP, que de acordo com suas funções, prestaram sua importante parcela de contribuição nos diferentes estágios de realização desta pesquisa.

Aos funcionários da Biblioteca, Cláudio Hideo Matsumoto, Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti, Ana Paula Rimoli de Oliveira, Denise Haruyo Nakamura, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Luís Claudio Sedlacek, Luzia Anderlini e Maria Cláudia de Castro Benez, sempre prontos para nos ajudar.

Aos funcionários da Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (STAEPE), Samuel Aparecido Patim, Maurício Hiromi Tutumi e Patrick Santos Nogueira da Silva.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da FOA/UNESP, Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Mattos, Lilian Sayuri Mada, pela atenção dispensada e grande disposição em atender.

Aos funcionários do Setor de Biotério, Camilo Roberto Venâncio, João Batista Alves Correa e Arnaldo César dos Santos

À funcionária Eliseide Maria Ferreira Silva Navega, pela presteza e carinho dedicado aos alunos.

A todos, que me ajudaram direta ou indiretamente para conclusão do mestrado, meu muito obrigado pela indispensável ajuda na execução de cada uma das etapas deste trabalho.

Gratidão a Deus sempre!

Por favor, não se compare a ninguém! Sempre haverá alguém melhor que você em algo assim como você é melhor que outro em algo. Para que se comparar se você é um ser especialmente único? Você jamais chegará pelo mesmo caminho, assim como ninguém chegará pelo mesmo que o seu. Você é um ser tão único e especial que não é passível de comparação, tão pouco de substituição. A tua história só vai para o livro da vida com a sua particular grafia. Percebeu quão importante és?

“Roger Stankewski”

SANTOS, R.M. **EFEITOS DA MELATONINA NA SINALIZAÇÃO INSULÍNICA DE RATOS COM DOENÇA PERIODONTAL E PINEALECTOMIZADOS**. 2018. F62 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

A doença periodontal (DP) é uma preocupação de saúde pública, uma vez que leva à perda dos elementos dentais; além disso, possui associações com outras doenças inflamatórias crônicas tais como a síndrome metabólica e *diabetes mellitus*. Sabe-se que períodos irregulares de sono podem prejudicar o processamento de memória, reparo celular, regulação hormonal, metabolismo dos carboidratos e aumentar marcadores inflamatórios, evidenciando que o trabalho noturno ou em turnos alternados podem afetar a saúde do trabalhador. A melatonina (MEL) é o principal hormônio que controla os ritmos biológicos no nosso organismo, participando na regulação do sono, metabolismo de carboidratos e lipídeos, sendo suprimida quando há exposição a luz. Considerando-se os efeitos regulatórios da MEL sobre processos inflamatórios, se faz relevante avaliar a influência da deficiência ou suplementação de MEL sobre um processo inflamatório localizado como a DP. Objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da MEL na resistência à insulina (RI), na via de sinalização da insulina, nas citocinas pró-inflamatórias e no perfil lipídico em ratos pinealectomizados (PNX) sem ou com DP. 144 ratos Wistar (40 dias de idade) foram distribuídos em 8 grupos: 1) controle (CN); 2) DP; 3) PNX; 4) PNX e com DP (PNXDP); 5) CN tratado com MEL (CNMEL); 6) DP tratado com ME (DPMEL); 7) PNX tratado com MEL (PNXMEL); 8) PNX com DP e tratados com MEL (PNXDPMEL). Inicialmente os grupos PNX foram submetidos à cirurgia de pinealectomia aos 40 dias de idade e aos 60 dias de idade os animais foram submetidos à indução de DP nos primeiros molares inferiores. Logo após a indução da DP, foi iniciada a reposição com MEL (5 mg/Kg) por via oral (diluída em água de beber) por 28 dias. Ao término do tratamento foram analisados os seguintes parâmetros: 1) dosagem de glicemia e insulinemia; 2) avaliação do perfil lipídico; 3) avaliação do grau de fosforilação em serina da Akt no tecido adiposo, músculo gastrocnêmio e fígado. Os resultados demonstram 1) DP e PNX com DP causaram RI e aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- α ; 2) nenhuma diferença na glicemia e nos níveis de IL-6; 3) nenhuma alteração no grau de fosforilação em serina da AKT após a estimulação insulínica entre os grupos nos

tecidos analisados; 4) apenas os grupos PNX e PNXDP apresentaram alteração no perfil lipídico; 5) a reposição com MEL melhorou todos os parâmetros alterados analisados. A partir desses resultados podemos inferir que a administração de MEL foi capaz de melhorar a resistência à insulina, diminuir a insulinemia e as concentrações plasmáticas de TNF- α e nos grupos DP, PNX e PNXDP, além disso restaurar o perfil lipídico nos grupos pinealectomizados. Podemos sugerir que a MEL teve um papel protetivo, diminuindo a RI em ratos com DP e PNX com ou sem DP. Somente nestes grupos PNX, a MEL melhorou o quadro do perfil lipídico. Desta maneira, o presente estudo enfatiza a importância de se prevenir a DP afim de prevenir a RI, a qual está intimamente relacionada com o DM2, como também alertar aos trabalhadores noturno que podem apresentar desordens nos ritmos biológicos levando as alterações metabólicas.

Palavras-chave: Melatonina, resistência à insulina, colesterol, triglicerídeos, glândula pineal, doenças periodontais

SANTOS, R.M. **EFFECTS OF MELATONIN ON INSULIN SIGNALING IN RATS WITH PERIODONTAL AND PINEALECTOMIZED DISEASE.** 2018. F.62 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is a public health concern, since it leads to loss of dental elements. Furthermore, it has associations with other chronic inflammatory diseases such as the metabolic syndrome and Diabetes mellitus. It is known that irregular periods of sleep can impair memory processing, cell repair, hormonal regulation, carbohydrate metabolism, and increased inflammatory markers. Furthermore, night work or alternating shifts can affect the health of workers. Melatonin (MEL) is the main hormone that controls the biological rhythms in our organism, participating in the regulation of sleep, metabolism of carbohydrates and lipids, being suppressed when there is exposure to light. Considering the regulatory effects of MEL on inflammatory processes, it is relevant to evaluate the influence of MEL deficiency or supplementation on a localized inflammatory process such as PD. The aim of this study was to investigate the effects of MEL on insulin resistance (IR), insulin signaling, proinflammatory cytokines and lipid profile in pinealectomized rats (PNX) with PD. 144 rats (40 days old) were distributed in 8 groups: 1) control (CN); 2) PD; 3) PNX; 4) PNX and with PD (PNXPD); 5) CN treated with MEL (CNM); 6) PD treated with (PDMEL); 7) PNX treated with MEL (PNXMEL); 8) PNX and PD treated with MEL (PNXPDMEL). Initially the PNX groups were submitted to pinealectomy surgery at 40 days of age and at 60 days of age the animals were submitted to the induction of PD in the lower first molars. Immediately after induction of PD, treatment with MEL (5 mg / kg) was initiated orally (diluted in drinking water) for 28 days. After the treatment the following parameters were analyzed: 1) assessment of glycemia and insulinemia; 2) evaluation of the lipid profile; 3) evaluation of the Akt serine phosphorylation status in adipose tissue, gastrocnemius muscle and liver. The results demonstrate that: 1) PD and PNX with PD caused insulin resistance and increased plasma concentrations of TNF- α ; 2) no difference in glycemia and IL-6 levels; 3) no alteration in Akt serine phosphorylation status after the insulin stimulation between the groups in the tissues analyzed; 4) only the PNX and PNXPD groups showed alterations in the lipid profile; 5) the administration of MEL improved all altered parameters analyzed. The results suggest that MEL can be efficient in preventing IR, alteration in lipid profile and increase in plasma levels of insulin and TNF- α promoted by PD and PNX. From these results we

can infer that the MEL administration was able to improve insulin resistance, decrease insulinemia and plasma concentrations of TNF- α in the PD, PNX and PNXP groups, in addition to restoring the lipid profile in the pinealectomized groups. We may suggest that MEL had a protective role, decreasing IR in rats with PD and PNX with or without PD. Only in these PNX groups the MEL improved the lipid profile. Thus, the present study emphasizes the importance of preventing PD in order to prevent IR, which is closely related to DM2, as well as to alert shift workers that they may present disorders in the biological rhythms leading to metabolic alterations

KEYWORDS: Melatonin, insulin resistance, cholesterol, triglycerides, pineal gland, periodontal diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema fotoneuroendócrino em humanos.....	19
Figura 2 - Diagrama de fluxo mostrando a sequência experimental, distribuição dos grupos e linha temporal dos procedimentos experimentais	25
Figura 3 - Peso corpóreo dos ratos durante 28 dias	35
Figura 4 - Ingestão alimentar dos ratos durante 28 dias	35
Figura 5 - Fotomicrografias em campo claro de corte histológico corados hematoxilina e eosina evidenciando a região de furca do primeiro molar inferior direito de animal do grupo controle (CN; A, C e E) e do grupo com doença periodontal induzida (DP; B, D e F) em diferentes aumentos (A e B = 50x; C e D = 100x; E e F=200x; G=400x).....	36
Figura 6 - Avaliação do grau de fosforilação em Serina da AKT antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em tecido adiposo, fígado e músculo gastrocnêmio	40

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Glicemia (mmol/L), insulinemia (μ IU/mL) e índice HOMA-IR	37
Tabela 2 - Concentrações plasmática de TNF- α (pg/mL) e IL-6 (pg/mL)	38
Tabela 3 - Concentrações plasmáticas em mg/dl de Triglicérides, Colesterol Total, Colesterol-HDL, Colesterol-LDL e Colesterol-VLDL.....	39

LISTA DE ABREVIATURA

AA-NAT: aralquilamina N-acetiltransferase

AKT: proteína quinase, AKT é um membro bem caracterizado da via de sinalização mediada pela quinase PI3, regulando crescimento celular, apoptose, síntese de glicogênio e outras respostas celulares através de sua fosforilação.

ANOVA: Análise de Variância é um procedimento utilizado para comparar três ou mais tratamentos.

CT: colesterol Total

CN: controle

DM: Diabetes Mellitus

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

DTT: ditiotreitól

DP: doença periodontal

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

FIG: fígado

GLUT4: transportador de Glicose tipo 4

GP: glândula pineal

HDL: lipoproteína de alta densidade

HOMA-IR: modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina

IRS's: substratos do receptor de insulina

IL-1 β : interleucina 1 Beta

IL-6: interleucina 6

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LPS: lipopolissacarídeo bacteriano

MEL: melatonina

MG: músculo gastrocnêmio

MAP-K: proteína Quinase 1 ativada por mitógenos

NSQ: núcleo supraquiasmático

PI3-quinase: Fosfatidilinositol 3-quinase

PNX: pinealectomizado/pinealectomia

PKB: proteína quinase B

RI: resistência à insulina

SB: solução basal

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poli(acrilamida em dodecil sulfato de sódio

Ser473: Serina

S6K1: proteína ribossômica S6 quinase beta-1

TAB: tecido Adiposo branco periepididimal

TEMED: tetrametil etilenodiamina

TLR4: receptor *Toll-like* tipo 4

TG: triglicérides

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

Tris: hidroximetil aminometano

VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2 Delineamento experimental.....	24
3.3 Pinealectomia.....	26
3.4 Doença Periodontal.....	26
3.5 Administração de melatonina	27
3.6 Avaliação do consumo de ração e evolução da massa corporal dos animais	28
3.7 Colheita de sangue e tecidos	28
3.8 Concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6	28
3.9 Determinação da glicemia (método de glicose-oxidase)	29
3.10 Determinação de insulinemia	29
3.11 Análise do Índice HOMA-IR.....	29
3.12 Determinação da concentração plasmática de colesterol total	29
3.13 Determinação da concentração plasmática de triglicérides	30
3.14 Determinação da concentração plasmática do Colesterol HDL.....	30
3.15 Determinação da concentração plasmática de colesterol LDL e VLDL	31
3.16 Avaliação do grau de fosforilação da AKT (Ser/473) em Músculo gastrocnêmio, fígado e tecido adiposo branco periepídidimo	31
3.16.1 Preparação das amostras para “Western blotting”	31
3.17 Análise Histológica	34
3.18 Análise estatística	34
5 RESULTADOS	34
5.1 Avaliação da massa corpórea (g) e ingestão alimentar	34
5.2 Avaliação histológica da doença periodontal.....	35
5.3 Glicemia, Insulinemia e HOMA-IR.....	37
5.4 Avaliação da concentração plasmática de TNF- α e IL-6	37
5.5 Avaliação das concentrações plasmáticas triglicérides, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e colesterol VLDL	38
5.6 Avaliação do grau de fosforilação em serina da AKT em músculo gastrocnêmio, fígado e tecido adiposo branco periepídidimo	39
6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	40
Referências.....	47
ANEXOS	59

1 INTRODUÇÃO

Períodos irregulares de sono podem prejudicar a capacidade de aprendizagem, processamento de memória, reparo celular, regulação hormonal, metabolismo dos carboidratos, aumento de marcadores inflamatórios e diversas outras influências (WIENER, 2016). De acordo com estudos sobre o sono, é de extrema importância dormir pelo menos 7 a 9 horas por noite (THOMSON *et al.*, 2012); no entanto, evidências recentes apontam que atualmente o número de horas que uma pessoa dorme é inferior a sete horas por noite (ALDABAL,BAHAMMAM, 2011).

Desse modo, trabalho noturno ou em turnos alternados pode afetar a saúde do trabalhador, acarretando no aparecimento de sintomas como alterações de sono, dificuldades para dormir, sonolência excessiva durante o dia, distúrbios gastrintestinais, cardiovasculares, mal-estar, redução de desempenho, fadiga, irritabilidade, desordens psíquicas e interferência nas relações sociais e familiares (MENDES,MARTINO, 2012).

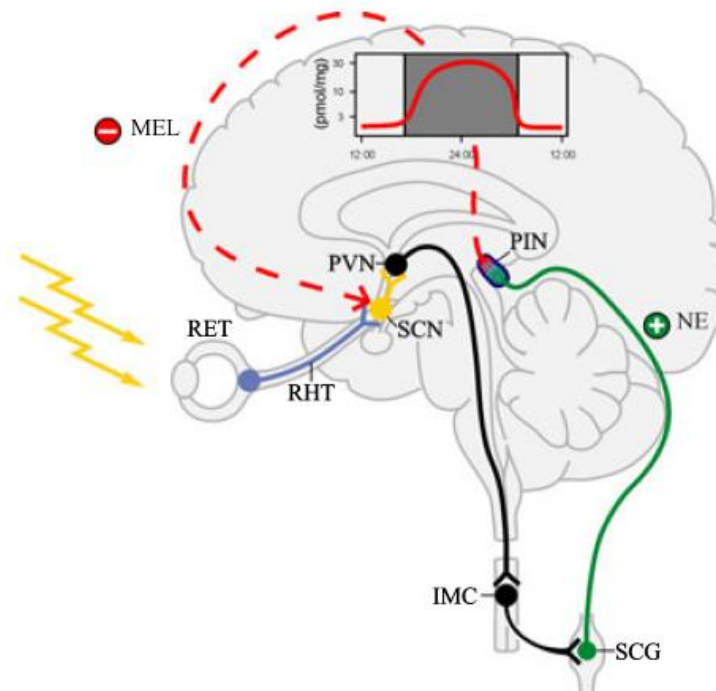
O sistema que controla os mecanismos relacionados ao sono são complexos e contam com diversos elementos (MARTINEZ;LENZ MDO;MENNA-BARRETO, 2008) sendo regulado por uma interação entre processos homeostáticos e circadianos (DIJK,ARCHER, 2009). Os seres vivos são regulados por um relógio biológico interno que sinalizam diversas atividades diárias como por exemplo alimentação ou estado sono/vigília (DUFFY,CZEISLER, 2009). Em humanos e outros animais diurnos (primatas não humanos, cães, répteis) a maior parte da atividade comportamental ocorre durante a fase clara (dia), enquanto que em animais noturnos, como camundongos e ratos, a maioria das atividades é restrita à fase escura (noite) (DIJK,ARCHER, 2009). Dessa forma, o sono e a ritmicidade circadiana estão intrinsecamente interligados com o ciclo claro/escuro.

