

**unesp**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus Araçatuba  
Departamento de Ciências Básicas**

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**FERNANDO MARANI**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA NA  
REMODELAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM RATOS  
PINEALECTOMIZADOS COM DOENÇA PERIODONTAL**

**Araçatuba**

**2018**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus Araçatuba  
Departamento de Ciências Básicas

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**FERNANDO MARANI**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA NA  
REMODELAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM RATOS  
PINEALECTOMIZADOS COM DOENÇA PERIODONTAL**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Titular Doris Hissako Sumida.

**Araçatuba**

**2018**

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

M311e Marani, Fernando.  
Efeitos da suplementação com melatonina na remodelação  
óssea alveolar em ratos pinealectomizados com doença  
periodontal / Fernando Marani. - Araçatuba, 2018  
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientadora: Profa. Doris Hissako Sumida

1. Melatonina 2. Doenças periodontais 3. Inflamação  
4. Reabsorção óssea 5. Glândula pineal 5. I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

## Dados curriculares

**Nascimento:** 14/10/1982

**Filiação:** Valdair Marani

Maria Syrlei Siviero Marani

**2001/2004:** Graduação em Educação Física – Universidade Estadual de Londrina – UEL Londrina-PR

**2007/2009:** Especialização em Treinamento Personalizado e Musculação pela Fundação Educacional de Andradina, FEA, Andradina-SP

**2012/2013:** Especialização em Aprendizagem Motora pela Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo-SP

**2016/2018:** Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível Mestrado, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia/SBFis – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba/FOA – Araçatuba – SP.

## ***Dedicatória***

*À Deus por sempre me conceder sabedoria, força, proteção e coragem em todas as etapas de minha vida.*

*Às mulheres da minha vida, esposa e filha, pelo apoio incondicional e constante.*

*Aos meus pais e irmãos pelo apoio e incentivo constante em todos os momentos da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente em minha vida.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade em realizar o Curso de Mestrado em Ciências Fisiológicas.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Doris Hissako Sumida, pela oportunidade e confiança em mim depositada, pelos ensinamentos transmitidos e toda sua orientação acadêmica, profissional e de vida ao longo do mestrado.

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.

À Profa. Adj. Cristina Antoniali Silva coordenadora do multicêntrico pelo excelente trabalho na sua gestão que foram imprescindíveis para o andamento do nosso programa de pós graduação.

À professora Dr<sup>a</sup> Rita Cássia Menegati Dornelles pelos pareceres semestrais do projeto.

Ao professor Dr<sup>o</sup> Edilson Ervolino pelas análises histológicas e imunistoquímicas.

Aos amigos do laboratório Rodrigo Martins dos Santos, Fernando Yamamoto Chiba, Renato Felipe Pereira, Maria Sara de Lima Coutinho Mattera, Thais Verônica Tsosoura, Bianca Belardi, Beatriz Costa, Jhenifer Haiane, Mariana Caioá, Renan Akira, Mariana Lopes Benites e Ângelo César Fernandes Jacomossi pelos bons momentos vividos e toda ajuda prestada.

Agradecimento especial a Rodrigo Martins dos Santos pela amizade, companheirismo e toda ajuda durante esta etapa. Acredito que todo esse processo ficou mais suave com sua parceria. Sou grato por todos os momentos vividos e por sua amizade. Obrigado!

Ao Gestter Willian Lattari Tessarin pela amizade, companheirismo e ajuda, das quais viabilizaram boa parte deste trabalho, sem dizer da felicidade pela sua amizade.

Ao Dr. José Sinésio da Silva Junior por sua amizade e todo conhecimento transmitido, e acolhimento em sua residência em São Paulo. Muito obrigado meu amigo.

À Melise Jacon Peres Ueno por toda sua atenção, ajuda, paciência e ensinamentos no processamentos e análises da Micro-CT. Muito obrigado!

À Marjorie Oliveira Gallinari pela ajuda e ensinamentos em cortes histológicos. Muito obrigado!

A todos os professores e alunos do departamento de Ciências Básicas pelo agradável e enriquecedor convívio.

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 disposição em ajudar a todos.

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, encorajando-me a vencer os obstáculos.

***Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos.***

***“Albert Einstein”***



MARANI, F. **EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA NA REMODELAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM RATOS PINEALECTOMIZADOS COM DOENÇA PERIODONTAL**. 2018. 65f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

## RESUMO

Pesquisas têm sido realizadas para investigar a relação entre inflamações crônicas na cavidade oral e efeitos deletérios em diversos sistemas do organismo. A doença periodontal (DP) caracterizada como uma infecção e inflamação oral está associada à produção de citocinas inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6), as quais aumentam a expressão dos osteoclastos, levando a um aumento da reabsorção óssea alveolar. Além da influência destas citocinas na perda óssea alveolar, evidências científicas apontam que a falta do hormônio melatonina também pode contribuir para uma maior reabsorção óssea. A melatonina é um poderoso regulador da homeostase de diversos tecidos. Assim, este hormônio pode ter um importante papel na proteção de tecidos lesionados, podendo ser visto, como um possível coadjuvante no tratamento de doenças da cavidade oral devido principalmente sua ação antioxidante e imunomoduladora. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da suplementação da melatonina na reabsorção óssea alveolar em ratos com doença periodontal e pinealectomizados (PNX), avaliando: 1) concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  e IL-6 pelo método de ELISA; 2) marcadores ósseos como a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e Osteocalcina (OCN) por meio de técnica imunoistoquímica; 3) histomorfometria da região comprometida pela DP pelo escaneamento no microtomógrafo em 3D (Micro-CT) (modelo 1172 SkyScan®). Para tanto, oitenta (80) ratos Wistar machos com 40 dias de idade foram distribuídos aleatoriamente em 8 grupos (n=10): controle (CN), doença periodontal (DP), pinealectomizados (PNX), pinealectomizados com doença periodontal (PNXDP), controle com melatonina (CNMEL), doença periodontal com melatonina (DPMEL), pinealectomizados com melatonina (PNXMEL) e pinealectomizados com doença periodontal e com melatonina (PNXDPMEL). A DP foi induzida após 20 dias da pinealectomia por ligadura com fio de seda ao redor dos primeiros molares mandibulares. Após 28 dias da indução da DP, os experimentos foram realizados. A análise estatística foi realizada por análise de variância Three-way (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey e para as análises de imunoistoquímicas pelo teste estatístico não paramétrico de Kruskal Wallis. O nível de significância adotado foi de 5% (alfa=5%).

Os resultados evidenciaram um aumento de mediador pró-inflamatório TNF- $\alpha$  tanto nos animais com DP como PNX. Apenas os grupos com DP (DP e PNXDP) apresentaram maior reabsorção óssea alveolar devido uma maior atividade dos osteoclastos comparado a dos osteoblastos evidenciado pelo aumento do marcador de reabsorção, fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), e diminuição do marcador de formação, osteocalcina (OCN) como também pelos resultados histomorfométricos. Por outro lado, os animais tratados com melatonina não apresentaram alteração na concentração plasmática de TNF- $\alpha$  e perda óssea alveolar. Com base nos resultados do presente estudo, verificou-se que os animais pinealectomizados e com DP apresentaram elevada concentração de TNF- $\alpha$ , mas a perda óssea alveolar ocorreu apenas nos animais com DP. A pinealectomia não promoveu alteração óssea como também não agravou esse parâmetro em animais com DP. A suplementação com melatonina promoveu diminuição de TNF- $\alpha$  nos animais pinealectomizados e com DP. Em todos os grupos com DP a melatonina protegeu-os da reabsorção óssea alveolar. Portanto, estes resultados demonstram que a melatonina é eficiente no controle tanto da reabsorção óssea alveolar como da concentração plasmática de TNF- $\alpha$  em ratos com DP e PNX, demonstrando sua importância local e sistêmica.

**Palavras-chave:** Melatonina, Glândula Pineal, Doenças Periodontais, Inflamação, Reabsorção Óssea.

MARANI, F. **EFFECTS OF MELATONIN SUPPLEMENTATION ON ALVEOLAR BONE REMODELING IN PINEALECTOMIZED RATS WITH PERIODONTAL DISEASE.** 2018. 65f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

### ABSTRACT

Researches has been conducted to investigate the relationship between chronic inflammation in the oral cavity and deleterious effects on various systems of the body. Periodontal disease (PD) characterized as an infection and oral inflammation is associated with the production of inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6), which increase the expression of osteoclasts, leading to an increase in alveolar bone resorption. In addition to the influence of these cytokines on alveolar bone loss, scientific evidence indicates that the lack of the hormone melatonin may also contribute to a greater bone resorption. Melatonin is a powerful regulator of homeostasis of various tissues. Thus, this hormone may have an important role in the protection of injured tissues, and can be seen as a possible adjuvant in the treatment of diseases of the oral cavity mainly due to its antioxidant and immunomodulatory action. Therefore, the objective of this study was to verify the effect of melatonin supplementation on alveolar bone resorption in rats with periodontal disease and pinealectomized (PNX), evaluating: 1) plasma concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 by the ELISA method; 2) bone markers such as tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) and Osteocalcin (OCN) by immunohistochemical technique; 3) histomorphometry of the region compromised by PD by scanning in the microtomograph in 3D (Micro-CT) (model 1172 SkyScan®). Therefore, eighty (80) Wistar male rats of 40 days old were randomly distributed into 8 groups (n= 10): control (CN), periodontal disease (PD), pinealectomized (PNX) pinealectomized with periodontal disease (PNXPD), control with melatonin (CNMEL), periodontal disease with melatonin (PDMEL) pinealectomized with melatonin (PNXMEL) and pinealectomized with periodontal disease and melatonin (PNXPDMEL). PD was induced after 20 days of pinealectomy by ligation with silk thread around the first mandibular molars. After 28 days of induction of DP, the experiments were performed. Statistical analysis was performed by Three-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey's test and for the immunohistochemical analyzes by the non-parametric statistical test of Kruskal Wallis. The level of significance was 5% ( $\alpha = 5\%$ ). The results evidenced an increase of

proinflammatory mediator TNF- $\alpha$  in both PD and PN $\times$  animals. Only the groups with PD (PD and PN $\times$ PD) presented greater alveolar bone resorption due to a higher activity of the osteoclasts compared to the osteoblasts evidenced by the increase of the resorption marker, tartrate resistant acid phosphatase (TRAP), and decrease of the formation marker osteocalcin (OCN) as well as histomorphometric results. On the other hand, in animals treated with melatonin there was no change in plasma TNF- $\alpha$  concentration and alveolar bone loss. Based on the results of the present study, pinealectomized and PD animals showed high concentration of TNF- $\alpha$ , but alveolar bone loss occurred only in animals with PD. Pinealectomy did not promote bone alteration, nor did it aggravate this parameter in animals with PD. Supplementation with melatonin promoted decreased TNF- $\alpha$  in pinealectomized and PD animals. In all groups with PD, melatonin protected them from alveolar bone resorption. Therefore, these results demonstrate that melatonin is efficient in controlling both alveolar bone resorption and plasma TNF- $\alpha$  concentration in rats with PD and PN $\times$ , demonstrating its local and systemic importance.