A luz é o principal estímulo para a regulação dos ritmos circadianos, ciclos sazonais e respostas neuroendócrinas em diversas espécies, incluindo os humanos (BRAINARD *et al.*, 2001). As secreções endócrinas são reguladas por fatores endógenos e exógenos (ambientais). Dentre os fatores exógenos, a luz desempenha um importante papel, especialmente como agente de arrastamento de secreções rítmicas tanto em animais quanto em humanos, sendo que a alternância diária de luz

e escuridão é o estímulo ambiental periódico mais importante para a introdução de ritmos circadianos nos organismos. Nos animais, a ação da luz sobre o sistema endócrino é mediada pela glândula pineal (GP), por meio de variações das secreções de melatonina (MEL) (BELLASTELLA *et al.*, 1998). A MEL é o transdutor neuroendócrino do ciclo claro-escuro. Ela desempenha um papel importante na regulação dos ritmos circadianos humanos e pode ter atividade indutora do sono em humanos (NUNES *et al.*, 2008).

A síntese MEL depende de uma via neural que se inicia por neurônios na retina que transmitem as informações da luminosidade ambiental através de projeções diretas do trato retino hipotalâmico para núcleo supraquiasmático (NSQ). O NSQ projeta-se para os núcleos paraventriculares hipotalâmicos que apresentam projeções diretas para região torácica da medula espinal, na coluna intermédio lateral, sobre os neurônios pré-ganglionares simpáticos, que por sua vez, enviam axônios aos gânglios cervicais superiores que pelos ramos e pelos nervos carotídeos interno projetam-se até GP. Durante período da noite, o circuito neural descrito, é estimulado, promovendo a liberação de noradrenalina pelos terminais simpáticos que inervam a GP. A noradrenalina liberada pelos terminais simpáticos que inervam a GP estimula os receptores β_1 e α_1 e adrenergico a desencadearem uma sinalização intracelular nas células da GP levando-a síntese de MEL (STEHLE *et al.*, 2011), salientando que a exposição à luz pode suprimir agudamente a secreção de MEL (BRAINARD *et al.*, 2001).

Figura 1 - Sistema fotoneuroendócrino em humanos



(STEHLE *et al.*, 2011)

Retina (RET); trato retino-hipotalâmico (RHT); núcleos supraquiasmáticos (NSQ); Sistema nervoso central (SCN); núcleos paraventriculares (PVN), coluna intermediolateral da medula espinal (IMC); gânglios cervicais superiores (SCG); melatonina (MEL); glândula pineal (PIN); noradrenalina (NE); setas em amarelo, estímulos luminosos. No retângulo é mostrada, esquematicamente, a dinâmica da síntese de MEL na GP humana, em escuro, à noite, em claro, o dia.

A síntese e secreção de MEL são diretamente controladas pela luz, sendo que a secreção diminui com a incidência de luz e aumenta no escuro (KARAASLAN,SUZEN, 2015). Em indivíduos jovens observa-se um pico noturno em torno de 200 pm/mL e uma secreção basal baixa, ao redor de 10 pg/mL (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que a supressão de ME é mais sensível à luz de comprimento de onda mais curtas (466-477 nm) do que os comprimentos de onda mais longas (>500 nm) (BRAINARD *et al.*, 1984; BENSHOFF *et al.*, 1987; PU, 2000; BRAINARD *et al.*, 2001; SOUSA-NETO,CASTRO, 2008).

A GP exerce efeito na fisiologia humana por uma ampla gama de funções sinalizadas pela ME (MACCHI,BRUCE, 2004). A GP é o principal secretor de MEL, no entanto, sua síntese também ocorre em outras células e órgãos, incluindo a retina, células da medula óssea humanas, plaquetas, pele, trato gastrointestinal e linfócitos (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2006). Além de sinalizar os ritmos circadianos, a MEL participa

da regulação de mecanismos neuroendócrinas, cardiovasculares, imunológicas, termorregulação e sensibilidade à insulina (GULCIN *et al.*, 2002).

As propriedades fisiológicas ou farmacológicas da ME podem ser dependentes ou independentes de receptores localizados em diferentes células, tecidos e órgãos. Um exemplo que ilustra esses efeitos são as células do sistema imunológico que possuem receptores para MEL e podem modular diversas funções celulares desempenhadas por linfócitos, monócitos e células natural killer (KARAASLAN,SUZEN, 2015). Dentre essas funções da MEL, destacam-se os efeitos anti-inflamatórios tais como: a inibição da síntese de prostaglandinas e moléculas de adesão, regulação negativa da expressão da ciclooxygenase 2 em macrófagos e redução, tanto da adesão endotelial de leucócitos, como do recrutamento de células polimorfonucleares para o local inflamatório (FAVERO *et al.*, 2017).

Além das propriedades anti-inflamatórias, a MEL possui papel importante nos processos antioxidantes e neuroprotetores, funcionando como um eficiente removedor (“scavenger”) de radicais livres direta e indiretamente (KARAASLAN,SUZEN, 2015). A eficiência da MEL como antioxidante endógeno é parcialmente devida à sua propriedade lipofílica (MARTIN *et al.*, 2000) ou seja é capaz de atravessar barreiras fisiológicas, reduzindo assim o dano oxidativo em ambos os ambientes, lipídico e aquoso das células. A MEL e seus metabólitos são bem conhecidos como antioxidantes, e possuem a capacidade de capturar uma variedade de espécies reativas de oxigênio (ROS) e reagentes associados a radicais livres, estimulando a expressão das principais enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase (BONNEFONT-ROUSSELOT,COLLIN, 2010; KARAASLAN,SUZEN, 2015).

Considerando-se os efeitos regulatórios da MEL sobre processos inflamatórios, Cutando *et al.* (2015) demonstraram que a aplicação tópica de MEL em paciente com DP promoveu melhora na saúde periodontal.

Os resultados do último Levantamento Epidemiológico em Saúde Bucal no (BRASIL, 2012) revelaram que indivíduos jovens e adultos, com faixas etárias entre 15 a 19 anos e 35 a 44 anos de idade apresentaram algum tipo de problema periodontal, evidenciando percentual de 47,6% e 49,9%, respectivamente. Com relação aos idosos

(65 a 74 anos de idade), observou-se que apenas 1,8% dos indivíduos exibiram saúde periodontal adequada (BRASIL, 2012).

A DP é uma preocupação de saúde pública, por ser um fator importante na perda dos elementos dentais. Além disso, possui associações com outras patologias crônicas como a síndrome metabólica e a diabetes *mellitus* (DM) (KAYAL, 2013; LEE *et al.*, 2017). A etiologia da DP envolve uma série de alterações patológicas no periodonto causadas pela presença de micro-organismos patogênicos que liberam produtos tóxicos como lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) que compõem a membrana das bactérias gram-negativas (SUN *et al.*, 2010). O LPS possui a capacidade de ativar o receptor Toll-like 4 (TLR4), um receptor de superfície celular que atua na ativação da imunidade inata e indução de respostas inflamatórias. A ativação de TLR4 pode aumentar o processo inflamatório por meio da produção de citocinas (MEDZHITOV, 2001) como o TNF- α e IL-6 (BLETSA;BERGGREEN;BRUDVIK, 2006).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos, monócitos e linfócitos T ativados, sendo uma das principais citocinas inflamatórias liberadas frente aos patógenos periodontais na DP (ROSSOMANDO;KENNEDY;HADJIMICHAEL, 1990; GRAVES,COCHRAN, 2003). Os níveis circulantes de TNF- α encontram-se aumentados em estados patológicos como o DP, cancro, as doenças autoimunes e a obesidade (SETHI,HOTAMISLIGIL, 1999; LEE *et al.*, 2017).

Existem evidências de que o TNF- α contribui para o desenvolvimento de prejuízos metabólicos como alterações no metabolismo lipídico (SETHI,HOTAMISLIGIL, 1999) e resistência à insulina (HOTAMISLIGIL, 1999). Neste sentido, Saghizadeh *et al.* (1996) observaram que pacientes diabéticos ou resistentes à insulina apresentaram expressão aumentada de TNF- α no músculo esquelético quando comparados com indivíduos normoglicêmicos, sugerindo que esta citocina apresenta papel importante na patogênese da resistência à insulina.

Além do TNF- α , a IL-6 também participa da regulação de processos metabólicos no fígado, tecido adiposo e músculo esquelético. Experimentos *in vitro* mostram que em cultura celular de hepatócitos a IL-6 prejudica diretamente a ação da insulina (SENN *et al.*, 2002; SENN *et al.*, 2003). Esta citocina também pode afetar o

tecido adiposo prejudicando a diferenciação de pré-adipócitos e reduzindo a ação da insulina em adipócitos maduros. Entretanto, Glund *et al.* (2007) observaram, em cultura de células musculares, que a ação da insulina é aumentada após a exposição à IL-6. Adicionalmente, dados sugerem que a IL-6 também possui atividades anti-inflamatórias (TILG *et al.*, 1994; BALTO; SASAKI; STASHENKO, 2001; PETERSEN, PEDERSEN, 2006; SCHELLER *et al.*, 2011; FERNANDO *et al.*, 2014). Por outro lado Al-Khalili *et al.* (2006), demonstraram que a infusão de IL-6 em camundongos promoveu uma diminuição na ação insulínica, na produção hepática de glicose e na captação de glicose muscular.

Vários estudos que evidenciam que processos inflamatórios orais podem causar alterações no sinal insulínico e resistência à insulina (COLOMBO *et al.*, 2012; ASTOLPHI *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2016). A insulina é um hormônio anabólico essencial para a manutenção da homeostase glicêmica e do crescimento e diferenciação celular. Esse hormônio atua no metabolismo, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise), aumentando a captação periférica de glicose (principalmente no tecido muscular e adiposo), estimulando a lipogênese no fígado e nos adipócitos, reduzindo a lipólise, promovendo a síntese proteica e inibindo a sua proteólise (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

A sinalização intracelular da insulina inicia-se com a sua ligação com receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade tirosina quinase, sendo composta por duas subunidades α e duas subunidades β . Quando a insulina se liga ao seu receptor promove um aumento da atividade da tirosina quinase da subunidade β promovendo a autofosforilação desse receptor e fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS's) em resíduos de tirosina (KASUGA; KARLSSON; KAHN, 1982; PATTI, KAHN, 1998; CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

A insulina, ao se ligar em seu receptor, induz a ativação de diversas vias bioquímicas por meio da fosforilação dos IRS. Os IRS's ativam duas importantes vias, a via da Proteína Quinase 1 ativada por mitógenos (MAP-K) e da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-k). A via da MAP-K tem papel importante no crescimento, diferenciação e tempo de vida das células pela inibição da apoptose. A via da PI3-K possui funções de MAP-K, porém em menor intensidade. Além destas funções, a via da PI3-K aumenta a síntese de proteínas e glicogênio (papel anabólico). Outra ação muito importante da PI3-K é a ativação da proteína quinase B (PKB, também chamada de

AKT) que por sua vez leva a translocação de vesículas contendo transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4) para a membrana plasmática. Uma vez na membrana, o GLUT4 permite a passagem da glicose, aumentando a permeabilidade da membrana plasmática a este substrato energético e diminuindo sua concentração no meio extracelular (CARVALHEIRA *et al.*, 2002; OLIVEIRA, 2016).

A fosforilação em tirosina dos IRS's promove aumento do sinal insulínico, por outro lado, quando fosforilado em serina causa feedback negativo na sinalização insulínica e pode ocasionar resistência à insulina (RI) (CARVALHEIRA *et al.*, 2002). A RI é definida como um estado de reduzida capacidade de resposta dos tecidos à insulina frente a sua concentração normal ou elevada. Essa desordem ocorre principalmente no tecido adiposo, células do músculo esquelético e fígado (WILCOX, 2005). A RI e a secreção de insulina prejudicada são implicações principais na patogênese do Diabetes Mielites tipo 2 (DM2). A morbidade desta doença relaciona-se tanto com a gravidade da hiperglicemia quanto com as consequências metabólicas da própria RI. (WILCOX, 2005; SAH *et al.*, 2016).

Acredita-se que a RI, na maioria dos casos, ocorra em nível celular por meio de defeitos pós-receptor na sinalização de insulina. Entretanto, esta alteração pode estar relacionada com mecanismos de “down-regulation” de receptor de insulina, deficiências na fosforilação de tirosina do receptor de insulina, polimorfismos genéticos em proteínas IRS ou PI3-K ou também anormalidades na função do GLUT4 (WILCOX, 2005).

Evidências recentes demonstraram que o tratamento com MEL está relacionado à melhora da resistência à insulina em diferentes modelos experimentais (AGIL *et al.*, 2012; HEO *et al.*, 2018). A MEL exerce efeitos regulatórios sobre a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas e modula positivamente o metabolismo das lipoproteínas plasmáticas (MIZRAK *et al.*, 2004; SENER *et al.*, 2004; HUSSAIN, 2007; AGIL *et al.*, 2011). Em pacientes diabéticos, a MEL contribui para a redução dos níveis de colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicérides, promovendo o aumento das lipoproteínas de alta densidade de lipoproteínas (HDL) (AL-MHBASHY *et al.*, 2006; AGIL *et al.*, 2011; SHILAN; HASANI-RANJBAR; ABDOLLAHI, 2012; KADHIM; ALJAWAD; HASHIM, 2014). Adicionalmente, a MEL vem sendo testada em ratos diabéticos com periodontite, a fim de amenizar os efeitos da perda óssea alveolar causadas pela DP (BALCI YUCE *et al.*, 2016), e conforme

comentado anteriormente, a aplicação tópica de ME em paciente com DP promoveu melhora no quadro dessa doença (CUTANDO *et al.*, 2015).

Em suma, a MEL possui um papel importante no controle de diversos ritmos biológicos, incluindo a regulação do sono, metabolismo de carboidratos e lipídeos. Ademais, considerando a relação bidirecional entre a DP e a resistência à insulina e os efeitos da ME nessas variáveis, se faz relevante avaliar a influência da deficiência de MEL ou sua suplementação sobre um processo inflamatório localizado como a DP.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente foi avaliar os efeitos da reposição de MEL em resistência à insulina, via de sinalização da insulínica (em músculo esquelético gastrocnêmio-MG, tecido adiposo branco periepídidimo-TAB e fígado-FIG), concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL6) e perfil lipídico (colesterolemia e triacilgliceridemia) em ratos controle (CN) e pinealectomizados (PNX) com DP.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

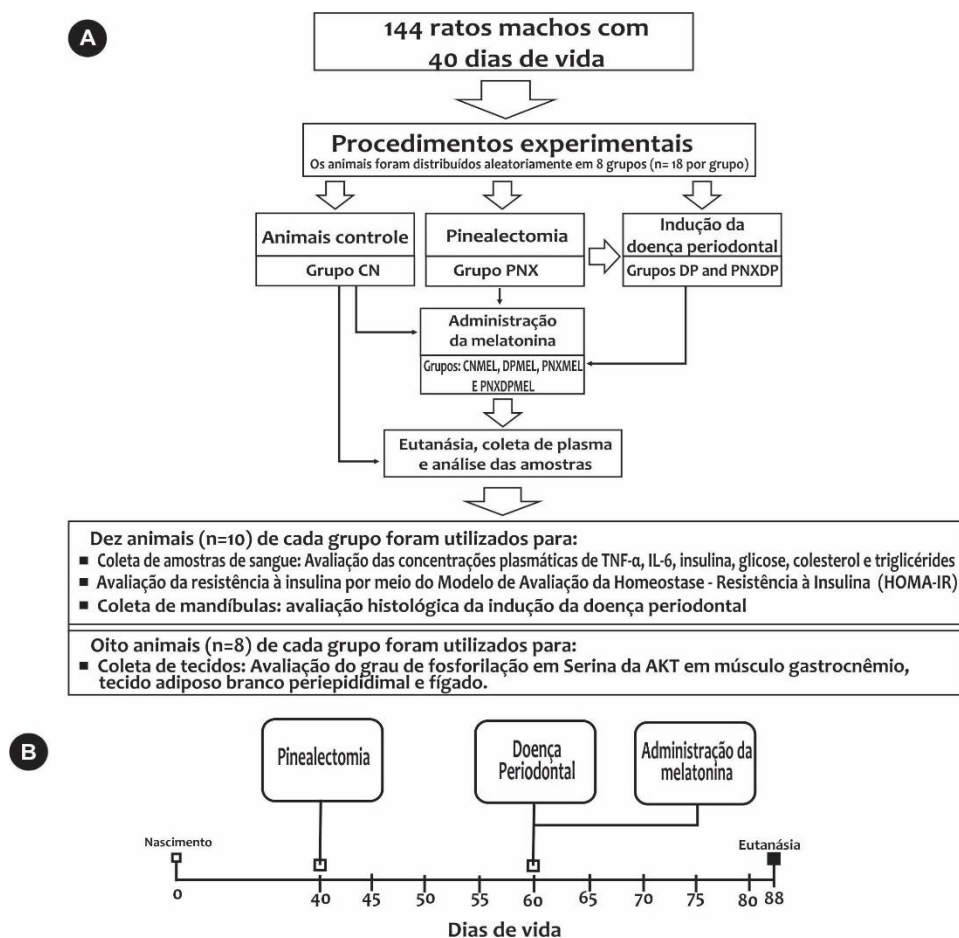
Foram utilizados 144 animais (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) machos com 40 dias de idade com peso aproximado de 200 g oriundos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA – Unesp. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e humidade com variação do ciclo claro-escuro de 12/12 horas (período claro iniciado às 7:00 h). Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética local de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal e sua implementação foi aprovada pelo CEUA - Protocolo FOA nº 00545-2016 (ANEXO-1).

3.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos (n = 18 por grupo) conforme Figura 1A: 1) controle (CN), 2) doença periodontal (DP); 3) pinealectomizados (PNX); 4) PNX com DP (PNXDP); 5) CN com MEL (CNMEL); 6) DP com MEL (DPMEL); 7) PNX com MEL (PNXMEL); 8) pinealectomizados com

doença periodontal e com ME (PNXDPMEL). Inicialmente os animais dos grupos com PNX foram submetidos a cirurgia de pinealectomia a partir de 40 dias de vida e os animais do grupo com DP aos 60 dias de vida foram submetidos à indução de DP. Concomitante a indução da DP, a administração tratamento com MEL foi iniciado, com duração de 28 dias (Figura 2B). A eutanásia dos animais ocorreu entre 19:00 e 20:00 horas. Foram coletadas amostras de sangue para avaliar as concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6, insulina, glicose, colesterol e triglicérides. As maxilas foram removidas e devidamente processadas para avaliação histológica da condição periodontal. Foram coletadas amostras de músculo gastrocnêmio (MG), tecido adiposo branco periepídimal (TAB) e fígado (FIG) para avaliação do grau de fosforilação em serina da AKT (Figura 2A).

Figura 2 - Diagrama de fluxo mostrando a sequência experimental, distribuição dos grupos e linha temporal dos procedimentos experimentais



Fonte: do Autor

Grupo controle (CN); Doença periodontal (DP); Pinealectomizados (PNX); PNX e com DP (PNXD); CN com melatonina-MEL (CNMEL); DP com MEL (DPMEL); PNX com MEL (PNXMEL); PNX, com DP e com MEL (PNXDPMEL).

3.3 Pinealectomia

Os animais dos grupos com PNx aos 40 dias de vida, foram anestesiados com associação de Cloridrato de Quetamina (10%, 80 mg/kg de peso corpóreo, intraperitoneal) e Xilazina (2%, 10 mg/kg de peso corpóreo, intraperitoneal). Após a anestesia, foi realizada uma tricotomia do topo da cabeça de cada animal, e o mesmo foi fixado em aparelho estereotáxico. Após a remoção do pelo sobre o escalpo e assepsia da pele da cabeça com solução de álcool iodado, foi realizado uma incisão longitudinal e o tecido subcutâneo foi afastado para visualização do lãmbda, realizando a raspagem das articulações fibrosas (tipo serrata) entre os ossos parietais e o osso interparietais expostos. Nesta região foi realizada uma osteotomia de 4,5 mm de diâmetro da calvária (com uma broca tipo “trefina” acoplada a um motor de baixa rotação). Após a retirada deste fragmento de osso, o seio venoso (região de intersecção do seio venoso sagital e transversal) foi visualizado, e com auxílio de uma pinça foi retirada a glândula pineal seguindo os parâmetros propostos por (HOFFMAN, REITER, 1965), que se localiza logo abaixo deste seio. Após a retirada desta glândula, o fragmento de osso retirado foi recolocado na sua posição inicial, sendo o animal removido do aparelho estereotáxico. Após a hemostasia, a pele foi suturada com fio de seda 4-0 (Seda Silk Trançada Ethicon-Johnson & Johnson). Como medida profilática após a cirurgia foi injetado 0,2 mL de um antibiótico de uso veterinário (associação de penicilina com estreptomicina 1.200.000 UI) por via intramuscular. Após a cirurgia, os ratos foram mantidos nas condições anteriormente citadas.

3.4 Doença Periodontal

Animais do grupo DP foram anestesiados pela associação de Ketamina (10%, 80 mg/kg, Ketamina Agener; Embu Guacu, SP, Brazil) e xilazina (2%, 10 mg/kg, Dorcipec; Vallee, Montes Claros, MG, Brazil) via intraperitoneal e a DP foi induzida por meio da adaptação de fio de seda número 4-0 (Seda Silk Trançada Ethicon-Johnson & Johnson) no sulco gengival dos primeiros molares inferiores bilateralmente (COLOMBO *et al.*, 2012).

3.5 Administração de melatonina

Os animais receberam MEL (Melatonin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) logo após a indução da DP por via oral solubilizada na água de beber no período escuro, iniciando as 19:00 h e encerrando as 7:00 h, na dosagem de 5 mg/Kg de peso corpóreo) baseado em estudos similares (JAWOREK *et al.*, 2010; DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; KARA *et al.*, 2013; KOSE *et al.*, 2016) durante 28 dias.

Dado o seu caráter anfílico, a MEL é capaz de adentrar na cavidade oral, difundindo no sangue por meio da saliva. Como grande parte da MEL permanece ligada à albumina sérica, a MEL salivar é de aproximadamente, um terço da quantidade de MEL presente no sangue (NAJEEB *et al.*, 2016). Devido as propriedades da MEL é possível administrá-la por diferentes vias. De acordo com a literatura, as vias mais comumente utilizadas para administração de MEL em animais de laboratório são a intraperitoneal (KARA *et al.*, 2013; KOSE *et al.*, 2016), oral (dissolvidas em água de beber) (HUSSAIN, 2007; AGIL *et al.*, 2012; RATHER *et al.*, 2015) e gavagem (WIECHMANN;CHIGNELL;ROBERTS, 2008; THOMAS *et al.*, 2016). No presente estudo, a administração de MEL foi realizada a partir de sua diluição na água de beber. Este meio pode ser considerado econômico e relativamente seguro e menos invasivo e estressante para os animais quando comparado as citadas acima (TURNER *et al.*, 2011).

A MEL (1 g) foi inicialmente diluída em 20 mL de etanol absoluto, adicionando 980 ml de água para um volume final de 1L. Após este procedimento, essa solução mãe de MEL foi diluída, seguindo a dosagem citada acima e quantificada de acordo com o peso dos animais e considerando um consumo de 30 mL de água durante o período escuro de acordo com a seguinte equação: $\text{Peso} \times \text{quantidade de água} = 300 \text{ mL} / \text{consumo de água} (30 \text{ mL}) \times \text{dose de melatonina} (5 \text{ mg/kg})$, posteriormente, essa solução foi colocada em bebedouros (cor âmbar). Os animais não tratados receberam uma solução veículo preparada com 20 mL de etanol absoluto dissolvido em 980 mL de água, adicionada nos bebedouros seguindo os mesmos critérios para os animais tratados.

3.6 Avaliação do consumo de ração e evolução da massa corporal dos animais

Os consumos de ração das caixas dos 8 grupos foram avaliados três vezes por semana pela diferença entre a quantidade de ração oferecida e a quantidade de sobra. Devido a disposição de cinco ratos por caixa, uma média de consumo semanal de ração foi extraída e transformada em gramas por 100 g de peso corpóreo. O peso corpóreo, de cada animal também foi aferido uma vez por semana. Houve comparação entre a média do peso inicial e final de cada grupo.

3.7 Colheita de sangue e tecidos

Os animais de todos os grupos foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5 mg/ 100 g peso corpóreo, intraperitoneal) e realizada laparotomia mediana, coletando-se sangue pela veia cava inferior. As amostras de sangue de cada grupo (n=10) foram transferidas para tubos de plástico heparinizados e mantidas a 4°C até a centrifugação a 800 g (4°C, 15 minutos). O plasma obtido foi armazenado a -70°C para avaliação: 1) das concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6); 2) glicemia, insulinemia, colesterolemia e triacilgliceridemia.

Para quantificar o grau de fosforilação em serina da AKT após estímulo insulínico os animais de cada grupo (N=10) foram anestesiados conforme descrito acima, realizando-se em seguida: laparotomia mediana, com retirada de amostras dos tecidos antes e após a injeção de 1,5 U.I de insulina regular (Humulin® ELLI LILLY and Company –Indianapolis IN, EUA) (i.v. veia porta) em tempos variáveis (30s para o fígado, 90s para o músculo esquelético gastrocnêmio e 120s para o tecido adiposo branco periepididimal). Após os experimentos, todos os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico (Tiopentax 3% - Cristália, Itapira/SP – 150 mg/Kg p. c., i. p.).

3.8 Concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6

As concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6 foram determinadas pelo método de ELISA com a utilização de kits de acordo com as instruções dos fabricantes. Os kits comerciais utilizados foram respectivamente Biosource 37

International, Camarillo, USA; BD Biosciences, San Diego, USA; Biovador, Heidelberg, Germany.

3.9 Determinação da glicemia (método de glicose-oxidase)

Esse é um método enzimático, específico para quantificação de glicose (Analisa Diagnóstica, São Paulo, Brasil). No método de glicose-oxidase a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase (GOD) gerando ácido glucônico e água oxigenada. O peróxido de hidrogênio, em presença de peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-amino fenazona (4-AF), dando origem a um cromógeno com máximo de absorção em 505nm de comprimento de onda. Devem ser consideradas as seguintes reações resumidas: $\text{glicose} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ácido glucônico} + \text{H}_2\text{O}_2$ $2 \text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-AF} + \text{fenol} \rightarrow 4 \text{ (p-benzoquinona monoimino) fenazona} + 4 \text{ H}_2\text{O}$.

3.10 Determinação de insulinemia

Para avaliação da insulinemia foi utilizado o método Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) com a utilização de kit, seguindo as instruções do fabricante. O kit comercial utilizado foi Sensitive Rat Insulin, SRI-13K, Millipore, St Charles, MO, EUA.

3.11 Análise do Índice HOMA-IR

A resistência à insulina foi avaliada por meio do índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance / Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina), calculado a partir da fórmula, como segue: $\text{HOMA - IR} = \text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum } (\mu\text{IU/mL}) / 22,5$ (BONORA *et al.*, 2000).

3.12 Determinação da concentração plasmática de colesterol total

Este é um método enzimático, específico para quantificação de colesterol total (CT) (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil). Neste método os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e pelo peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados

formando um composto róseo-avermelhado (antipirilquinonimina) que tem absorvidade máxima de 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

Para a dosagem de colesterol total (CT) foram utilizados 10µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente enzimático. Essa solução foi homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 500 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos

1. Colesterol (mg/dL) = (Absorbância do Teste ÷ Absorbância do Padrão) x 200;
2. Fator de calibração = 200 ÷ Absorbância do Padrão;
3. Colesterol (mg/dL) = Fator x Absorbância do Teste;
4. Colesterol (mmol/L) = mg/dL x 0,0259.

3.13 Determinação da concentração plasmática de triglicérides

Este é um método enzimático, específico para quantificação de triglicérides (TG) (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil). Na presente metodologia, os TG do plasma são hidrolisados pela lipase lipoproteica produzindo glicerol livre. Este é fosforilado pelo glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase, a qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase em presença de um reagente fenólico (p-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (quinoneimina), com máximo de absorbância em 505 nm.

Para a dosagem dos TG, foram utilizados 10µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente de cor. Essa solução foi bem homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 505 nm acertando o zero com o branco.

3.14 Determinação da concentração plasmática do Colesterol HDL

Este é um método enzimático, específico para quantificação de colesterol HDL (C-HDL) (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil). O conjunto Colesterol HDL é um sistema que se destina à separação do colesterol ligado

à fração HDL no plasma sanguíneo. A mistura ácido fosfotúngstico/cloreto de magnésio precipita os quilomicrons, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL) sem alterar a solubilidade das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Após centrifugação, recolhe-se o líquido sobrenadante que contém a fração HDL cujo conteúdo em colesterol (C-HDL) é determinado enzimaticamente. Para a dosagem do C-HDL foram utilizados 100µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente de cor. Essa solução foi homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 500 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos

1. Colesterol HDL (mg/dL) = (Absorbância do Teste ÷ Absorbância do Padrão) x 40;
2. Fator de calibração = 40 ÷ Absorbância do Padrão;
3. Colesterol HDL (mg/dL) = Absorbância do Teste x Fator.