**Keywords:** Melatonin, Pineal Gland, Periodontal Diseases, Inflammation, Bone Resorption.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das vias neurais de sinalização responsáveis pelo controle da síntese de melatonina em ratos.....	20
Figura 2. Imagem representativa para análises volumétricas e lineares.....	29
Figura 3. Avaliação da massa corpórea durante 28 dias .....	32
Figura 4. Ingestão alimentar dos animais durante 28 dias .....	33
Figura 5. Concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ .....	34
Figura 6. Concentrações plasmáticas de IL-6 .....	35
Figura 7. Imagem bidirecional representativa do primeiro molar de todos os grupos do estudo.....	36
Figura 8. Reconstrução 3D representativa do primeiro molar de todos os grupos do estudo.....	37
Figura 9. Medidas volumétricas.....	38
Figura 10. Medidas lineares .....	39
Figura 11. Padrão de imunomarcção para TRAP.....	41
Figura 12. Padrão de imunomarcção para OCN. ....	42

## LISTA DE ABREVIATURA

$\alpha$ : Alfa ( letra grega)

°C – graus Celsius

$\mu$  – micro

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{L}$  – microlitro

$\mu\text{m}$ : micrômetro

AA-NAT: araquilamina N-acetiltransferase

ANOVA: Análise de Variância

ASMT: acetilserotonina-oximetiltransferase

BM-MSC: células tronco mesenquimais derivadas da medula

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DP: Doença periodontal

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

EPM: Erro padrão da média

g: grama

GCS: gânglios cervicais superiores

h: hora

HIOMT: hidroxindoloximetiltransferase

IL-6: Interleucina 6

IML: coluna intermédio lateral da medula espinhal

i.v: intra venoso

L: Litro

LPS: lipopolissacarídeo bacteriano

M-CSF: fator estimulante da colônia de macrófagos

MEL: Melatonina

MT1: receptor de melatonina 1

MT2: receptor de melatonina 2

NC: nervos conários

NCI: ramos dos carotídeos internos

NF- $\kappa$ B: Fator nuclear kappa B

nm: nanômetro

NPH: núcleo paraventricular hipotalâmico

NSQ: núcleo supraquiasmático

OCN: Osteocalcina

OPG: osteoprotegerina

pg: pico grama

PNX: Pinealectomizados

RANK: receptor ativador de NF- $\kappa$ B

RANK-L: Ligante de RANK

RHP: trato retino-hipotalâmico

ROS: espécies reativas de oxigênio

TLR4: receptor Toll-like 4

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato

U.I: Unidade Internacional

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	17
2 OBJETIVOS .....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
3.1 Animais .....	25
3.2 Delineamento experimental .....	25
3.4 Pinealectomia .....	26
3.5 Doença Periodontal .....	27
3.6 Administração de melatonina.....	27
3.7 Coleta de sangue e tecidos (mandíbulas).....	27
3.8 Concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ e IL-6.....	28
3.9 Análises de Microtomografia Óssea (Micro-CT) .....	28
3.10 Análise Imunoistoquímica .....	30
3.11 Análise estatística .....	31
4 RESULTADOS .....	31
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÃO .....	51
REFERÊNCIAS .....	52



## 1 INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal (DP) é uma doença de origem infecciosa e inflamatória crônica dos tecidos periodontais que incluem gengiva, ligamento periodontal, cemento e o osso alveolar, envolvendo uma série de alterações patológicas no periodonto que levam a destruição gradual desses tecidos (DI BENEDETTO et al., 2013; WILLIAMS, 1990).

A etiologia da DP deriva principalmente de bactérias anaeróbicas gram-negativas, tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia* (RASLAN, 2011; SLOTS et al., 1986; SOCRANSKY, 2000; SOSROSENO, 2002). Essas bactérias produzem endotoxinas, principalmente na forma de lipopolissacarídeos (LPS), componente presente nas membranas externas destas bactérias (CHOI et al., 2011) e presentes no biofilme da cavidade oral, que desencadeiam uma série de respostas inflamatórias, imunes locais e sistêmicas (GARLET et al., 2006; IACOPINO; CUTLER, 2000).

Inicialmente os LPS promovem a ativação de monócitos pelos linfócitos T, ativando o receptor Toll-like 4 (TLR4), um receptor de superfície celular que atua na ativação da imunidade inata e indução de respostas inflamatórias, aumentando o processo inflamatório por meio da produção de quantidades elevadas de mediadores inflamatórios (MEDZHITOV, 2001), tais como, o fator de necrose tumoral – alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL) pró-inflamatórias como IL 6 (HERNÁNDEZ et al., 2011; MORRISON; RYAN, 1987) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (BARTOLD; WIEBKIN; THONARD, 1984; BATTINO et al., 1999) que acentuam o processo inflamatório, promovendo a osteoclastogênese, maior destruição das fibras do ligamento do periodonto e síntese de colagenase, propiciando assim, destruição de osso alveolar (ALI et al., 2011; LALLA; LAMSTER; SCHMIDT, 1998; LALLA et al., 2000; TAUBMAN et al., 2005).

Neste sentido, a DP é uma das principais causas de perda dentária entre adultos, devido à perda do suporte ósseo alveolar, provocando desta forma redução da função oral e da qualidade de vida (KUMAR et al., 2014; PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

Além da influência das citocinas na perda óssea alveolar, estudos apontam que a falta do hormônio melatonina (MEL) também pode contribuir para uma maior

reabsorção óssea (EGERMANN et al., 2011), alterando o metabolismo ósseo (AMSTRUP, et al., 2013; MARIA; WITT-ENDERBY, 2014; SANCHEZ-BARCELO; MEDIAVILLA; REITER, 2010) e comprometendo o equilíbrio entre reabsorção e formação óssea.

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina, com características anfifílicas, derivada do aminoácido triptofano que, através da enzima triptofano hidroxilase, é convertida em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) sendo convertido em serotonina (5-HT) sob a ação da descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos. A serotonina pela ação da enzima arialquilamina-N-acetiltransferase (AANAT) é convertida em N-acetilserotonina (NAS), que é oximetilada pela enzima hidroxindoloximetiltransferase (HIOMT), também chamada de acetilserotonina-oximetiltransferase (ASMT), dando origem à melatonina, sendo uma molécula amplamente presente na natureza e nos vertebrados, incluindo humanos (CIPOLLA NETO; AFECHE, 2012; PANDI-PERUMAL et al., 2006).

A MEL é sintetizada em diferentes tipos de células, tecidos e órgãos como retina, medula óssea, trato gastrointestinal, linfócitos, leucócitos e pele, mas principalmente na glândula pineal durante o período escuro do ciclo circadiano, apresentando os níveis mais altos de secreção à noite, na maioria das espécies (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2014) e a luminosidade pode inibir totalmente a produção de melatonina via pineal (CIPOLLA NETO; AFECHE, 2012; FOLKARD, 2008; HARDELAND et al., 2011; REITER et al., 2009). Desta forma, trabalhadores noturnos, expostos à luz por longos períodos durante suas jornadas de trabalho, têm a secreção de MEL pela glândula pineal suprimida, apresentando amplitude diminuída no ritmo de secreção deste hormônio (BURCH et al., 2005; DIJK et al., 2012; HANSEN; GARDE; HANSEN, 2006; HARDELAND et al., 2011) e desenvolvendo uma dessincronização crônica do ritmo circadiano (FOLKARD, 2008; HAUS; SMOLENSKY, 2006). Estudos demonstraram que a supressão de ME é mais sensível à luz azul de comprimento de onda mais curtas (466-477 nm) do que os comprimentos de onda mais longas (>500 nm) (BRAINARD et al., 2001; SOUSA-NETO; CASTRO, 2008). Mesmo intensidades moderadas de luz, como as do interior de residências (50-300 lux), são capazes de causar inibição da produção de MEL em humanos (ZEITZER et al., 2000). Destaca-se que esse tipo de luz é o mais presente em nosso cotidiano, como em Tvs, celulares, etc.

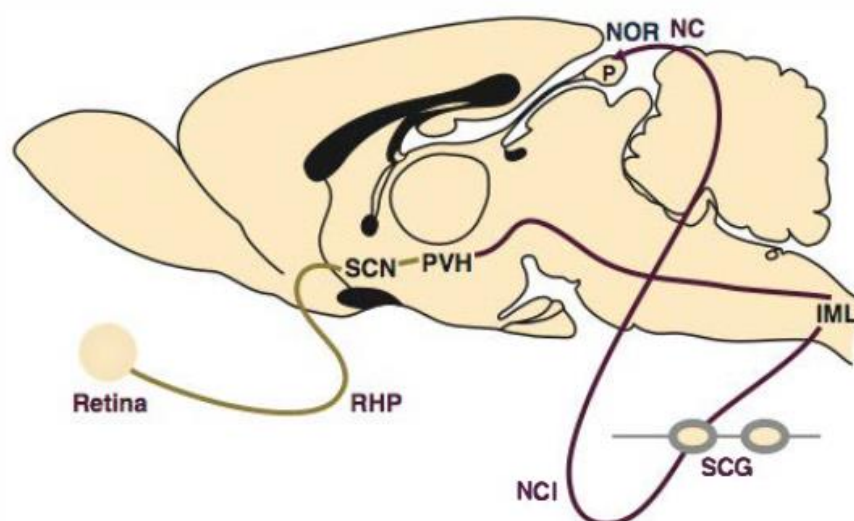
Trabalhadores com turnos alternados apresentam uma diminuição na secreção de MEL, como verificado no estudo de Hansen; Garde; Hansen, (2006) que verificaram em enfermeiros menores níveis de MEL nos indivíduos que trabalham à noite e em turnos alternados comparados aos que trabalham de dia.