3.15 Determinação da concentração plasmática de colesterol LDL e VLDL

Os valores do colesterol VLDL (C-VLDL) e colesterol LDL (C-LDL) foram obtidos pela equação de (FRIEDEWALD;LEVY;FREDRICKSON, 1972):

$$\text{VLDL (mg/dL)} = (\text{Triglicérides (mg/dL)} / 5);$$

$$\text{LDL (mg/dL)} = \text{Colesterol total} - (\text{Colesterol HDL} + \text{Colesterol VLDL}).$$

3.16 Avaliação do grau de fosforilação da AKT (Ser/473) em Músculo gastrocnêmio, fígado e tecido adiposo branco periepídimal

3.16.1 Preparação das amostras para “Western blotting”

Imediatamente após a extração, os tecidos foram homogeneizados em Polytron (24000 rpm durante 10 s) em 2 mL de tampão de extração (Tris 100 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; SDS 1%; NaF 100 mM; Pirofosfato de Na 10 mM; Ortovanadato de Na 10 mM; 0,1mg/mL Aprotinina) e mantidos em banho-maria (100 °C) durante 10 min, transferidos para gelo, e então centrifugados 16000 G durante 40 min (4°C). Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para determinação da concentração protéica pelo método de (LOWRY *et al.*, 1951) modificado e para estoque em tampão desenvolvido por Laemmli (azul de

bromofenol 0,1%; SDS 10 %; fosfato de sódio 1M pH 7,0; glicerol 50%; DTT 15%3.15.2 “Western blotting”

- **“SDS-PAGE” - (“Sodium Dodecil Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis”):**

A primeira etapa do Western blotting consistirá na submissão das amostras (185 µg de proteína em cada poço) a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Por meio deste método, foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades proteicas sejam perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações proteicas. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli (1970) e modificado por (GARFIN, 1990) , o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: o gel de “stacking” (3,39% T, 2,7% C - acrilamida 3,3%; bisacrilamida 0,09%; Tris 25 mM, pH 8,9; EDTA 2,0 mM; SDS 0,1%; TEMED 0.111%; Persulfato de amônio 0,27%) e o gel de resolução (6,16% T, 2,7% C - acrilamida 8%; bisacrilamida 0,16%; Tris 388 mM, pH=6,7; EDTA 2,1 mM; SDS 0,1%; TEMED 0.115%; Persulfato de amônio 0,17%; glicerol 10%).

Na montagem, o gel de resolução fica sob o gel de “stacking”, com orientação vertical, num sistema de câmaras que manterá as porções superiores e inferiores do gel em contato com um tampão de corrida (Tris 50 mM; glicina 375 mM; SDS 0,1%; EDTA 1,8 mM). No gel de “stacking” foram aplicadas as amostras solubilizadas em tampão de “Laemmli”. Imediatamente antes da aplicação, as amostras foram fervidas por quatro min. A eletroforese foi realizada em equipamento para minigel da Bio Rad (Mini-Protean, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA), que começa com a corrida no gel de “stacking” sob voltagem constante em 30 V até que ocorra o empacotamento da amostra, o que pôde ser observado na transição dos géis. Posteriormente foi aplicada voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante 2h. Juntamente com as amostras, sempre foi colocado um padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (Amersham ECL Full-Range Rainbow, GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA).

- **Transferência eletroforética**

Após a separação das frações protéicas no gel de poliacrilamida, foi feita a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE Healthcare Buckinghamshire, Germany). A transferência foi

realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 2h, a 4°C, utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,02%).

- **“Immunoblotting”**

Após a transferência eletroforética, foi iniciado o processo de imunodeteção de proteínas específicas (KRUGER, HAMMOND, 1988). A membrana de nitrocelulose foi, primeiramente, incubada na presença de solução bloqueadora (solução basal (SB), NaCl 150 mM; Tris 10 mM; "Tween" 20 0,02%; pH 7,2 - acrescida de 5% de leite desnatado - 0% de gordura) durante 2h à temperatura ambiente, e então, lavada com SB por três sessões de 10 min. Em seguida, a membrana foi incubada em solução (SB + 3% de leite desnatado) contendo os anticorpo anti pAKT1/2/3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA) e anticorpo antifosfo-serina-AKT (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA) . Posteriormente, foram realizadas três lavagens com solução basal, e as membranas foram incubadas durante 1h com segundo anticorpo contendo peroxidase de “horseradish” (“kit” de quimioluminescência -ECL- GE Healthcare Buckinghamshire, Germany). Novamente, foram realizadas 3 lavagens das membranas de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 min cada lavagem. Após estes procedimentos, as membranas foram levadas até uma câmara escura, onde foi adicionado 1 mL de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL), e foi incubado por 1 minuto. Por fim, foi drenado o excesso de reagente e a membrana de nitrocelulose foi exposta a filme de Raio-X (Hyperfilm ECL– GE Healthcare Buckinghamshire, Germany) dentro de um cassete para autorradiografia (GE Healthcare Buckinghamshire, Germany) à prova de luz, durante 10 min, em temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR) e solução fixadora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR). A intensidade dos "blots" foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se o programa Scion Image (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, USA).

3.17 Análise Histológica

As Hemi-mandíbulas (n=10) dos grupos CN, DP, PNXPDP, PNXPDPMEL e DPMEL foram dissecadas e fixadas em solução de formaldeído a 4% preparada em tampão fostato salino tamponado (0,1M, pH 7,4) por 24 horas, lavadas por 12 horas em água corrente, desmineralizadas em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA; 10%, Sigma-Aldrich) durante 60 dias e processadas histologicamente de maneira convencional. Os cortes histológicos semi-seriados (4 μ m) no eixo látero-lateral do primeiro molar inferior foram obtidas em micrótomo (RM2155, Leica Microsystems, BD, Wetzlar, Alemanha), coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio óptico (Axio Lab A1 Carl Zeiss, TH, Oberkochen, Alemanha) para análise dos tecidos periodontais e confirmação da presença de doença periodontal.

3.18 Análise estatística

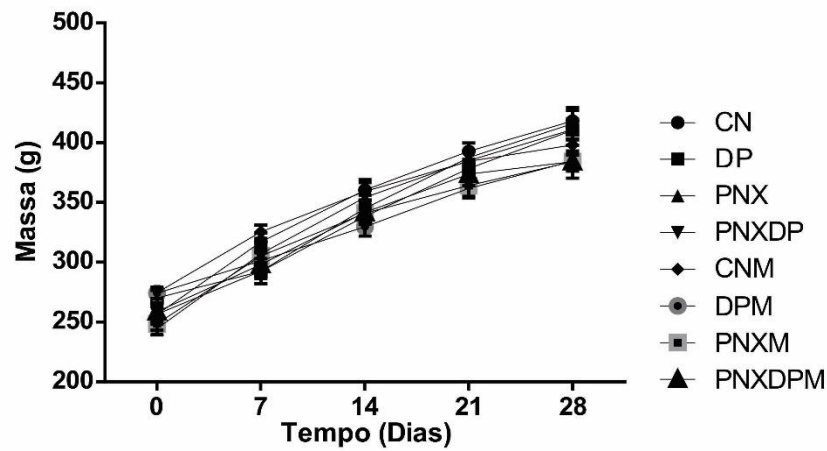
As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância ANOVA Three-way seguido pelo teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism (v.7 GraphPad Prism 7, GraphPad Software, Inc., CA, USA). Todos os valores foram apresentados como média \pm EPM e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da massa corpórea (g) e ingestão alimentar

Os resultados da massa corpórea e da ingestão alimentar dos grupos foram avaliados semanalmente a partir da indução da doença periodontal até o término dos experimentos. Não foram encontradas diferenças significativas na ingestão alimentar (Figura 3) e na massa corpórea (Figura 4) entre os grupos durante todo período experimental.

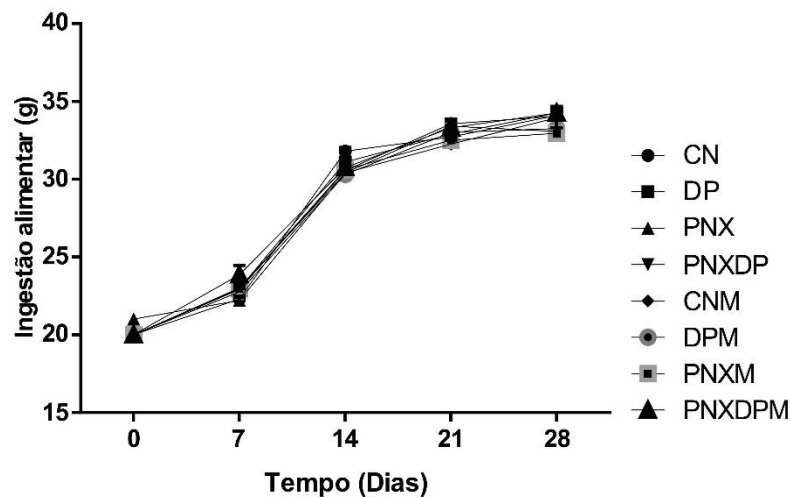
Figura 3 - Peso corpóreo dos ratos durante 28 dias



Fonte: do autor

Grupo controle (CN); Doença periodontal (DP); Pinealectomizados (PNX); PNX e com DP (PNXDP); CN com melatonina-MEL (CNMEL); DP com MEL (DPMEL); PNX com MEL (PNXMEL); PNX, com DP e com MEL (PNXDPMEL). Os valores são apresentados como média e \pm EPM de cada grupo (n =18).

Figura 4 - Ingestão alimentar dos ratos durante 28 dias



Fonte: do autor

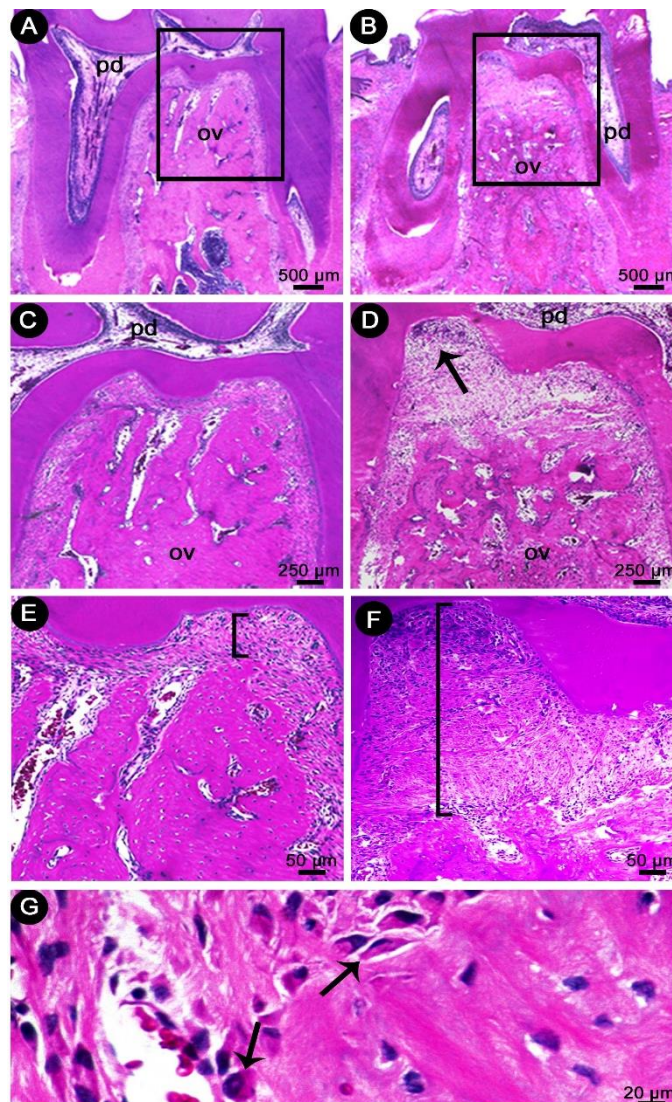
Grupo controle (CN); Doença periodontal (DP); Pinealectomizados (PNX); PNX e com DP (PNXDP); CN com melatonina-MEL (CNMEL); DP com MEL (DPMEL); PNX com MEL (PNXMEL); PNX, com DP e com MEL (PNXDPMEL). Os valores são apresentados como média e \pm EPM de cada grupo (n =18).

5.2 Avaliação histológica da doença periodontal

As análises histológicas mostraram o tecido periodontal de suporte do grupo CN com características de normalidade e ausência de reabsorção óssea (Figura

5A, C e E). Nos grupos com DP induzida foram observados comprometimento das estruturas de suporte dental com perda óssea alveolar evidente (Figura 5B, D e F) e presença de infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 5F). O osso do septo interradicular apresentou contornos irregulares (Figura 5F) com lacunas de reabsorção evidentes com presença de osteoclastos ativos (Figura 5G).

Figura 5 - Fotomicrografias em campo claro de corte histológico corados hematoxilina e eosina evidenciando a região de furca do primeiro molar inferior direito de animal do grupo controle (CN; A, C e E) e do grupo com doença periodontal induzida (DP; B, D e F) em diferentes aumentos (A e B = 50x; C e D = 100x; E e F=200x; G=400x)



Fonte: do Autor

Fotomicrografias em campo claro evidenciando a região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos dos grupos controle (CN) e com doença periodontal induzida (DP). Observar em A, C e E (grupo CN) o periodonto de suporte apresentando características de normalidade. Em B, D e F (grupo DP) observar a presença de infiltrado inflamatório (D, seta) e reabsorção do osso alveolar (F). Em E (grupo CN) e F (grupo DP) o colchete indica a distância da crista óssea alveolar em relação ao soalho a câmara pulpar, evidenciando a perda óssea alveolar. Em G (grupo DP) observar a presença de osteoclastos ativos (setas). Abreviaturas: ov, osso alveolar; pd, polpa dentária.

5.3 Glicemia, Insulinemia e HOMA-IR

Os valores da glicemia, insulinemia e do índice HOMA-IR podem ser observados na Tabela 1. Não foram encontradas diferenças significativas nos valores de glicemia entre os grupos estudados. Entretanto observou-se aumento significativo ($p < 0.05$) na insulinemia nos grupos DP, PNx e PNxDp quando comparados ao grupo CN. Os grupos PNxMEL, DPmEL e PNxDpMEL obtiveram diminuição significativa ($p < 0.05$) na insulinemia em relação aos grupos com MEL (DP, PNx e PNxDp). Não foram encontradas diferenças significativas neste parâmetro entre os grupos tratados com ME quando comparados com o grupo CN.

O índice HOMA-IR, calculado a partir desses parâmetros, foi significativamente maior ($p < 0.05$) nos grupos DP, PNx e PNxDp quando comparado ao grupo CN. A administração com MEL promoveu uma diminuição significativa ($p < 0.05$) no índice HOMA-IR quando comparados aos respectivos grupos sem MEL (DPmEL, PNxMEL e PNxDpMEL vs DP, PNx e PNxDp).