Outro fator determinante na diminuição da secreção de melatonina é o avanço da idade (KARASEK 2004; SACK, et al., 1986) portanto, indivíduos mais velhos tendem a apresentar quantidades reduzidas de melatonina.

Nos roedores, a glândula pineal apresenta três porções distintas: pineal profunda, pedúnculo pineal e pineal superficial. A pineal profunda, localiza-se entre as comissuras posterior e habenular, delimitando uma região ventricular chamada de recesso pineal, e da sua porção dorsal emerge o pedúnculo pineal que se comunica com a pineal superficial, formando o complexo pineal (MOLLER, 1992).

A via de síntese e liberação de MEL (Figura 1) ocorre por uma via neural iniciando na retina, projetando-se ao trato retino-hipotalâmico (RHP), atingindo regiões hipotalâmicas periquiasmáticas, primordialmente no núcleo supraquiasmático (NSQ), o qual, conecta-se com o núcleo paraventricular hipotalâmico (NPH) conectando-se com os neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermédio lateral da medula espinhal (IML). Esses neurônios, projetam-se para o gânglios cervicais superiores (GCS) e deste, origina-se a inervação simpática que por meio dos ramos dos carotídeos internos (NCI) e nervos conários (NC), projetam-se para a glândula pineal. Destas terminações simpáticas há a liberação de noradrenalina (NOR) nos interstícios da glândula, estimulando a síntese de MEL nos pinealócitos, através da interação com os receptores  $\beta$  e  $\alpha$ -adrenérgicos (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2012; KAPPERS, 1960).

**Figura 1. Representação esquemática das vias neurais de sinalização responsáveis pelo controle da síntese de melatonina em ratos.**



Fonte: Adaptado de CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2012

A maioria das ações da MEL em diversos tecidos são mediadas por meio da interação com receptores de membrana acoplados a proteína G de alta afinidade conhecidos como MT1 e MT2, como também pode interagir com um fator transcricional RZR/ROR (GARCIA-MAURIÑO et al., 1997; KIM; WOO; LIM, 2008; REPERT; WEAVER; GODSON, 1996; SLOMINSKI et al., 2012; STEINHILBER et al., 1995).

A MEL, além de influenciar o ritmo circadiano (BUBENIK; KONTUREK, 2011; TILDEN; HUTCHINSON, 1993), também atua em diversas funções específicas, estando relacionada a função reprodutiva (REITER et al., 2009), modulação da temperatura corporal (FENN; FONKEN; NELSON, 2011), propriedades imunomoduladoras (AHMAD e HALDAR, 2010; CENGIZ; CENGIZ; WANG, 2012; GUERRERO; REITER, 2002), como também a efeitos anti-inflamatórios (MAYO et al., 2005), antitumorais (DAWSON; ARMSTRONG, 1996) e antioxidantes por ser potente captador de radicais livres e uma molécula com propriedades antioxidantes (CENGIZ; CENGIZ; WANG, 2012; GALANO; TAN; REITER, 2011; HARDELAND; FUHRBERG, 1996; MARIA; WITT-ENDERBY, 2014; PEDROSA et al., 2010; SANCHEZ-BARCELO; MEDIAVILLA; REITER, 2010).

Em um estudo realizado por Abdolsamadi et al. (2014) em indivíduos com diabetes tipo II e com DP, constatou-se que estes sujeitos apresentam concentrações salivares de MEL diminuída, comparados aos indivíduos saudáveis, alcançando níveis ainda mais baixos quando apresentavam ambas as doenças. Dentro deste contexto, considerando que indivíduos com DP apresentam baixos níveis de melatonina, a DP é agravada pela geração de radicais livres e alterações imunes, podendo causar um ataque oxidativo e à deterioração substancial dos tecidos periodontais, levando a uma perda óssea alveolar.

Portanto, a MEL pode ter implicações na DP devido às suas atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, e estimulantes da proliferação de fibroblastos e da remodelação óssea (CUTANDO et al., 2007; GALANO; TAN; REITER, 2011), podendo diminuir assim, o estresse oxidativo, limitando os danos de tecidos, estimulando a resposta imune e reduzindo a perda progressiva de osso alveolar.

Deve-se destacar que o tecido ósseo passa por um processo de remodelação em que o osso maduro é removido pelos osteoclastos (reabsorção óssea) e é substituído por um novo osso, pelos osteoblastos (formação óssea). Em condições fisiológicas normais existe um fino estado de equilíbrio durante a remodelação óssea entre a reabsorção e formação óssea (RAISZ; SEEMAN, 2001). Entretanto, tanto a DP como a falta de MEL implicam em um desequilíbrio no processo de remodelação óssea ocasionando perda óssea devido a uma atividade maior dos osteoclastos (AMSTRUP et al., 2013; COCHRAN, 2008; EGERMANN et al., 2011; KAJIYA et al., 2010).

A remodelação óssea é um processo fisiológico constante, que mantém a integridade do esqueleto por meio da remoção de osso já existente e substituição por uma nova matriz mineralizada. A superfície de todos os ossos é recoberta por uma camada de osteoblastos, os quais controlam a formação e ativação dos osteoclastos. A degradação de osteóide não mineralizado, presente entre a camada de osteoblastos e o osso mineralizado, marca o início da ativação do ciclo de remodelação. Ao iniciar a remodelação, os osteoclastos multinucleados, advindos de células do tecido hematopoiético, precursoras dos osteoclastos, secretam enzimas hidrolíticas que degradarão a matriz orgânica rica em colágeno (HENRIKSEN, 2011; RUCCI, 2008), criando lacunas de reabsorção. Na sequência, células precursoras de osteoblastos que se originam de células tronco mesenquimais derivadas da medula (BM-MS), e

que também podem se diferenciar em adipócitos (BOYCE et al, 2012), são recrutadas para a lacuna, onde irão se diferenciar em osteoblastos ativos que preencherão a lacuna de reabsorção com nova matriz óssea (LERNER, 2006). Quando maduros, os osteoblastos sintetizam e secretam colágeno tipo I, que representa a maior parte da matriz orgânica óssea extracelular, completando assim a cavidade formada na reabsorção (ROSENBERG; ROSENBERG; SOUDRY, 2012).

Esse processo também envolve os osteócitos, células formadas quando os osteoblastos são envolvidos pela matriz por eles produzida e constituem mais de 90% das células ósseas (KNOTHE-TATE et al., 2004). Os osteócitos ficam dispersos na matriz e comunicam-se entre si, e com outras células, por meio de prolongamentos dendríticos localizados dentro dos canalículos de lacunas e têm papel central na manutenção da estrutura óssea (KAMIOKA, HONJO, TAKANO-YAMAMOTO, 2001; ZHAO et al., 2002). Esses osteócitos podem secretar várias moléculas, incluindo esclerostina (SOST), RANKL e fator de crescimento de fibroblastos, regulando a reabsorção óssea, formação óssea e homeostase mineral (CHEN; SENDA; KUBO, 2015; HAN et al., 2018).

Quanto aos marcadores de formação óssea destacamos os marcadores liberados por osteoblastos como a osteoprotegerina (OPG). A OPG é uma proteína solúvel expressa por osteoblastos, que se liga com elevada afinidade ao ligante do receptor ativador do fator nuclear-kappa B (RANKL), bloqueando sua ligação ao receptor ativador do fator nuclear-kB (RANK) e regulando negativamente a população funcional de osteoclastos e a osteoclastogênese (BURGESS et al., 1999; SCHOPPET et al., 2002). Uma outra proteína relacionada a formação óssea e secretada por osteoblastos maduros é a Osteocalcina (OCN), essencial para diferenciação de osteoblastos e potencial marcador da formação óssea (BULLON et al., 2007; LEE et al., 1999; PATTI et al., 2013). A expressão de osteocalcina está sob o controle do fator de transcrição relacionado com Runt 2 (Runx2), que é o mais precoce e específico indicador de osteogênese (KIERSZENBAUM; TRES, 2012) induzindo também a expressão osteogênica de osterix e proteínas morfogenética óssea-2 (Bmp-2) (MARIA; WITT-ENDERBY, 2014; PARK et al. 2011). Ainda com relação a OCN, essa proteína parece exercer efeitos sobre os adipócitos, músculos, células  $\beta$  pancreáticas, e outros tecidos periféricos, aumentando a utilização da glicose, reduzindo a gordura visceral e diminuindo a quantidade de triglicerídeos (BARROS, 2011), compondo,

portanto, uma complexa rede de sinalização entre o osso e os órgãos mais classicamente associados com a regulação da homeostase energética, como o pâncreas e o tecido adiposo (DUCY, 2011).

Para a manutenção da qualidade óssea há necessidade de um equilíbrio entre formação e reabsorção óssea. Para o estudo deste processo há vários marcadores de reabsorção óssea, destacando uma das enzimas secretadas pelos osteoclastos que é a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) refletindo o número de osteoclastos (BLUMSOHN; EASTELL, 1997; WHEATER et al., 2013). Um outro marcador de reabsorção é o ligante do receptor ativador do fator nuclear-kappa B (RANKL) da família do fator de necrose tumoral. RANKL é uma proteína transmembrânica expressa por osteoblastos, que se liga ao receptor ativador do fator nuclear-kB (RANK) presente na superfície de precursores de osteoclastos e de osteoclastos maduros (LACEY et al., 1998; HSU et al., 1999). Portanto, o processo de reabsorção óssea é desencadeado por mecanismos moleculares decorrente das interações existentes entre essas proteínas em células precursoras de osteoclastos, que desencadeiam séries de cascatas de sinalizações intracelulares resultando na ativação de fator nuclear kappa B (NF-kB) (WADA et al., 2006). O NF-kB é um fator de transcrição pleiotrópico que promove a expressão de vários genes responsáveis pela diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos e, também, na ativação de osteoclastos maduros que, por sua vez, sintetizam vários mediadores, entre eles a TRAP (SOYSA; ALLES, 2009).

Diferentes citocinas podem modular o processo de remodelação óssea, dentre as quais destacam-se o fator estimulante da colônia de macrófagos (M-CSF), que é essencial para proliferação das células progenitoras dos osteoclastos e o RANKL. A ligação RANK/RANKL estimula a diferenciação e a ativação de osteoclastos, inibe a apoptose dessas células e atua como reguladores-chaves da remodelação óssea e essenciais para o desenvolvimento e ativação da reabsorção óssea (THEILL; BOYLE; PENNINGER, 2002).

Dessa forma, a manutenção da massa óssea é influenciada pela relação OPG/RANKL (AMADEI et al., 2006). E uma alteração dessa relação como ocorre na DP (COCHRAN, 2008; TAUBMAN et al. 2005) resulta em aumento de reabsorção óssea, assim como, em animais pinealectomizados (EGERMANN et al., 2011).

Neste sentido, os estudos apontam que a MEL tem atuação direta na remodelação óssea, beneficiando o metabolismo ósseo através do anabolismo ósseo e efeitos antirreabsortivos, demonstrando múltiplos mecanismos para esses benefícios como a diferenciação de células tronco mesenquimais humanas na linhagem de células osteoblásticas, reduzindo a reabsorção óssea, aumentando a síntese de OPG, um receptor chamariz que impede a ativação RANKL em se ligar ao seu receptor, além de reduzir a síntese de RANKL prevenindo a reabsorção óssea adicional (AMSTRUP, et al., 2013; TRESGUERRES, et al., 2014). Além disso, a MEL tem propriedades antioxidantes e depuradoras de radicais livres, protegendo o tecido ósseo das ações degenerativas causadas pelos radicais livres, pois estes favorecem a osteoclastogênese por regular positivamente o RANKL (CARDINALI *et al.*, 2003; GALLI; PASSERI; MACALUSO, 2011) e estimular a resposta imune do hospedeiro liberando mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  (DAHIYA et al., 2013). Ainda, deve-se ressaltar que animais pinealectomizados tem uma densidade mineral óssea significativamente diminuída comparado com animais controle, após 90 dias da pinealectomia (SAAD; REIS, 2004; EGERMANN et al., 2011), reforçando a importância de níveis suficientes de MEL.

Como visto anteriormente, a MEL tem grande importância no processo de remodelação óssea. Tanto a redução da concentração deste hormônio, como também a DP, ocasionam um desequilíbrio neste processo de remodelação, pois promovem aumento na reabsorção óssea. Dentro deste contexto, torna-se necessário entender melhor os efeitos da pinealectomia e/ou suplementação com MEL em associação com a DP no metabolismo ósseo, citocinas e mediadores inflamatórias. Neste estudo, hipotetizamos que a pinealectomia agravaria a reabsorção óssea alveolar em animais com DP e que a suplementação de melatonina preveniria a reabsorção óssea alveolar.

## **2 OBJETIVOS**

Verificar o efeito da suplementação da melatonina no metabolismo ósseo alveolar e na concentração plasmática de citocinas inflamatórias em ratos pinealectomizados com ou sem doença periodontal.



## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Foram utilizados 80 ratos Wistar machos, com 40 dias de idade pesando aproximadamente 200 g oriundos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA – Unesp. Os animais foram mantidos em ambiente de 12/12 horas de ciclo claro e escuro (período claro iniciado às 7:00 h) e temperatura ambiente de 23°C ± 2°C, com acesso à água e comida (23% proteínas, 4% gorduras e 58% de carboidratos) (Presença, Paulínia, São Paulo, Brasil) a vontade (*ad libitum*), exceto nas 14 horas que antecederem o início dos procedimentos experimentais.

Para os experimentos os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália, Itapira, Brasil, 3%, 50 mg / kg de peso corporal, intraperitoneal) precedido pela aplicação de anestésico bloqueador regional/local (Lidocaína, Cristália, Itapira, Brasil, 4 mg / kg de peso corporal, intraperitoneal), 10 minutos antes da aplicação da anestesia com barbitúrico. 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 00544-2016 (ANEXO-1).

### 3.2 Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em 8 grupos (n=10): 1) controle (CN); 2) com doença periodontal (DP); 3) pinealectomizados (PNX); 4) pinealectomizados e com doença periodontal (PNXDP); 5) controle suplementados com MEL (CNMEL); 6) com doença periodontal suplementados com MEL (DPMEL); 7) pinealectomizados suplementados com MEL (PNXMEL); e 8) pinealectomizados com doença periodontal suplementados com MEL (PNXDPMEL).

Os animais dos grupos PNX foram submetidos a cirurgia de pinealectomia aos 40 dias de vida. Os animais do grupo com DP foram submetidos à indução da DP aos 60 dias de vida. Os grupos suplementados com MEL iniciou-se concomitante a indução da DP, com duração de 28 dias. A eutanásia dos animais ocorreu entre 7:00 e 8:00 horas da noite. Foram coletadas amostras de sangue para avaliar as concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  e IL-6. As mandíbulas

foram removidas e devidamente tratadas para avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica da região da furca do primeiro molar.

### **3.3 Avaliação do consumo de ração e evolução da massa corporal dos animais**

A evolução do peso corporal dos animais e o consumo de ração dos 8 grupos foi realizado três vezes por semana, utilizando uma balança digital (0 a 5 kg, Filizola), calculando a média semanal. O consumo de ração foi determinado pela diferença entre a quantidade de ração oferecida e a quantidade de sobra. A média de consumo semanal de ração foi extraída e transformada em gramas por 100 g de peso corporal.

### **3.4 Pinealectomia**

Os animais dos grupos PNX, PNXDP, PNXMEL e PNXDPMEL, aos 40 dias de vida, foram anestesiados com associação de Cloridrato de Quetamina (10%, 80mg/ kg de peso corpóreo, intraperitoneal) e Xilazina (2%, 10 mg/ kg de peso corpóreo, intraperitoneal) e submetidos a pinealectomia seguindo os parâmetros propostos por (HOFFMAN; REITER, 1965). Após a anestesia, foi realizada uma tricotomia no topo da cabeça de cada animal, e o mesmo foi fixado em um 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 lâmbda, 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, que se localiza logo abaixo deste seio. Após a retirada desta glândula, o fragmento de osso retirado foi recolocado na sua posição inicial, sendo o animal retirado do aparelho estereotáxico. Após a hemostasia, a pele foi suturada com fio de seda 4-0. 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. Ao término da cirurgia, os ratos foram mantidos nas condições anteriormente citadas.

### **3.5 Doença Periodontal**

A DP foi induzida nos animais após 20 dias da realização da pinealectomia nos grupos (DP, PNXDP, DPMEL e PNXDPMEL). Os animais foram anestesiados pela associação de Ketamina (10%, 80 mg/kg de peso corporal) e Xilazina (2%, 10 mg/kg de peso corporal), aplicados via intraperitoneal e a DP foi induzida por meio da adaptação de um fio de seda número 4-0 (Seda Silk Trancada Ethicon-Johnson & Johnson) ao redor dos primeiros molares inferiores em nível do sulco gengival, bilateralmente, conforme descrito por Rodini et al., (2008).

### **3.6 Administração de melatonina**

Os animais dos grupos (CNMEL, DPMEL, PNXMEL e PNXDPMEL) receberam a MEL (Melatonin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 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 corporal, durante 28 dias. A melatonina (1g) foi inicialmente diluída em 20 ml de etanol absoluto (2%), adicionando 980 ml de água para um volume final de 1L. Após este procedimento, a melatonina preparada foi solubilizada na água dos bebedouros, sendo quantificada de acordo com o peso dos animais e considerando o consumo de água durante o período escuro de acordo com a seguinte equação:  $\text{Peso} \times \text{quantidade de água} / \text{consumo de água} \times \text{dose de melatonina (5 mg/kg)}$ . A concentração de melatonina foi adotada com base em estudos anteriores que utilizaram metodologias semelhantes ao presente estudo (ARABACI et al., 2015; KOSE, et. al, 2016; MELO, 2012; POLO, 2016; TRESGUERRES et al. 2014). 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.

### **3.7 Coleta de sangue e tecidos (mandíbulas)**

Sob anestesia (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g peso corpóreo, intraperitoneal), após 28 dias da indução da DP e do tratamento com MEL, foi realizada a laparotomia mediana, coletando o sangue pela veia cava inferior. As amostras de sangue (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 até o dia das análises das concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  e IL-6.

Após a eutanásia as hemimandíbulas foram desarticuladas e preparadas, removendo-se todos os tecidos mole remanescentes. As hemimandíbulas do lado direito foram imediatamente fixadas em salina (9%) e mantidas a 4 °C até o dia do experimento e as hemimandíbulas do lado esquerdo foram fixadas em Formalina tamponada 10% para posteriormente processamento imunoistoquímico.

### **3.8 Concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ e IL-6**

As concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  e IL-6 foram determinadas pelo método de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) com a utilização de kits de acordo com as instruções dos fabricantes. Os kits comerciais utilizados foram respectivamente Biosource International, Camarillo, USA (para mensurar TNF- $\alpha$ ) e o BD Biosciences, San Diego, USA (para mensurar IL-6).

### **3.9 Análises de Microtomografia Óssea (Micro-CT)**

Após eutanásia, as hemimandíbulas (do lado direito) foram desarticuladas e preparadas, removendo-se todos os tecidos mole remanescentes e imediatamente fixadas em solução salina (9%) e mantidas a 4 °C até o dia do escaneamento.

A microtomografia óssea foi realizada com microtomógrafo computadorizado Skyscan 1172 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica, 2003), utilizado para avaliação tridimensional não destrutiva da arquitetura óssea. Os parâmetros de escaneamento foram de 6 $\mu$ m pixel de tamanho, 70kV e 200  $\mu$ A de configuração da fonte, filtro de alumínio de 0.5mm, 185° de rotação e 0.4° de passo. Foram analisadas as regiões de interesse que compreende a secção de 1 cm anteriormente ao primeiro molar inferior e 1 cm posteriormente ao último molar removendo-se também parte do incisivo inferior.