Tabela 1 - Glicemia (mmol/L), insulinemia (μ IU/mL) e índice HOMA-IR

GRUPOS	PARAMÉTROS		
	Glicose (mmol/L)	Insulina (μ IU/mL)	HOMA IR
CN	6,28 \pm 0,13 ^a	13,67 \pm 2,37 ^a	3,88 \pm 0,67 ^a
DP	7,17 \pm 0,25 ^a	31,08 \pm 4,84 ^b	9,89 \pm 1,41 ^b
PNx	6,83 \pm 0,13 ^a	29,27 \pm 3,18 ^b	8,89 \pm 0,88 ^b
PNxDp	6,73 \pm 0,15 ^a	27,59 \pm 2,15 ^b	8,25 \pm 0,60 ^b
CNMEL	6,25 \pm 0,30 ^a	12,68 \pm 1,82 ^a	3,51 \pm 0,45 ^a
DPmEL	6,48 \pm 0,32 ^a	12,18 \pm 1,46 ^a	3,65 \pm 0,51 ^a
PNxMEL	6,25 \pm 0,49 ^a	13,71 \pm 3,30 ^a	3,84 \pm 0,84 ^a
PNxDpMEL	6,48 \pm 0,27 ^a	13,30 \pm 2,43 ^a	3,90 \pm 0,69 ^a

Grupo controle (CN); Doença periodontal (DP); Pinealectomizados (PNx); PNx e com DP (PNxDp); CN com melatonina-MEL (CNMEL); DP com MEL (DPmEL); PNx com MEL (PNxMEL); PNx, com DP e com MEL (PNxDpMEL). Valores expressos como média \pm EPM ($p < 0.05$) $n = 10$, letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos

5.4 Avaliação da concentração plasmática de TNF- α e IL-6

Os valores das concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6 podem ser observados na Tabela 2. Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de IL-6 entre os grupos estudados.

Os grupos DP, PNX e PNXDP obtiveram aumento significativo ($p < 0.05$) das concentrações plasmáticas de TNF- α quando comparados ao grupo CN. Os grupos PNXMEL, DPMEL e PNXDPMEL obtiveram diminuição significativa das concentrações plasmáticas de TNF- α quando comparados aos grupos sem MEL (PNX, DP e PNXDP). Não foram encontradas diferenças significativas neste parâmetro entre os grupos tratados com MEL quando comparados com o grupo CN.

Tabela 2 - Concentrações plasmática de TNF- α (pg/mL) e IL-6 (pg/mL)

GRUPO	PARÂMETROS	
	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
CN	7,14 \pm 0,30 ^a	24,42 \pm 0,65 ^a
DP	10,42 \pm 0,83 ^b	24,05 \pm 1,18 ^a
PNX	10,31 \pm 0,48 ^b	22,81 \pm 0,58 ^a
PNXDP	9,86 \pm 0,32 ^b	22,84 \pm 0,54 ^{1a}
CNMEL	6,86 \pm 0,51 ^a	25,27 \pm 1,48 ^a
DPMEL	6,28 \pm 0,67 ^a	24,54 \pm 1,06 ^a
PNXMEL	7,35 \pm 0,54 ^a	23,85 \pm 1,13 ^a
PNXDPMEL	5,59 \pm 0,60 ^a	23,43 \pm 0,318 ^a

Grupo controle (CN); Doença periodontal (DP); Pinealectomizados (PNX); PNX e com DP (PNXDP); CN com melatonina-MEL (CNMEL); DP com MEL (DPMEL); PNX com MEL (PNXMEL); PNX, com DP e com MEL (PNXDPMEL). Valores expressos como média \pm EPM ($p < 0.05$) $n = 10$, letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos.

5.5 Avaliação das concentrações plasmática triglicérides, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e colesterol VLDL

Os valores das concentrações plasmáticas CT, TG, C-HDL, C-LDL e C-VLDL são mostrados na Tabela 3. Os grupos PNX e PNXDP obtiveram aumento significativo ($p < 0,05$) nas concentrações plasmáticas de CT, TG, C-LDL e C-VLDL quando comparado ao grupo CN. Houve diminuição significativa ($p < 0,05$) nas concentrações plasmáticas de TG nos grupos PNXMEL e PNXDPMEL em relação aos seus respectivos grupos sem MEL (PNX e PNXDP).

Os grupos PNX e PNXDP mostraram diminuição significativa ($p < 0,05$) nas concentrações plasmáticas de C-HDL quando comparados ao grupo CN. Os grupos PNXMEL e PNXDPMEL mostraram aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração plasmática do C-HDL quando comparados aos respectivos grupos sem MEL (PNX e PNXDP). Não foram observadas diferenças significativas no perfil lipídico nos grupos tratados com MEL e DP quando comparados ao grupo CN.

Tabela 3 - Concentrações plasmáticas em mg/dl de Triglicérides, Colesterol Total, Colesterol-HDL, Colesterol-LDL e Colesterol-VLDL

PARÂMETROS					
GRUPOS	Triglicérides (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	Colesterol HDL (mg/dL)	Colesterol LDL (mg/dL)	Colesterol VLDL (mg/dL)
CN	54,05±12,03 ^a	41,63±3,91 ^a	30,43±1,10 ^a	15,18±2,52 ^a	10,6±0,77 ^a
DP	101,50±10,44 ^a	39,01±2,54 ^a	27,83±1,17 ^a	21,5±2,23 ^a	11,35±1,44 ^a
PNX	173,50±6,64 ^b	50,84±3,46 ^b	17,05±2,64 ^b	36,95±2,20 ^b	19,39±2,11 ^b
PNXDP	187,90±3,79 ^b	49,42±4,78 ^b	15,48±2,96 ^b	39,52±1,14 ^b	25,86±1,32 ^b
CNMEL	63,82±13,55 ^a	38,48±2,74 ^a	28,47±1,91 ^a	17,19±1,34 ^a	12,96±1,64 ^a
DPMEL	48,05±14,33 ^a	43,64±1,06 ^a	29,1±1,29 ^a	11,63±1,46 ^a	13,14±1,44 ^a
PNXMEL	56,55±18,55 ^a	31,23±2,21 ^a	26,61±1,80 ^a	11,66±3,59 ^a	10,44±1,61 ^a
PNXDPMEL	31,56±10,13 ^a	29,4±3,05 ^a	24,34±0,84 ^a	9,813±2,07 ^a	13,31±2,51 ^a

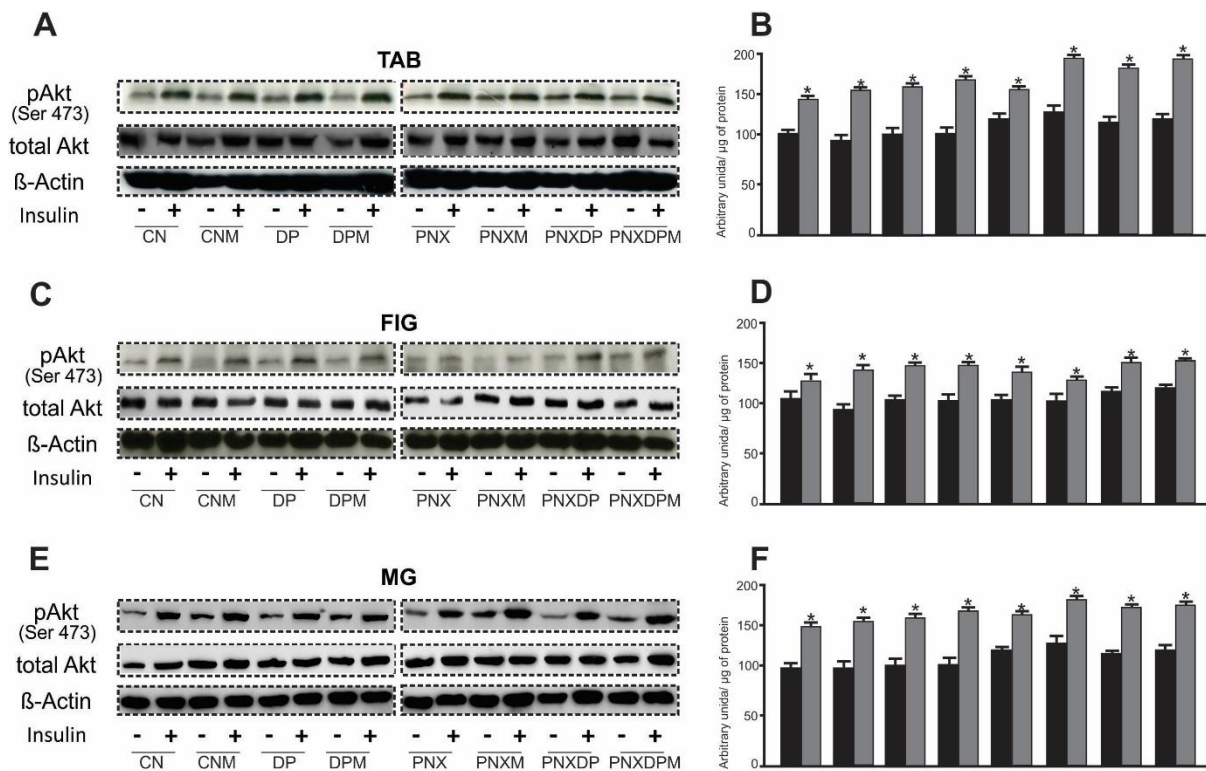
Grupo controle (CN); Doença periodontal (DP); Pinealectomizados (PNX); PNX e com DP (PNXDP); CN tratado com melatonina-ME (CNM); DP e tratado com ME (DPM); PNX e tratados com ME (PNXM); PNX, com DP e tratados com ME (PNXDPM). Valores expressos como média ± EPM ($p < 0.05$) $n = 10$, letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos

5.6 Avaliação do grau de fosforilação em serina da AKT em músculo gastrocnêmio, fígado e tecido adiposo branco periepídídimo

O grau de fosforilação em serina da AKT, após a estimulação da insulina, aumentou significativamente em relação ao basal (sem estímulo insulínico) em todos os grupos nos tecidos TAB FIG e MG (Figura 6).

Não houve diferenças significativas no grau de fosforilação da serina de AKT, após a estimulação da insulina, entre os grupos nos tecidos analisados (Figura 6).

Figura 6 - Avaliação do grau de fosforilação em Serina da AKT antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em tecido adiposo, fígado e músculo gastrocnêmio



Grupo controle (CN); Doença periodontal (DP); Pinealectomizados (PNX); PNX e com DP (PNXDP); CN com melatonina-MEL (CNMEL); DP com MEL (DPMEL); PNX com MEL (PNXMEL); PNX, com DP e com MEL (PNXDPMEL). Em A (tecido adiposo-TAB), C (Fígado-FIG) e E (músculo-MG), autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μg). β-actina foi utilizada como controle. Em B (TAB), D (FIG) e F (MG) valores do grau de fosforilação em serina da AKT, respectivamente, expressos em unidades arbitrárias, valores expressos como média ± EPM (p < 0.05) (n = 8).

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que em ratos a DP isolada e associada a pinealectomia (referindo-se aos grupos DP e PNXDP) promoveram resistência à insulina, aumento dos níveis plasmáticos de TNF-α e nenhuma alteração na fosforilação da AKT. No entanto, apenas os grupos PNX e PNXDP apresentaram alteração no perfil lipídico. A administração da MEL mostrou um papel protetor em todos os parâmetros alterados analisados.

Os resultados do presente estudo demonstram que não houve diferença significativa na massa corporal e na ingestão alimentar nos grupos avaliados. Esses dados estão de acordo com outros estudos que utilizaram modelos experimentais de

inflamações orais tais como lesão periapical (PEREIRA *et al.*, 2017) e de DP (SHIRAKASHI *et al.*, 2013; MATTERA *et al.*, 2016). O fato de não termos observado diferença indica que os animais se alimentaram normalmente e a indução da DP não comprometeu a ingestão alimentar. Adicionalmente, a pinealectomia também não afetou o peso corporal dos animais. Estes resultados estão de acordo com diversos estudos na literatura que também demonstraram inalteração no peso corpóreo de animais pinealectomizados (NIR *et al.*, 1972; CASTRO *et al.*, 2002; ALONSO-VALE *et al.*, 2004).

No presente estudo foi constatado hiperinsulinemia e resistência à insulina, conforme demonstrado pelo índice HOMA-IR, nos grupos DP, PNX e PNXDP (Tabela 1). Contudo, não foi observada nenhuma alteração na glicemia de jejum. Este resultado da glicemia corrobora os estudos de Diaz,Blazquez (1986); Lima;Reis;Lima (2001), porém com relação aos valores de insulinemia, estes pesquisadores não observaram diferença no parâmetro em animais PNX e CN. Estudos na literatura também demonstraram que pinealectomia promove resistência à insulina (DIAZ,BLAZQUEZ, 1986; LIMA *et al.*, 1998; ZANQUETTA *et al.*, 2003).

Sabendo-se que a MEL é o hormônio sintetizado e liberado pela glândula pineal, vários estudos tem sido efetuados sobre os efeitos benéficos da suplementação com ME sobre a homeostase da glicose (NISHIDA *et al.*, 2002; PRUNET-MARCASSUS *et al.*, 2003; XUE-DONG WAN, 2013; KOSE *et al.*, 2016). Kose *et al.* (2016) observaram que uma única dose diária de ME (10 mg/Kg p.c., via intraperitoneal), durante 14 dias, promoveu diminuição da glicemia tanto em ratos diabéticos como diabéticos com DP.

Agil *et al.* (2012) investigaram os efeitos da ingestão de MEL (10 mg/Kg/dia, na água de beber, durante 42 dias) sobre a homeostase da glicose em ratos diabéticos obesos, e também observaram que a administração oral de MEL desempenhou um efeito anti-hiperglicêmico devido à melhora na função das células β pancreáticas. Um estudo randomizado duplo-cego controlado realizado por Hussain *et al.* (2006) demonstrou que pacientes diabéticos tratados com doses orais diárias de MEL (10 mg) e suplementados com acetato de zinco (50 mg), mostraram uma melhora no controle glicêmico pós-prandial e diminuição do nível de hemoglobina glicada.

Conforme mencionado anteriormente, a presença de processos inflamatórios pode prejudicar a ação da insulina. Estudos do nosso laboratório

demonstraram que diferentes modelos de inflamação oral estão relacionados com alteração na transdução do sinal insulínico e resistência à insulina (COLOMBO *et al.*, 2012; ASTOLPHI *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2017).

Os mecanismos envolvidos na ligação entre DP e resistência à insulina não estão totalmente esclarecidos. Contudo, estudos sugerem que citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, o TNF- α podem inibir a transdução do sinal insulínico (COLOMBO *et al.*, 2012; ASTOLPHI *et al.*, 2013) e diminuir a expressão do transportador de glicose GLUT4 e outras moléculas envolvidas na ação da insulina. (Uysal *et al.*, 1997; Mingrone *et al.*, 2002). Interessantemente, Plomgaard *et al.* (2005) constataram que a infusão de TNF- α em humanos saudáveis induz a resistência à insulina no músculo esquelético, por aumentar a fosforilação de p70 S6 quinase, quinase-1/2 regulada por sinal extracelular, e c-Jun NH terminal quinase, concomitante com aumento de serina e reduzida fosforilação de tirosina do substrato receptor de insulina-1. Por outro lado, a administração de anticorpo anti-TNF- α ou o knockout genético do receptor do TNF- α aumenta a sensibilidade periférica à insulina no músculo e no fígado (DA ROCHA *et al.*, 2014).

Os resultados do presente trabalho mostram que a pinealectomia pode implicar em aumento das concentrações plasmáticas de TNF- α (Tabela 2). Fernandes *et al.* (2006) no intuito de averiguar se o TNF- α poderia interferir na síntese de MEL pela GP, estudaram o efeito do TNF- α na transcrição do gene da enzima aralkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) que codifica a enzima chave na biossíntese de melatonina. Após as extrações das glândulas pineais, estas foram cultivadas em um meio com TNF- α (30ng/mL, 30 min a 48 h) e estimuladas por cinco horas com norepinefrina. Foi observado que a transcrição de AA-NAT foi inibida pelo TNF- α . Entretanto, esta inibição foi transitória e uma nova pré-incubação com TNF- α por mais de 24 h não obteve efeito detectável. Com isso, pode-se apontar a hipótese de que o aumento noturno da MEL é prejudicado no início de uma resposta inflamatória e restaurado durante o encerramento de uma resposta aguda ou numa patologia inflamatória crônica.

Markus *et al.* (2007) aventaram que a ausência de MEL noturna pode permitir a migração leucocitária completa e, esta por sua vez, inicia uma produção local de MEL, atuando como agente anti-inflamatório e eliminador de radicais livres (MARKUS *et al.*, 2007). Sabe-se que linfócitos humanos cultivados sintetizam e liberam

grandes quantidades de MEL que, além de seu efeito endócrino, poderia atuar como uma substância intracrina, autócrina e / ou parácrina para a coordenação local da resposta imune (CARRILLO-VICO *et al.*, 2004; CARRILLO-VICO *et al.*, 2005).

Outros modelos experimentais também demonstraram os benefícios da MEL na redução do TNF- α . Li *et al.* (2015) observaram em ratos com pulpíte aguda uma redução significativa das concentrações plasmáticas de TNF- α após administração de MEL (10 mg/Kg, via intraperitoneal, durante cinco dias). Rodriguez *et al.* (2007) também observaram redução significativa das concentrações plasmáticas desta citocina em camundongos machos e fêmeas com senescência acelerada ou resistentes a senescência quando submetidos ao tratamento crônico com MEL (10 mg/Kg, na água de beber, durante, durante 10 meses). Oztekin *et al.* (2006) também observaram, após administração de MEL (3 mg/ kg, via intraperitoneal, durante 4 semanas), em ratas ovariectomizadas e pinealectomizadas, menor concentração plasmática de TNF- α . Interessantemente, os resultados do presente estudo também evidenciaram que o tratamento com MEL nos grupos DP, PNX e PNXDP foi capaz de normalizar a concentração desta citocina.

A MEL também é apontada como inibidora do fator nuclear kappa B (NF- κ B) por impedir sua ligação ao DNA, evitando a sua translocação para o núcleo. Isto, por sua vez, reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, além de inibir a expressão de moléculas de adesão e suprimir a síntese das enzimas que geram prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) (SZCZEPANIK, 2007).

Além disso, a MEL demonstrou ser um removedor de radicais livres nos últimos anos. Como outros derivados do indol e metabólitos do triptofano, esta possui propriedades redox devido à presença de um sistema de anéis aromáticos ricos em elétrons, o que permite que este hormônio funcione como doador de elétrons (ALLEGRA *et al.*, 2003).

Paralelamente estudos demonstraram a capacidade da MEL de eliminar radicais livres derivados do oxigênio, como hidroxila (MATUSZAK;RESZKA;CHIGNELL, 1997; ROBERTS;HU;WISHART, 1998; POEGGELER *et al.*, 2002) e radicais peroxil (PIERI *et al.*, 1994; LIVREA *et al.*, 1997). Outros os efeitos protetores da MEL foram relatados na oxidação in vitro de LDL (DUELL *et al.*, 1998; WALTERS-LAPORTE *et al.*, 1998; BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 2002). Porém, dentre os estudos citados acima, Duell

et al. (1998) demonstraram que a atividade sequestradora de radicais de MEL requer concentrações de ordem suprafisiológicas.

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem a ação direta da MEL sobre as ROS e espécies reativas de nitrogênio, Horstman;Wrona;Dryhurst (2002) atribuem sua ação antioxidante aos metabólitos que são gerados durante o estresse oxidativo. A degradação da MEL em N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikynuramina e N-acetil-5-metoxikynunamina eleva a ação de enzimas antioxidantes e inibe a ação de mediadores pró- inflamatórios (SILVA *et al.*, 2004; MAYO *et al.*, 2005).

O desequilíbrio entre os sistemas antioxidante e pró-oxidante, com predomínio da ação oxidante e dano consequente, resulta no estresse oxidativo e promove alterações como peroxidação lipídica, fragmentação de DNA e oxidação de diferentes moléculas, levando à morte celular, dislipidemia, eventos tromboembólicos, DM e neoplasias (FRANÇA *et al.*, 2013).

Com relação às concentrações plasmáticas de IL-6 não foi observada nenhuma diferença entre os grupos avaliados. Os estudos que investigaram as concentrações plasmáticas de IL-6 em modelos de DP são contraditórios, conforme descritos a seguir. Takahashi *et al.* (1994) em sua pesquisa com pacientes saudáveis ou com periodontite moderada ou avançada, constataram que não houve diferenças entre essas populações nas concentrações IL-6; no soro e em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico. Em contrapartida, Bretz *et al.* (2005); Ross *et al.* (2010) realizaram estudos com humanos com DP e evidenciaram aumento das concentrações plasmáticas de IL-6. Nestes três últimos estudos, não foi possível saber o horário em que os pacientes foram analisados, e isso tem grande importância, pois Bauer *et al.* (1994) constataram que a secreção sérica de IL-6 apresenta uma periodicidade com valores baixos durante o dia e máximos nos últimos dois terços da noite. Por outro lado, Lissoni *et al.* (1998) avaliaram os níveis de IL-6 em seis intervalos de tempo (8 h,12 h,16 h,20 h,1h e 4h), em humanos. Constataram que os valores médios de IL-6 foram maiores durante o período de luz do dia, no entanto não houve diferença significativa em relação ao período escuro.

As citocinas inflamatórias, como TNF- α e a IL-6, interferem no metabolismo lipídico. Um grande número de pesquisas sugeriu que os efeitos do TNF- α sobre o metabolismo lipídico incluem principalmente cinco aspectos: (1) suprime a captação de ácidos graxos livres (AGL) e promove a lipogênese; (2) induz lipólise; (3) inibe a

actividade das enzimas relacionadas com o metabolismo dos lipídeos; (4) regula o metabolismo do colesterol; (5) regula outras adipocinas derivadas de adipócitos (CHEN *et al.*, 2009). Em relação ao IL-6, vários relatos descreveram a função desta citocina no metabolismo lipídico no tecido adiposo, músculo esquelético e fígado. As concentrações intersticiais de IL-6 no tecido adiposo são aproximadamente 100 vezes maiores que no plasma, implicando uma importante função reguladora e parácrina nesse tecido com propriedades lipolíticas e aumento da lipólise do tecido adiposo e dos adipócitos “*in vitro*” (TRUJILLO *et al.*, 2004).

O papel fisiológico da IL-6 vem sendo estudado principalmente no contexto da resposta inflamatória de fase aguda, embora haja evidências que a IL-6 também desempenha um papel central na patogênese de doenças crônicas (MAGGIO *et al.*, 2006). Na inflamação aguda, a IL-6 promove a expansão e ativação de células T (DIEHL *et al.*, 2000), diferenciação de células B (URASHIMA *et al.*, 1996) e modula a síntese de proteínas de fase aguda como a proteína C-reativa (WEINHOLD, RÜTHER, 1997; HOLVEN *et al.*, 2006). Estudos sugerem que uma das principais funções da IL-6 é a autolimitação da resposta inflamatória, suprimindo a produção de TNF- α e IL-1 β (SCHINDLER *et al.*, 1990; XING *et al.*, 1998).

Na literatura as ações da IL-6 nos processos inflamatórios são contraditórias. Em modelos experimentais de inflamação crônica, como artrite induzida por colágeno (ALONZI *et al.*, 1998) e colite murina (YAMAMOTO *et al.*, 2000) a IL-6 atua como agente pró-inflamatório, enquanto em modelos de inflamação aguda a IL-6 exibe um papel anti-inflamatório (XING *et al.*, 1998), 2006). Por outro lado, níveis elevados de IL-6 são frequentemente observados em pacientes com doenças inflamatórias crônicas, como por exemplo a artrite reumatoide (CHUNG *et al.*, 2011).

Tanto o grupo com DP como os grupos PNx e PNxDP apresentaram um aumento das concentrações plasmáticas de TNF- α , entretanto, somente nos grupos PNxs apresentaram alteração no perfil lipídico (Tabela 3). Na literatura, estudos apontam uma relação entre periodontite e a lipídemia em humanos (LOSCHKE *et al.*, 2000; KATZ; CHAUSHU; SHARABI, 2001; KATZ *et al.*, 2002; GOLPASAND HAGH *et al.*, 2014). Entretanto, Machado; Quirino; Nascimento (2005); Hamissi; Shahsavarani; Hamissi (2011) observaram que na população estudada a partir da metodologia empregada, a DP independentemente da intensidade, não mostrou relação estatisticamente significativa com a lipídemia. Salienta-se, esses estudos apresentaram diferentes

modelos, tamanhos de amostras e diferentes metodologias para o diagnóstico de DP e análise do perfil lipídico (MACHADO *et al.*, 2005).

A administração de MEL, no presente trabalho, mostrou papel protetor em todos os parâmetros alterados analisados nos grupos PNx e PNxDp. Corroborando os dados deste estudo, outras pesquisas evidenciaram que a MEL melhora o metabolismo das lipoproteínas envolvidas na lipidemia (NISHIDA *et al.*, 2002; PRUNET-MARCASSUS *et al.*, 2003; SENER *et al.*, 2004; HUSSAIN, 2007; AGIL *et al.*, 2011; XUE-DONG WAN, 2013). Mizrak *et al.* (2004) também observaram que a pinealectomia induziu aumento nos níveis séricos de colesterol e que o tratamento com ME (4 mg/Kg, intraperitoneal, durante quatro dias) promoveu redução desse parâmetro. Diante desses achados pressupomos que alguns dos efeitos benéficos da MEL sejam mediados pela diminuição da peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica constitui em uma reação em cadeia dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares, gerando radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas, sendo que esses danos celulares se encontram aumentados nos indivíduos obesos, e predispõem às comorbidades como hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, eventos tromboembólicos, DM, além de neoplasias (FRANÇA *et al.*, 2013).

O presente trabalho é o primeiro em que se estudou em conjunto, a pinealectomia e a DP e demonstrou que a reposição hormonal com MEL em ratos com DP promove um aumento na sensibilidade a insulina. Observou-se que tanto a pinealectomia quanto a DP promoveram alterações na insulinemia, RI, TNF- α e inalteração na fosforilação da AKT. Entretanto a DP não promoveu sinergismo com pinealectomia nas alterações evidenciadas nos grupos PNxDp. As dislipidemias foram encontradas somente em animais PNxs, demonstrando papel importante da MEL no perfil lipídico. Ademais, a suplementação com MEL promoveu uma melhora em todos os parâmetros alterados analisados, tanto no grupo DP, como PNxs. Como o trabalho foi realizado em ratos, sugerimos que o mesmo seja feito em humanos, no intuito de averiguar a importância da administração de MEL em pacientes com DP e trabalhadores noturnos.

Referências

- AGIL, A.; NAVARRO-ALARCON, M.; RUIZ, R.; ABUHAMADAH, S.; EL-MIR, M. Y.; VAZQUEZ, G. F. Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. **J Pineal Res**, v. 50, n. 2, p. 207-12, Mar 2011.
- AGIL, A.; ROSADO, I.; RUIZ, R.; FIGUEROA, A.; ZEN, N.; FERNANDEZ-VAZQUEZ, G. Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. **J Pineal Res**, v. 52, n. 2, p. 203-10, Mar 2012.
- AL-KHALILI, L.; BOUZAKRI, K.; GLUND, S.; LONNQVIST, F.; KOISTINEN, H. A.; KROOK, A. Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. **Mol Endocrinol**, v. 20, n. 12, p. 3364-75, Dec 2006.
- AL-MHBASHY, H. M. H.; HUSSAIN, S. A.; NUMAN, N. A. M.; SAED, M. A. The Effects of Melatonin On The Oxidative Stress, Protein Glycation, Microalbuminuria and Lipid Profile In Type II Diabetes Mellitus. **Iraq Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 6, Jun 2006.
- ALDABAL, L.; BAHAMMAM, A. S. Metabolic, Endocrine, and Immune Consequences of Sleep Deprivation. **Open Respir Med J**, v. 5, p. 31-43, Mar 2011.
- ALLEGRA, M.; REITER, R. J.; TAN, D. X.; GENTILE, C.; TESORIERE, L.; LIVREA, M. A. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. **J Pineal Res**, v. 34, n. 1, p. 1-10, Jan 2003.
- ALONSO-VALE, M. I.; BORGES-SILVA, C. N.; ANHE, G. F.; ANDREOTTI, S.; MACHADO, M. A.; CIPOLLA-NETO, J.; LIMA, F. B. Light/dark cycle-dependent metabolic changes in adipose tissue of pinealectomized rats. **Horm Metab Res**, v. 36, n. 7, p. 474-9, Jul 2004.
- ALONZI, T.; FATTORI, E.; LAZZARO, D.; COSTA, P.; PROBERT, L.; KOLLIAS, G.; DE BENEDETTI, F.; POLI, V.; CILIBERTO, G. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. **J Exp Med**, v. 187, n. 4, p. 461-8, Feb 1998.
- ASTOLPHI, R. D.; CURBETE, M. M.; COLOMBO, N. H.; SHIRAKASHI, D. J.; CHIBA, F. Y.; PRIETO, A. K.; CINTRA, L. T.; BOMFIM, S. R.; ERVOLINO, E.; SUMIDA, D. H. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. **J Endod**, v. 39, n. 5, p. 648-52, May 2013.
- BALCI YUCE, H.; KARATAS, O.; AYDEMIR TURKAL, H.; PIRIM GORGUN, E.; OCAKLI, S.; BENLI, I.; CAYLI, S. The Effect of Melatonin on Bone Loss, Diabetic Control, and Apoptosis in Rats With Diabetes With Ligature-Induced Periodontitis. **J Periodontol**, v. 87, n. 4, p. e35-43, Apr 2016.
- BALTO, K.; SASAKI, H.; STASHENKO, P. Interleukin-6 Deficiency Increases Inflammatory Bone Destruction. **Infect Immun**, v. 69, n. 2, p. 744-50, Jan 2001.

BAUER, J.; HOHAGEN, F.; EBERT, T.; TIMMER, J.; GANTER, U.; KRIEGER, S.; LIS, S.; POSTLER, E.; VODERHOLZER, U.; BERGER, M. Interleukin-6 serum levels in healthy persons correspond to the sleep-wake cycle. **Clin Investig**, v. 72, n. 4, p. 315, Mar 1994.

BENSHOFF, H. M.; BRAINARD, G. C.; ROLLAG, M. D.; LYNCH, G. R. Suppression of pineal melatonin in *Peromyscus leucopus* by different monochromatic wavelengths of visible and near-ultraviolet light (UV-A). **Brain Res**, v. 420, n. 2, p. 397-402, Sep 1987.

BLETSA, A.; BERGGREEN, E.; BRUDVIK, P. Interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha expression during the early phases of orthodontic tooth movement in rats. **Eur J Oral Sci**, v. 114, n. 5, p. 423-9, Oct 2006.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; CHEVE, G.; GOZZO, A.; TAILLEUX, A.; GUILLOZ, V.; CAISEY, S.; TEISSIER, E.; FRUCHART, J. C.; DELATTRE, J.; JORE, D.; LESIEUR, D.; DURIEZ, P.; GARDES-ALBERT, M. Melatonin related compounds inhibit lipid peroxidation during copper or free radical-induced LDL oxidation. **J Pineal Res**, v. 33, n. 2, p. 109-17, Sep 2002.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; COLLIN, F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. **Toxicology**, v. 278, n. 1, p. 55-67, Nov 2010.