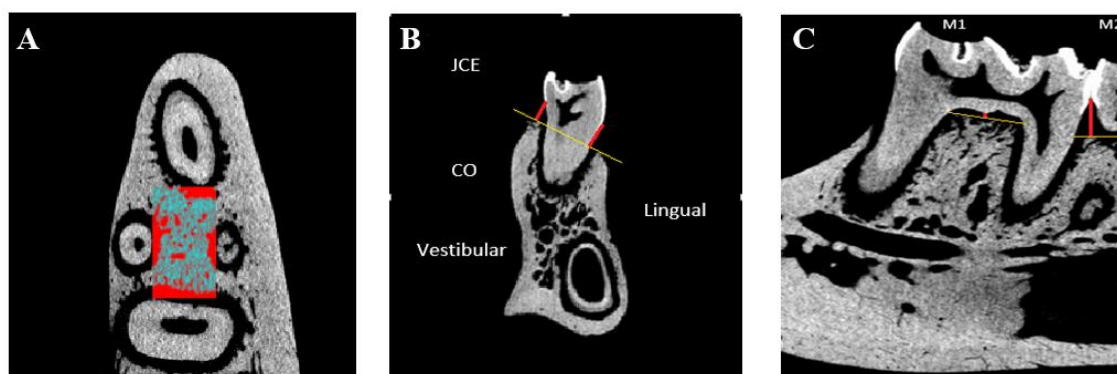
Após escaneamento de cada amostra, realizou-se a reconstrução com uso do software NRecon (Skyscan, Bélgica), do ápice da coroa, incluindo o processo ósseo alveolar e para a análise tridimensional (3D) foi utilizada o software CTAn v.1.5.0 (Skyscan). Foram analisadas as regiões de interesse (ROI), no eixo sagital, composta por 80 slices que foram interpolados por uma figura geométrica na forma

de um retângulo permitindo o cálculo em 3D dos índices volumétricos realizados na região de furca do primeiro molar da mandíbula (Figura 1A). Os parâmetros analisados foram:

Medidas volumétricas = BV/TV (%) - volume ósseo percentual (volume ósseo pelo volume tecidual); BS/BV (1/mm) - razão entre superfície óssea com o volume ósseo; Tb.Th (mm) - espessura trabecular; Tb.N ( $\text{mm}^{-1}$ ) - número de trabéculas por milímetro de tecido, Tb.Sp (mm) - separação trabecular e Po total (%) - porosidade total.

Também foram realizadas análises de parâmetros lineares para quantificar a perda óssea alveolar extraída de uma imagem representativa bidimensional utilizando o software DATA VIEWER v. 1.5.1.2 (Figura 1 B e C), analisando: Distância do teto da furca à crista óssea interradicular do primeiro molar (M1); Ponto de contato entre molar 1 (M1) e molar 2 (M2) à crista óssea alveolar interproximal (PC-COI); Distância da junção cimento-esmalte (JCE) à crista óssea por vestibular (JCE-COV); Distância da junção cimento-esmalte à crista óssea por Lingual (JCE-COL). A imagem tridimensional do ROI foi realizada com o software CTVOX®.

**Figura 2. Imagem representativa para análises volumétricas e lineares.**



Fonte: do autor

A= região de interesse (ROI) no eixo sagital. B= eixo transaxial do molar 1 evidenciando as medidas lineares junção cimento esmalte a crista óssea alveolar, vestibular e lingual. C= eixo coronal molar 1 (M1) e molar 2 (M2).

### 3.10 Análise Imunoistoquímica

As hemimandíbulas (do lado esquerdo) foram removidas e fixadas em Formalina tamponada 10% por 72 horas, lavadas em água corrente por 12 horas e colocadas em uma solução de ácido dietilaminotetracético (EDTA) tamponado 10% (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) até que estarem descalcificadas sendo incluídas em parafina. Foram obtidos cortes longitudinais contendo 5 µm de espessura, estendidas em lâminas silanizadas (StarFrost® Polycat Knittel). Sete cortes foram realizados na região de furca para as análises imunoistoquímica.

Para a análise imunoistoquímica os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 90° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C, por 20 minutos. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em dois lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-OCN do rato gerado em cabra (SC-18319, Santa Cruz Biotechnology®) e anti-TRAP do rato gerado em cabra (SC-30833, Santa Cruz Biotechnology®). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). Foi realizada a contracoloração com *Hematoxilina de Harris*, e em seguida a desidratação em etanol, diafanização em xilol e, recobrimento com meio de montagem (Permount, Fisher Scientific, San Diego, CA, USA) e lamínulas de vidro. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

A análise imunoistoquímica foi realizada por um histologista certificado e cego aos tratamentos realizados (EE). A região de interesse foi o centro da área de furca e o limite coronário desta área foi a crista óssea alveolar. Foi efetuada uma análise semi-quantitativa utilizando-se de uma secções histológicas de cada animal, no aumento original de 200x. Ao padrão de imunomarcção foi atribuído um escore. O critério adotado para o estabelecimento dos escores foi baseado e modificados daqueles estabelecidos por Faria et al. (2008), onde: ESCORE 0 = ausência de imunomarcção; ESCORE 1 = baixo padrão de imunomarcção; ESCORE 2 = moderado padrão de imunomarcção; ESCORE 3 = alto padrão de imunomarcção.

### **3.11 Análise estatística**

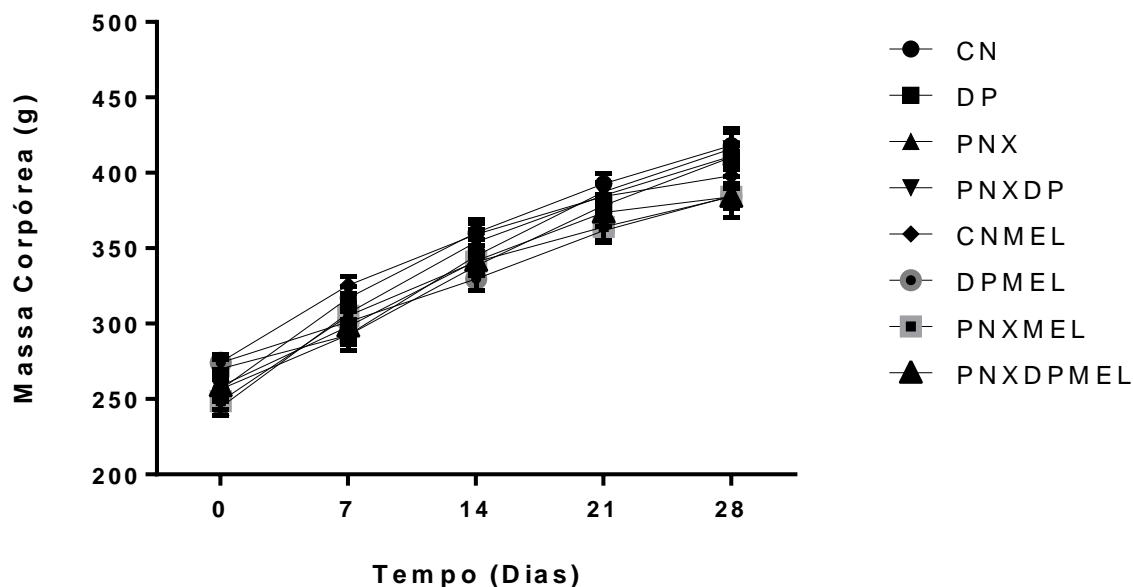
As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância Three-way (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, quando a análise de variância sugeriu diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). A análise estatística da imunoistoquímica foi realizada pelo teste estatístico não paramétrico de Kruskal Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. O programa estatístico utilizado foi o Graph Pad Prism Versão 7.0. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  EPM e o nível de significância adotado foi de 5% ( $\alpha=5\%$ ).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Avaliação da massa corpórea**

A massa corpórea dos grupos foram avaliados semanalmente, durante os 28 dias de tratamento, a partir da indução da DP. Os resultados demonstram que não houve diferença estatística significativa na massa corpórea entre os grupos (Figura 3).

**Figura 3. Avaliação da massa corpórea durante 28 dias**



Fonte: do autor

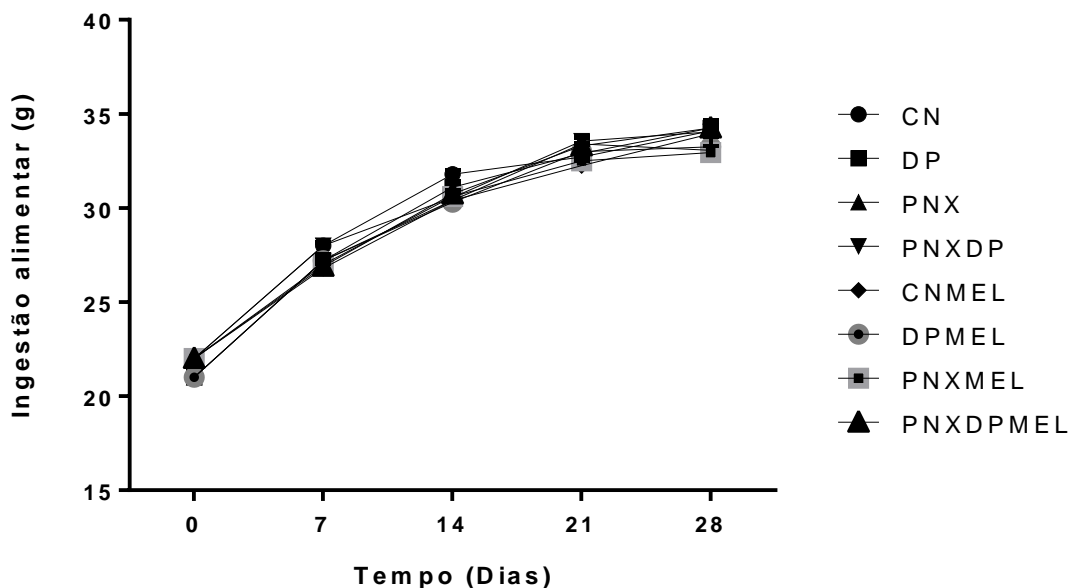
Grupo controle (CN), com Doença Periodontal (DP), Pinealectomizados (PNX), Pinealectomizados com Doença Periodontal (PNXDP) controle suplementados com MEL (CNMEL), com doença Periodontal suplementados com MEL (DPMEL), Pinealectomizados suplementados com MEL (PNXMEL) e Pinealectomizados com Doença Periodontal suplementados com MEL (PNXDPMEL), durante 28 dias de tratamento. Os valores são apresentados como média e  $\pm$  EPM de cada grupo (n=10), ANOVA (Three-way) com pós-teste de Tukey.

## 4.2 Avaliação da ingestão alimentar

A ingestão alimentar dos grupos foram avaliados semanalmente, durante os 28 dias de tratamento, a partir da indução da DP. Os resultados demonstram que não houve diferença estatística significativa na ingestão alimentar entre os grupos (Figura 4).