BONORA, E.; TARGHER, G.; ALBERICHE, M.; BONADONNA, R. C.; SAGGIANI, F.; ZENERE, M. B.; MONAUNI, T.; MUGGEO, M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v. 23, n. 1, p. 57-63, Jan 2000.

BRAINARD, G. C.; HANIFIN, J. P.; GREESON, J. M.; BYRNE, B.; GLICKMAN, G.; GERNER, E.; ROLLAG, M. D. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. **J Neurosci**, v. 21, n. 16, p. 6405-12, Aug 2001.

BRAINARD, G. C.; RICHARDSON, B. A.; KING, T. S.; REITER, R. J. The influence of different light spectra on the suppression of pineal melatonin content in the Syrian hamster. **Brain Res**, v. 294, n. 2, p. 333-9, Mar 1984.

BRASIL, M. D. S. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. v. 1, p. 116, 2012.

BRETZ, W. A.; WEYANT, R. J.; CORBY, P. M.; REN, D.; WEISSFELD, L.; KRITCHEVSKY, S. B.; HARRIS, T.; KURELLA, M.; SATTERFIELD, S.; VISSER, M.; NEWMAN, A. B. Systemic inflammatory markers, periodontal diseases, and periodontal infections in an elderly population. **J Am Geriatr Soc**, v. 53, n. 9, p. 1532-7, Sep 2005.

CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J. R.; ABREU, P.; LARDONE, P. J.; GARCIA-MAURINO, S.; REITER, R. J.; GUERRERO, J. M. Evidence of melatonin synthesis

by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **Faseb j**, v. 18, n. 3, p. 537-9, Mar 2004.

CARRILLO-VICO, A.; LARDONE, P. J.; FERNANDEZ-SANTOS, J. M.; MARTIN-LACAVE, I.; CALVO, J. R.; KARASEK, M.; GUERRERO, J. M. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 2, p. 992-1000, Feb 2005.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 4, p. 419-425, Aug 2002.

CASTRO, A. C. S.; QUEIROZ, G. F.; NOGUEIRA, J. C.; COIMBRA, C. C.; REIS, A. M.; MARUBAYASHI, U.; YAMASAKI, K. Effect of pinealectomy, adrenalectomy, pinealectomy plus adrenalectomy upon the quantification of spermatogenic cells of adult rats. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 54, n. 3, p. 267-272, Jun 2002.

CHEN, X.; XUN, K.; CHEN, L.; WANG, Y. TNF-alpha, a potent lipid metabolism regulator. **Cell Biochem Funct**, v. 27, n. 7, p. 407-16, Oct 2009.

CHUNG, S. J.; KWON, Y. J.; PARK, M. C.; PARK, Y. B.; LEE, S. K. The correlation between increased serum concentrations of interleukin-6 family cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis patients. **Yonsei Med J**, v. 52, n. 1, p. 113-20, Jan 2011.

COLOMBO, N. H.; SHIRAKASHI, D. J.; CHIBA, F. Y.; COUTINHO, M. S.; ERVOLINO, E.; GARBIN, C. A.; MACHADO, U. F.; SUMIDA, D. H. Periodontal disease decreases insulin sensitivity and insulin signaling. **J Periodontol**, v. 83, n. 7, p. 864-70, Jul 2012.

CUTANDO, A.; MONTERO, J.; GOMEZ-DE DIEGO, R.; FERRERA, M. J.; LOPEZ-VALVERDE, A. Effect of topical application of melatonin on serum levels of C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in patients with type 1 or type 2 diabetes and periodontal disease. **J Clin Exp Dent**, v. 7, n. 5, p. e628-33, Dec 2015.

DA ROCHA, A. F.; LIBONI, T. F.; KURAUTI, M. A.; DE SOUZA, C. O.; MIKSZA, D. R.; MOREIRA, C. C.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Tumor necrosis factor alpha abolished the suppressive effect of insulin on hepatic glucose production and glycogenolysis stimulated by cAMP. **Pharmacol Rep**, v. 66, n. 3, p. 380-5, Jun 2014.

DE OLIVEIRA, A. C.; ANDREOTTI, S.; FARIAS TDA, S.; TORRES-LEAL, F. L.; DE PROENCA, A. R.; CAMPANA, A. B.; DE SOUZA, A. H.; SERTIE, R. A.; CARPINELLI, A. R.; CIPOLLA-NETO, J.; LIMA, F. B. Metabolic disorders and adipose tissue insulin responsiveness in neonatally STZ-induced diabetic rats are improved by long-term melatonin treatment. **Endocrinology**, v. 153, n. 5, p. 2178-88, May 2012.

DIAZ, B.; BLAZQUEZ, E. Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. **Horm Metab Res**, v. 18, n. 4, p. 225-9, Apr 1986.

DIEHL, S.; ANGUITA, J.; HOFFMEYER, A.; ZAPTON, T.; IHLE, J. N.; FIKRIG, E.; RINCON, M. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. **Immunity**, v. 13, n. 6, p. 805-15, Dec 2000.

DIJK, D. J.; ARCHER, S. N. Light, Sleep, and Circadian Rhythms: Together Again. **PLoS Biol**, v. 7, n. 6, Jun 2009.

DUELL, P. B.; WHEATON, D. L.; SHULTZ, A.; NGUYEN, H. Inhibition of LDL oxidation by melatonin requires supraphysiologic concentrations. **Clin Chem**, v. 44, n. 9, p. 1931-6, Sep 1998.

DUFFY, J. F.; CZEISLER, C. A. Effect of Light on Human Circadian Physiology. **Sleep Med Clin**, v. 4, n. 2, p. 165-77, Jun 2009.

FAVERO, G.; FRANCESCHETTI, L.; BONOMINI, F.; RODELLA, L. F.; REZZANI, R. Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammasome Activation. **Int J Endocrinol**, v. 2017, Oct 2017.

FERNANDES, P. A.; CECON, E.; MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S. Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. **J Pineal Res**, v. 41, n. 4, p. 344-50, Nov 2006.

FERNANDO, M. R.; REYES, J. L.; IANNUZZI, J.; LEUNG, G.; MCKAY, D. M. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94188, Apr 2014.

FRANÇA, B. K.; MELO ALVES, M. R.; SILVEIRA SOUTO, F. M.; TIZIANE, L.; FREIRE BOAVENTURA, R.; GUIMARÃES, A.; ALVES, A. Lipid peroxidation and obesity: Methods to measure the oxidative stress of the obese patient's plasma Author links open. **GE Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, Sep 2013.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, n. 6, p. 499-502, Jun 1972.

GARFIN, D. E. One-dimensional gel electrophoresis. **Methods Enzymol**, v. 182, p. 425-41, Jan 1990.

GLUND, S.; DESHMUKH, A.; LONG, Y. C.; MOLLER, T.; KOISTINEN, H. A.; CAIDAHL, K.; ZIERATH, J. R.; KROOK, A. Interleukin-6 directly increases glucose metabolism in resting human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 56, n. 6, p. 1630-7, Jun 2007.

GOLPASAND HAGH, L.; ZAKAVI, F.; HAJIZADEH, F.; SALEKI, M. The Association Between Hyperlipidemia and Periodontal Infection. **Iran Red Crescent Med J**, v. 16, n. 12, Dec 2014.

- GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v. 74, n. 3, p. 391-401, Mar 2003.
- GULCIN, I.; BUYUKOKUROGLU, M. E.; OKTAY, M.; KUFREVIOGLU, O. I. On the in vitro antioxidative properties of melatonin. **J Pineal Res**, v. 33, n. 3, p. 167-71, Oct 2002.
- HAMISSI, J.; SHAHSAVARANI, M. T.; HAMISSI, H. A Comparison of Serum Lipid Profile between Periodontitis Patients and Healthy Individuals. **Iran Red Crescent Med J**, v. 13, n. 4, p. 283-4, Apr 2011.
- HEO, J. I.; YOON, D. W.; YU, J. H.; KIM, N. H.; YOO, H. J.; SEO, J. A.; KIM, S. G.; CHOI, K. M.; BAIK, S. H.; CHOI, D. S. Melatonin improves insulin resistance and hepatic steatosis through attenuation of alpha-2-HS-glycoprotein. **J Pineal Res**, p. e12493, Apr 2018.
- HOFFMAN, R. A.; REITER, R. J. Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. **Anat Rec**, v. 153, n. 1, p. 19-21, Sep 1965.
- HOLVEN, K. B.; AUKRUST, P.; RETTERSTOL, K.; HAGVE, T. A.; MORKRID, L.; OSE, L.; NENSETER, M. S. Increased levels of C-reactive protein and interleukin-6 in hyperhomocysteinemic subjects. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 66, n. 1, p. 45-54, Jul 2006.
- HORSTMAN, J. A.; WRONA, M. Z.; DRYHURST, G. Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical. **Bioorg Chem**, v. 30, n. 5, p. 371-82, Oct 2002.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 107, n. 2, p. 119-25, Jul 1999.
- HUSSAIN, S. A. Effect of melatonin on cholesterol absorption in rats. **J Pineal Res**, v. 42, n. 3, p. 267-71, Apr 2007.
- HUSSAIN, S. A.; KHADIM, H. M.; KHALAF, B. H.; ISMAIL, S. H.; HUSSEIN, K. I.; SAHIB, A. S. Effects of melatonin and zinc on glycemic control in type 2 diabetic patients poorly controlled with metformin. **Saudi Med J**, v. 27, n. 10, p. 1483-8, Oct 2006.
- JAWOREK, J.; ZWIRSKA-KORCZALA, K.; SZKLARCZYK, J.; NAWROT-PORABKA, K.; LEJA-SZPAK, A.; JAWOREK, A. K.; TOMASZEWSKA, R. Pinealectomy aggravates acute pancreatitis in the rat. **Pharmacol Rep**, v. 62, n. 5, p. 864-73, Sep-Oct 2010.
- KADHIM, H. M.; ALJAWAD, F. H.; HASHIM, H. M. Effects of Atorvastatin and Melatonin on Glycemic Control and Lipid Profile in Type 2 Diabetic Patients. **Iraqi Journal of Medical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 6, Oct 2014.

KARA, A.; AKMAN, S.; OZKANLAR, S.; TOZOGLU, U.; KALKAN, Y.; CANAKCI, C. F.; TOZOGLU, S. Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. **Free Radic Biol Med**, v. 55, p. 21-6, Feb 2013.

KARAASLAN, C.; SUZEN, S. Antioxidant properties of melatonin and its potential action in diseases. **Curr Top Med Chem**, v. 15, n. 9, p. 894-903, Feb 2015.

KASUGA, M.; KARLSSON, F. A.; KAHN, C. R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, v. 215, n. 4529, p. 185-7, Jan 1982.

KATZ, J.; CHAUSHU, G.; SHARABI, Y. On the association between hypercholesterolemia, cardiovascular disease and severe periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 28, n. 9, p. 865-8, Sep 2001.

KATZ, J.; FLUGELMAN, M. Y.; GOLDBERG, A.; HEFT, M. Association between periodontal pockets and elevated cholesterol and low density lipoprotein cholesterol levels. **J Periodontol**, v. 73, n. 5, p. 494-500, May 2002.

KAYAL, R. A. The Role of Osteoimmunology in Periodontal Disease. **Biomed Res Int**, v. 2013, Aug 2013.

KOSE, O.; ARABACI, T.; KARA, A.; YEMENOGLU, H.; KERMEN, E.; KIZILDAG, A.; GEDIKLI, S.; OZKANLAR, S. Effects of Melatonin on Oxidative Stress Index and Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats With Periodontitis. **J Periodontol**, v. 87, n. 5, p. e82-90, May 2016.

KRUGER, N. J.; HAMMOND, J. B. Molecular Comparison of Pyrophosphate- and ATP-Dependent Fructose 6-Phosphate 1-Phosphotransferases from Potato Tuber. **Plant Physiol**, v. 86, n. 3, p. 645-8, Mar 1988.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.

LEE, W.; LIM, S. S.; KIM, B.; WON, J. U.; ROH, J.; YOON, J. H. Relationship between long working hours and periodontitis among the Korean workers. **Sci Rep**, v. 7, n. 7967, p. 9, Aug 2017.

LI, J. G.; LIN, J. J.; WANG, Z. L.; CAI, W. K.; WANG, P. N.; JIA, Q.; ZHANG, A. S.; WU, G. Y.; ZHU, G. X.; NI, L. X. Melatonin attenuates inflammation of acute pulpitis subjected to dental pulp injury. **Am J Transl Res**, v. 7, n. 1, p. 66-78, Mar 2015.

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.; CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am J Physiol**, v. 275, n. 6 Pt 1, p. E934-41, Dec 1998.

- LIMA, L. M. B. D.; REIS, L. C. D.; LIMA, M. A. D. Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats. **Rev. Bras. Biol.**, v. 61, n. 2, p. 333-340, May 2001.
- LISSONI, P.; ROVELLI, F.; BRIVIO, F.; BRIVIO, O.; FUMAGALLI, L. Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. **Nat Immun**, v. 16, n. 1, p. 1-5, Oct 1998.
- LIVREA, M. A.; TESORIERE, L.; D'ARPA, D.; MORREALE, M. Reaction of melatonin with lipoperoxyl radicals in phospholipid bilayers. **Free Radic Biol Med**, v. 23, n. 5, p. 706-11, Jan 1997.
- LOSCHKE, W.; KARAPETOW, F.; POHL, A.; POHL, C.; KOCHER, T. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 8, p. 537-41, Aug 2000.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.
- MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Front Neuroendocrinol**, v. 25, n. 3-4, p. 177-95, Sep-Dec 2004.
- MACHADO, A. C.; QUIRINO, M. R.; NASCIMENTO, L. F. Relation between chronic periodontal disease and plasmatic levels of triglycerides, total cholesterol and fractions. **Braz Oral Res**, v. 19, n. 4, p. 284-9, Oct-Dec 2005.
- MAGGIO, M.; GURALNIK, J. M.; LONGO, D. L.; FERRUCCI, L. Interleukin-6 in Aging and Chronic Disease: A Magnificent Pathway. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 61, n. 6, p. 575-84, Jun 2006.
- MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S.; FERNANDES, P. A.; CECON, E. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 3-4, p. 126-33, Dec 2007.
- MARTIN, M.; MACIAS, M.; ESCAMES, G.; LEON, J.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. **Faseb j**, v. 14, n. 12, p. 1677-9, Sep 2000.
- MARTINEZ, D.; LENZ MDO, C.; MENNA-BARRETO, L. Diagnosis of circadian rhythm sleep disorders. **J Bras Pneumol**, v. 34, n. 3, p. 173-80, Mar 2008.
- MATTERA, M. S.; CHIBA, F. Y.; MOTA, M. S.; PEREIRA, R. F.; CHAVES NETO, A. H.; SALZEDAS, L. M.; SCARAMELE, N. F.; SILVA, C. A.; OKAMOTO, M. M.; MACHADO, U. F.; SUMIDA, D. H. Maternal periodontitis decreases plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle of adult offspring. **Life Sci**, v. 148, p. 194-200, Mar 2016.

MATUSZAK, Z.; RESZKA, K.; CHIGNELL, C. F. Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. **Free Radic Biol Med**, v. 23, n. 3, p. 367-72, Jan 1997.

MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; TAN, D. X.; HARDELAND, R.; LEON, J.; RODRIGUEZ, C.; REITER, R. J. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. **J Neuroimmunol**, v. 165, n. 1-2, p. 139-49, Aug 2005.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 2, p. 135-45, Nov 2001.

MENDES, S. S.; MARTINO, M. M. F. D. Shift work: overall health state related to sleep in nursing workers. **Rev. esc. enferm. USP**, v. 46, n. 6, p. 1471-1476, Dec 2012.

MIZRAK, B.; PARLAKPINAR, H.; ACET, A.; TURKOZ, Y. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on rat hearts. **Acta Histochem**, v. 106, n. 1, p. 29-36, Feb 2004.

NAJEEB, S.; KHURSHID, Z.; ZOHAIB, S.; ZAFAR, M. S. Therapeutic potential of melatonin in oral medicine and periodontology. **Kaohsiung J Med Sci**, v. 32, n. 8, p. 391-6, Aug 2016.

NIR, I.; SHANI, J.; LOCKER, D.; SULMAN, F. G. Effect of light and pinealectomy on body weight and tibia cartilage of female rats. **Life Sciences**, v. 11, n. 1, Part 2, p. 41-49, Jan 1972.

NISHIDA, S.; SEGAWA, T.; MURAI, I.; NAKAGAWA, S. Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Delta-5 desaturase activity. **J Pineal Res**, v. 32, n. 1, p. 26-33, Jan 2002.

NUNES, D. M.; MOTA, R. M.; MACHADO, M. O.; PEREIRA, E. D.; BRUIN, V. M.; BRUIN, P. F. Effect of melatonin administration on subjective sleep quality in chronic obstructive pulmonary disease. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 10, p. 926-31, Oct 2008.

OLIVEIRA, L. N. Resistência Insulínica. 2016. Disponível em: <
<https://lucasnicolau.com/?v=publicacoes&id=10> >. Acesso em: 13 Feb 2018.

OZTEKIN, E.; MOGULKOC, R.; BALTACI, A. K.; TIFTIK, A. M. The influence of estradiol and progesterone and melatonin supplementation on TNF-alpha levels in ovariectomized and pinealectomized rats. **Acta Biol Hung**, v. 57, n. 3, p. 275-81, Sep 2006.

PANDI-PERUMAL, S. R.; SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G. J.; CARDINALI, D. P.; PÖEGGELER, B.; HARDELAND, R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? **Febs j**, v. 273, n. 13, p. 2813-38, Jul 2006.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 9, n. 2-4, p. 89-109, Apr 1998.

PEREIRA, R. F.; CINTRA, L. T. A.; TESSARIN, G. W. L.; CHIBA, F. Y.; DE LIMA COUTINHO MATTERA, M. S.; SCARAMELE, N. F.; TSOSURA, T. V. S.; ERVOLINO, E.; DE OLIVEIRA, S. H. P.; SUMIDA, D. H. Periapical Lesions Increase Macrophage Infiltration and Inflammatory Signaling in Muscle Tissue of Rats. **J Endod**, v. 43, n. 6, p. 982-988, Jun 2017.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. **J Physiol Pharmacol**, v. 57 Suppl 10, p. 43-51, Nov 2006.

PIERI, C.; MARRA, M.; MORONI, F.; RECCHIONI, R.; MARCHESELLI, F. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. **Life Sci**, v. 55, n. 15, p. PI271-6, Jan 1994.

PLOMGAARD, P.; BOUZAKRI, K.; KROGH-MADSEN, R.; MITTENDORFER, B.; ZIERATH, J. R.; PEDERSEN, B. K. Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 2939-45, Oct 2005.

POEGGELER, B.; THUERMAN, S.; DOSE, A.; SCHOENKE, M.; BURKHARDT, S.; HARDELAND, R. Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. **J Pineal Res**, v. 33, n. 1, p. 20-30, Aug 2002.

PRUNET-MARCASSUS, B.; DESBAZEILLE, M.; BROS, A.; LOUCHE, K.; DELAGRANGE, P.; RENARD, P.; CASTEILLA, L.; PENICAUD, L. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5347-52, Dec 2003.

PU, M. Physiological response properties of cat retinal ganglion cells projecting to suprachiasmatic nucleus. **J Biol Rhythms**, v. 15, n. 1, p. 31-6, Feb 2000.

RATHER, Z. A.; CHOWTA, M. N.; BOLUMBU, G.; RAKESH, K. B. Evaluation of acute effects of melatonin on ethanol drinking in ethanol naive rats. **Indian J Pharmacol**, v. 47, n. 4, p. 383-7, Jul-Aug 2015.

ROBERTS, J. E.; HU, D. N.; WISHART, J. F. Pulse radiolysis studies of melatonin and chloromelatonin. **J Photochem Photobiol B**, v. 42, n. 2, p. 125-32, Feb 1998.

RODRIGUEZ, M. I.; ESCAMES, G.; LOPEZ, L. C.; LOPEZ, A.; GARCIA, J. A.; ORTIZ, F.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. **J Pineal Res**, v. 42, n. 3, p. 272-9, Apr 2007.

- ROSS, J. H.; HARDY, D. C.; SCHUYLER, C. A.; SLATE, E. H.; HUANG, Y. Expression of periodontal interleukin-6 protein is increased across patients with neither periodontal disease nor diabetes, patients with periodontal disease alone and patients with both diseases. **J Periodontal Res**, v. 45, n. 5, p. 688-94, Oct 2010.
- ROSSOMANDO, E. F.; KENNEDY, J. E.; HADJIMICHAEL, J. Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. **Arch Oral Biol**, v. 35, n. 6, p. 431-4, Jan 1990.
- SAGHIZADEH, M.; ONG, J. M.; GARVEY, W. T.; HENRY, R. R.; KERN, P. A. The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 97, n. 4, p. 1111-6, Feb 1996.
- SAH, S. P.; SINGH, B.; CHOUDHARY, S.; KUMAR, A. Animal models of insulin resistance: A review. **Pharmacol Rep**, v. 68, n. 6, p. 1165-1177, Dec 2016.
- SHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 5, p. 878-88, Feb 2011.
- SCHINDLER, R.; MANCILLA, J.; ENDRES, S.; GHORBANI, R.; CLARK, S. C.; DINARELLO, C. A. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. **Blood**, v. 75, n. 1, p. 40-7, Jan 1 1990.
- SENER, G.; BALKAN, J.; CEVIKBAS, U.; KEYER-UYSAL, M.; UYSAL, M. Melatonin reduces cholesterol accumulation and prooxidant state induced by high cholesterol diet in the plasma, the liver and probably in the aorta of C57BL/6J mice. **J Pineal Res**, v. 36, n. 3, p. 212-6, Apr 2004.
- SENN, J. J.; KLOVER, P. J.; NOWAK, I. A.; MOONEY, R. A. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. **Diabetes**, v. 51, n. 12, p. 3391-9, Dec 2002.
- SENN, J. J.; KLOVER, P. J.; NOWAK, I. A.; ZIMMERS, T. A.; KONIARIS, L. G.; FURLANETTO, R. W.; MOONEY, R. A. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 16, p. 13740-6, Apr 2003.
- SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. **Semin Cell Dev Biol**, v. 10, n. 1, p. 19-29, Feb 1999.
- SHILAN, M.; HASANI-RANJBAR, S.; ABDOLLAHI, M. The Mechanisms of Positive Effects of Melatonin in Dyslipidemia: A Systematic Review of Animal and Human Studies. **Interntional Jornal of Pharmacology**, v. 8, n. 6, p. 15, Jan 2012.
- SHIRAKASHI, D. J.; LEAL, R. P.; COLOMBO, N. H.; CHIBA, F. Y.; GARBIN, C. A.; JARDIM, E. G., JR.; ANTONIALI, C.; SUMIDA, D. H. Maternal periodontal disease in rats decreases insulin sensitivity and insulin signaling in adult offspring. **J Periodontol**, v. 84, n. 3, p. 407-14, Mar 2013.

SILVA, S. O.; RODRIGUES, M. R.; XIMENES, V. F.; BUENO-DA-SILVA, A. E.; AMARANTE-MENDES, G. P.; CAMPA, A. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. **J Neuroimmunol**, v. 156, n. 1-2, p. 146-52, Nov 2004.

SONG, I. S.; HAN, K.; PARK, Y. M.; JI, S.; JUN, S. H.; RYU, J. J.; PARK, J. B. Severe Periodontitis Is Associated with Insulin Resistance in Non-abdominal Obese Adults. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 101, n. 11, p. 4251-4259, Nov 2016.

SOUSA-NETO, J. A.; CASTRO, B. F. D. Melatonina, ritmos biológicos e sono - uma revisão da literatura. **Rev Bras Neurol**, v. 44, n. 1, p. 5-11, Mar 2008.

STEHLE, J. H.; SAADE, A.; RAWASHDEH, O.; ACKERMANN, K.; JILG, A.; SEBESTENY, T.; MARONDE, E. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. **J Pineal Res**, v. 51, n. 1, p. 17-43, Aug 2011.

SUN, Y.; SHU, R.; LI, C. L.; ZHANG, M. Z. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. **J Periodontol**, v. 81, n. 10, p. 1488-96, Oct 2010.

SZCZEPANIK, M. Melatonin and its influence on immune system. **J Physiol Pharmacol**, v. 58 Suppl 6, p. 115-24, Dec 2007.

TAKAHASHI, K.; TAKASHIBA, S.; NAGAI, A.; TAKIGAWA, M.; MYOUKAI, F.; KURIHARA, H.; MURAYAMA, Y. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. **J Periodontol**, v. 65, n. 2, p. 147-53, Feb 1994.

THOMAS, A. P.; HOANG, J.; VONGBUNYONG, K.; NGUYEN, A.; RAKSHIT, K.; MATVEYENKO, A. V. Administration of Melatonin and Metformin Prevents Deleterious Effects of Circadian Disruption and Obesity in Male Rats. **Endocrinology**, v. 157, n. 12, p. 4720-4731, Dec 2016.

THOMSON, C. A.; MORROW, K. L.; FLATT, S. W.; WERTHEIM, B. C.; PERFECT, M. M.; RAVIA, J. J.; SHERWOOD, N. E.; KARANJA, N.; ROCK, C. L. Relationship between sleep quality and quantity and weight loss in women participating in a weight-loss intervention trial. **Obesity (Silver Spring)**, v. 20, n. 7, p. 1419-25, Jul 2012.

TILG, H.; TREHU, E.; ATKINS, M. B.; DINARELLO, C. A.; MIER, J. W. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. **Blood**, v. 83, n. 1, p. 113-8, Jan 1994.

TRUJILLO, M. E.; SULLIVAN, S.; HARTEN, I.; SCHNEIDER, S. H.; GREENBERG, A. S.; FRIED, S. K. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 11, p. 5577-82, Nov 2004.

TURNER, P. V.; BRABB, T.; PEKOW, C.; VASBINDER, M. A. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 50, n. 5, p. 600-13, Sep 2011.

URASHIMA, M.; CHAUHAN, D.; HATZIYANNI, M.; OGATA, A.; HOLLENBAUGH, D.; ARUFFO, A.; ANDERSON, K. C. CD40 ligand triggers interleukin-6 mediated B cell differentiation. **Leuk Res**, v. 20, n. 6, p. 507-15, Jun 1996.

WALTERS-LAPORTE, E.; FURMAN, C.; FOUQUET, S.; MARTIN-NIZARD, F.; LESTAVEL, S.; GOZZO, A.; LESIEUR, D.; FRUCHART, J. C.; DURIEZ, P.; TEISSIER, E. A high concentration of melatonin inhibits in vitro LDL peroxidation but not oxidized LDL toxicity toward cultured endothelial cells. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 32, n. 4, p. 582-92, Oct 1998.

WEINHOLD, B.; RÜTHER, U. Interleukin-6-dependent and -independent regulation of the human C-reactive protein gene. **Biochem J**, v. 327, n. Pt 2, p. 425-9, Oct 1997.

WIECHMANN, A. F.; CHIGNELL, C. F.; ROBERTS, J. E. Influence of Dietary Melatonin on Photoreceptor Survival in the Rat Retina: An Ocular Toxicity Study. **Exp Eye Res**, v. 86, n. 2, p. 241-50, Feb 2008.

WIENER, R. C. Relationship of Routine Inadequate Sleep Duration and Periodontitis in a Nationally Representative Sample. **Sleep Disord**, v. 2016, Jan 2016.

WILCOX, G. Insulin and Insulin Resistance. **Clin Biochem Rev**, v. 26, n. 2, p. 19-39, May 2005.

XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G.; BAUMANN, H.; JORDANA, M.; LEI, X. F.; ACHONG, M. K. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **J Clin Invest**, v. 101, n. 2, p. 311-20, Jan 15 1998.

XUE-DONG WAN, S.-Q. L., SHOU-MIN XI, JIAN-FEI WANG, YAN-CHUN GUO, XI-MING WANG. Long-term melatonin administration improves glucose homeostasis and insulin resistance state in high-fat-diet fed rats. **Cent. Eur. J. Biol**, v. 8, n. 10, p. 958–967, Oct 2013 2013.

YAMAMOTO, M.; YOSHIZAKI, K.; KISHIMOTO, T.; ITO, H. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. **J Immunol**, v. 164, n. 9, p. 4878-82, May 2000.

ZANQUETTA, M. M.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; CIPOLLA-NETO, J.; MACHADO, U. F. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. **J Pineal Res**, v. 35, n. 3, p. 141-8, Oct 2003.

ANEXOS

ANEXO A- Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA
 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Efeitos da reposição hormonal na sinalização insulínica de ratos pinealectomizados com doença periodontal com ou sem suplementação de melatonina**", Processo FOA nº 00545-2016, sob responsabilidade de Dóris Hissako Sumida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Dezembro de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 14 de Dezembro de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 14 de Janeiro de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Effects of hormone replacement on insulin signaling of pinealectomized rats with periodontal disease with or without melatonin supplementation**", Protocol FOA nº 00545-2016, under the supervision of Dóris Hissako Sumida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 14, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 14, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 14, 2019.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
 Coordenador da CEUA
 CEUA Coordinator

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

ANEXO B

**COMPROVANTE DE ENVIO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO QUALIS CAPES B1 OU
SUPERIOR (CBII)**

ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA JOURNAL OF PINEAL RESERCH (QUALIS A1)

13/03/2018

Email – Rodrigo Martins – Outlook

Journal of Pineal Research - Manuscript ID JPI-OM-03-18-0089

Journal of Pineal Research <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Ter 13/03/2018, 16:41

Para:rodrigoms13@hotmail.com <rodrigoms13@hotmail.com>;

13-Mar-2018

Dear Ms dos Santos:

Your manuscript entitled "Melatonin promotes reduction in TNF- α levels and improvement in lipid profile and insulin sensitivity in pinealectomized rats with periodontal disease" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Pineal Research.

Your manuscript ID is JPI-OM-03-18-0089.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/jpi> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jpi>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Pineal Research.

Sincerely,
Journal of Pineal Research Editorial Office