**Figura 4. Ingestão alimentar dos animais durante 28 dias**



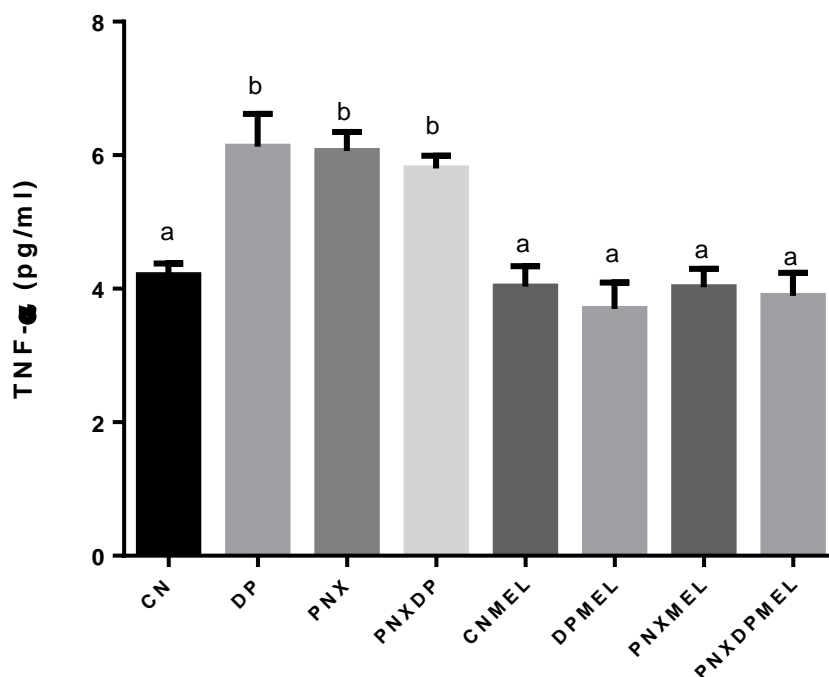
Fonte: do autor

Grupo controle (CN), com Doença Periodontal (DP), Pinealectomizados (PNX), Pinealectomizados com Doença Periodontal (PNXDP) controle suplementados com MEL (CNMEL), com doença Periodontal suplementados com MEL (DPMEL), Pinealectomizados suplementados com MEL (PNXMEL) e Pinealectomizados com Doença Periodontal suplementados com MEL (PNXDPMEL), durante 28 dias de tratamento. Os valores são apresentados como média e  $\pm$  EPM de cada grupo (n=10), ANOVA (Three-way) com pós-teste de Tukey.

### 4.3 Avaliação das concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ e IL-6.

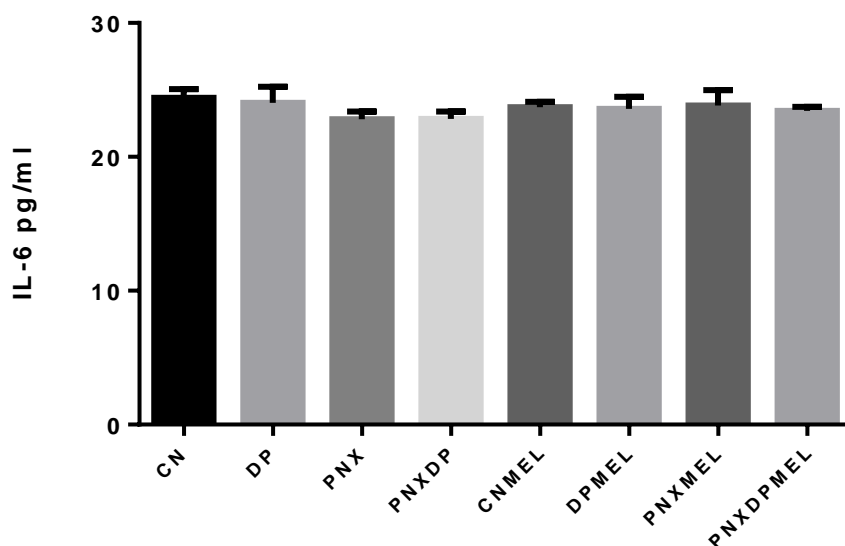
As concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  são apresentadas na Figura 5. Observou-se que os grupos DP, PNX e PNXDP apresentaram aumento significativo ( $p < 0.05$ ) das concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  quando comparado aos outros grupos. Os grupos tratados com melatonina apresentaram concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  semelhantes ao grupo CN.

Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa nas concentrações plasmáticas de IL-6 entre os grupos (Figura 6).

Figura 5. Concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ 

Fonte: do autor

Grupo controle (CN), com Doença Periodontal (DP), Pinealectomizados (PNx), Pinealectomizados com Doença Periodontal (PNxDp) controle suplementados com MEL (CNMEL), com doença Periodontal suplementados com MEL (DPmEL), Pinealectomizados suplementados com MEL (PNxMEL) e Pinealectomizados com Doença Periodontal suplementados com MEL (PNxDpMEL), durante 28 dias de tratamento. Os valores são apresentados como média e  $\pm$  EPM de cada grupo (n=10), ANOVA (Three-way) com pós-teste de Tukey. As letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos (p<0,05).

**Figura 6. Concentrações plasmáticas de IL-6**

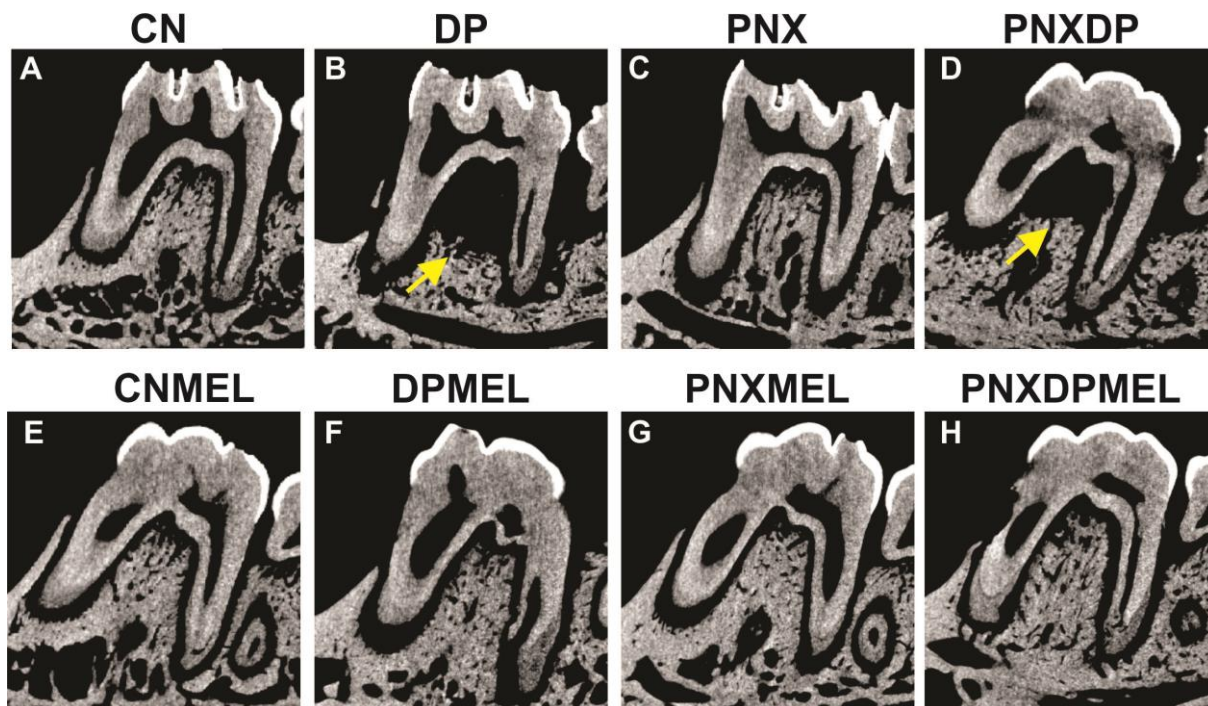
Fonte: do autor

Grupo controle (CN), com Doença Periodontal (DP), Pinealectomizados (PNX), Pinealectomizados com Doença Periodontal (PNXDP) controle suplementados com MEL (CNMEL), com doença Periodontal suplementados com MEL (DPMEL), Pinealectomizados suplementados com MEL (PNXMEL) e Pinealectomizados com Doença Periodontal suplementados com MEL (PNXDPMEL), durante 28 dias de tratamento. Os valores são apresentados como média e  $\pm$  EPM de cada grupo (n=10), ANOVA (Three-way) com pós-teste de Tukey.

#### 4.4 Análise histomorfométrica por meio da Micro-CT

Os grupos DP e PNXDP apresentaram maior perda de osso alveolar do que os outros grupos. Destaca-se que os grupos tratados com melatonina preveniram a perda óssea alveolar (Figura 7 e 8).

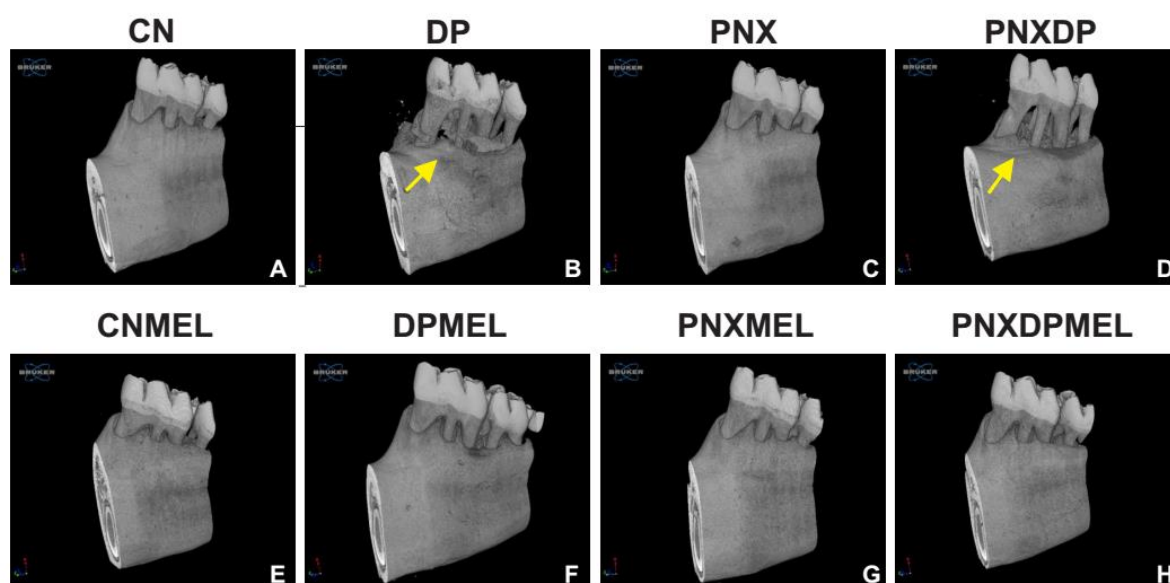
**Figura 7. Imagem bidirecional representativa do primeiro molar de todos os grupos do estudo.**



Fonte: do autor

A= Grupo controle (CN), B= com Doença Periodontal (DP), C= Pinealectomizados (PNX), D= Pinealectomizados com Doença Periodontal (PNXDP) E= controle suplementados com MEL (CNMEL), F= com doença Periodontal suplementados com MEL (DPMEL), G= Pinealectomizados suplementados com MEL (PNXMEL) e H= Pinealectomizados com Doença Periodontal suplementados com MEL (PNXDPMEL). Setas amarelas indicam a perda óssea alveolar.

**Figura 8. Reconstrução 3D representativa do primeiro molar de todos os grupos do estudo.**

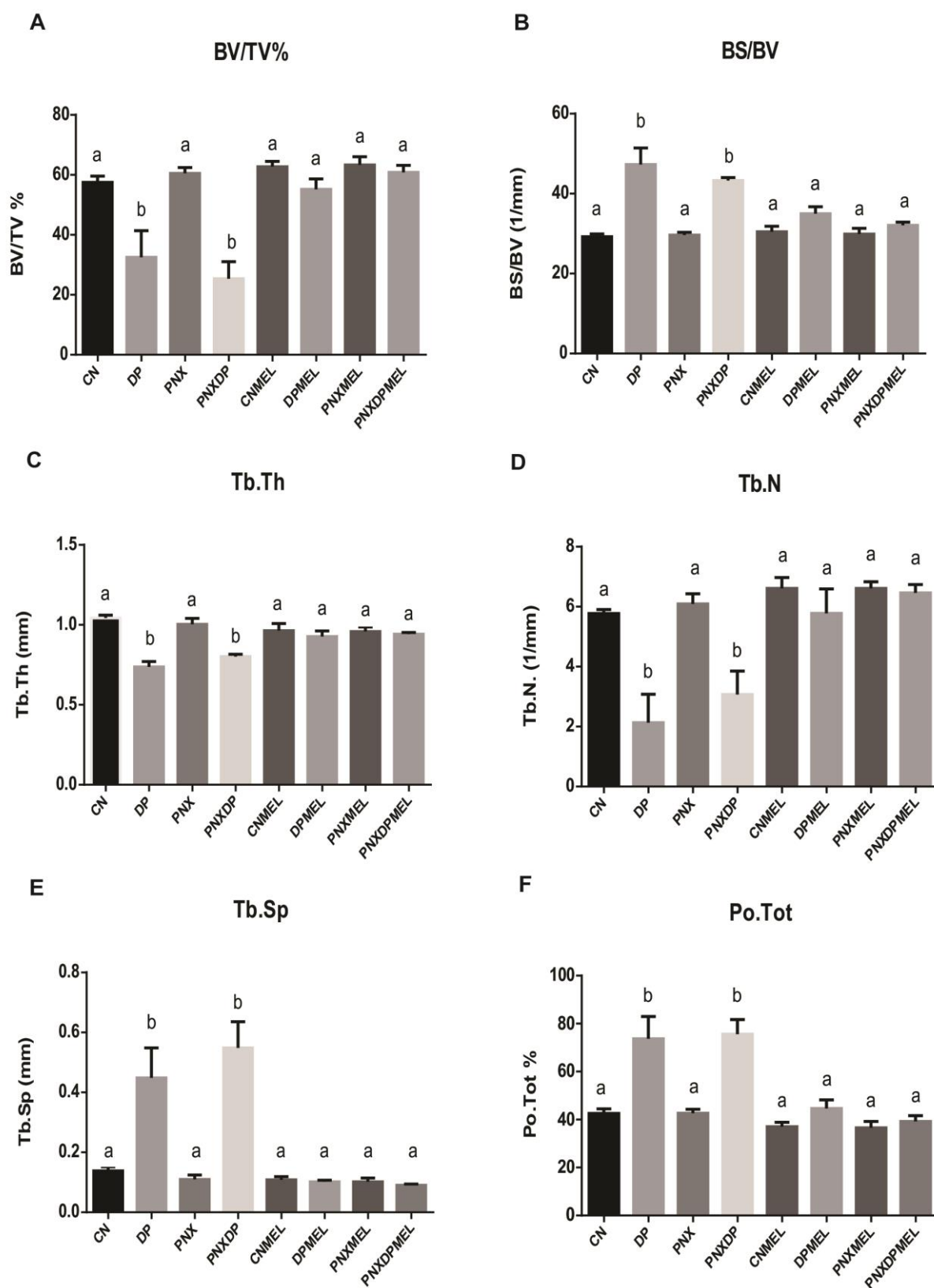


Fonte: do autor

A= Grupo controle (CN), B= com Doença Periodontal (DP), C= Pinealectomizados (PNx), D= Pinealectomizados com Doença Periodontal (PNxDp) E= controle suplementados com MEL (CNMEL), F= com doença Periodontal suplementados com MEL (DPmEL), G= Pinealectomizados suplementados com MEL (PNxmEL) e H= Pinealectomizados com Doença Periodontal suplementados com MEL (PNxDpmEL). Setas amarelas indicam a perda óssea alveolar.

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os seguintes grupos: CN x DP; CN x PNxDp; DP x DPmEL; PNxDp x PNxDpmEL em todos os parâmetros volumétricos (BV / TV, BS / BV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e Po.Tot) e parâmetros lineares (furca, crista óssea alveolar interproximal, JCE-COV e JCE-COL) analisadas (Figura 9 e 10, respectivamente).

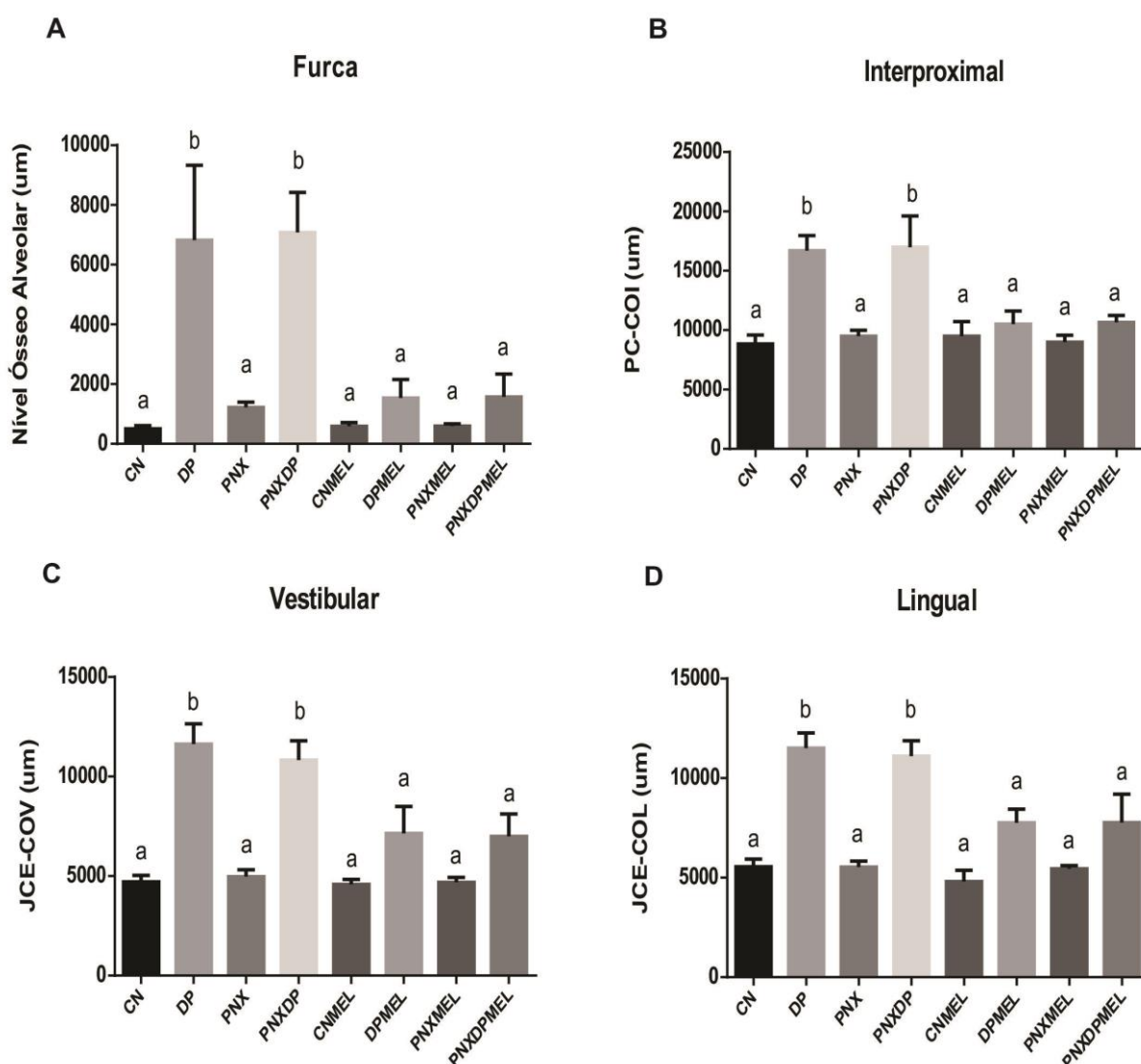
Figura 9. Medidas volumétricas



Fonte: do autor

Grupo controle (CN), com Doença Periodontal (DP), Pinealectomizados (PNX), Pinealectomizados com Doença Periodontal (PNXDP) controle suplementados com MEL (CNMEL), com doença Periodontal suplementados com MEL (DPMEL), Pinealectomizados suplementados com MEL (PNXMEL) e Pinealectomizados com Doença Periodontal suplementados com MEL (PNXDPMEL). Os valores são apresentados como média e  $\pm$  EPM de cada grupo (n=06), ANOVA (Three-way) com pós-teste de Tukey. (A) BV/TV (%)= volume ósseo percentual; (B) BS/BV (1/mm)= razão entre superfície óssea com o volume ósseo; (C) Tb.Th (mm)= espessura trabecular; (D) Tb.N (mm<sup>-1</sup>)= número de trabéculas; (E) Tb.Sp (mm)= separação trabecular; (F) Po Tot (%)= porosidade total. As letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos (p<0,05).

**Figura 10. Medidas lineares**



Fonte: do autor

Grupo controle (CN), com Doença Periodontal (DP), Pinealectomizados (PNX), Pinealectomizados com Doença Periodontal (PNXDP) controle suplementados com MEL (CNMEL), com doença Periodontal suplementados com MEL (DPMEL), Pinealectomizados suplementados com MEL (PNXMEL) e Pinealectomizados com Doença Periodontal suplementados com MEL (PNXDPMEL). Os valores são apresentados como média e  $\pm$  EPM de cada grupo (n=06), ANOVA (Three-way) com pós-teste de Tukey. (A) Região da furca; (B) PC-COI= ponto de contato entre 1º molar (M1) e 2º molar (M2) à crista óssea alveolar interproximal; (C) JCE-COV= distância da junção cimento-esmalte à crista óssea por

vestibular e (D) JCE-COL= distância da junção cimento-esmalte à crista óssea por lingual. As letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos ( $p < 0,05$ ).

## 4.5 Análise Imunoistoquímica

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de OCN e TRAP mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação. As células imunorreativas apresentaram uma coloração marrom escura confinada exclusivamente ao citoplasma, no caso de TRAP, e confinada ao citoplasma e em menor escala à matriz extracelular, no caso de OCN.

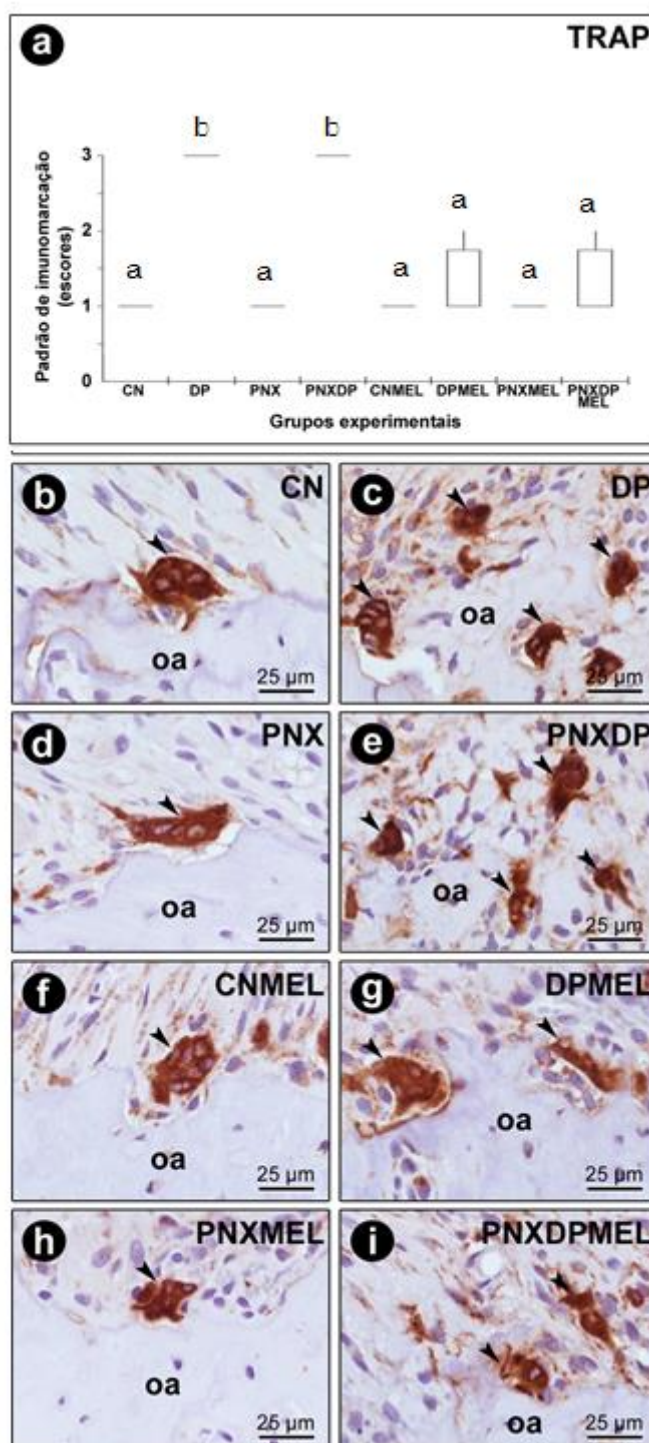
Com relação à imunomarcação para TRAP nos grupos CN, PNx, CNMEL, DPMEL, PNXMEL e PNxDPMEL prevaleceu um baixo padrão de imunomarcação (mediana = ESCORE 1), enquanto que nos grupos DP e PNxDP prevaleceu um alto padrão de imunomarcação (mediana = ESCORE 3).

Destaca-se que a imunomarcação para TRAP evidenciou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CN x DP, CN x PNxDP, DP x DPMEL e PNxDP x PNxDPMEL (Figura 11).

Com relação à imunomarcação para OCN nos grupos CN, PNx, CNMEL, DPMEL, PNXMEL e PNxDPMEL prevaleceu um alto padrão de imunomarcação (mediana = ESCORE 3), enquanto que nos grupos DP e PNxDP prevaleceu um baixo padrão de imunomarcação (mediana = ESCORE 1) (Figura 12). Também a imunomarcação para OCN apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CN x DP, CN x PNxDP, DP x DPMEL e PNxDP x PNxDPMEL.



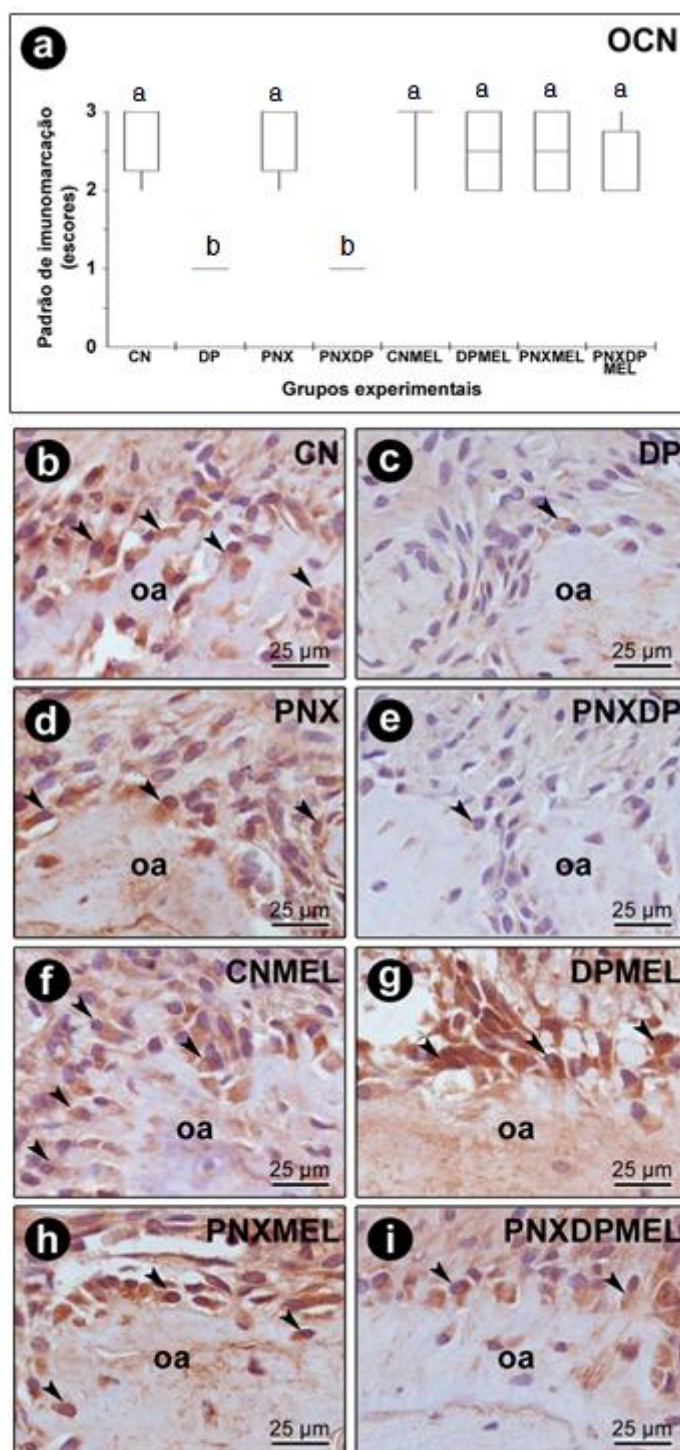
Figura 11. Padrão de imunomarcção para TRAP



Fonte: do autor

(a) mediana e o desvio interquartil dos escores atribuídos ao padrão de imunomarcção para TRAP. Teste estatístico: Kruskal Wallis, pós-teste de Dunn. (b - i) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP nos grupos CN (b), DP (c), PNx (d), PNxDp (e), CNMEL (f), DPmEL (g), PNxMEL (h) e PNxDpMEL (i). Símbolos: setas, células imunorreativas. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25  $\mu$ m. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. As letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos ( $p < 0,05$ ).

Figura 12. Padrão de imunomarcção para OCN.



Fonte: do autor

(a) mediana e o desvio interquartil dos escores atribuídos ao padrão de imunomarcção para OCN. Teste estatístico: Kruskal Wallis, pós-teste de Dunn. (b - i) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OCN nos grupos CN (b), DP (c), PNX (d), PNXDP (e), CNMEL (f), DPMEL (g), PNXMEL (h) e PNXDPMEL (i). Símbolos: setas, células imunorreativas. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25  $\mu$ m. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. As letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos ( $p < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que os ratos pinealectomizados com ou sem DP apresentaram aumento significativo nos níveis de TNF- $\alpha$ , mas somente os grupos com DP apresentaram perda óssea alveolar. Em contraste, os grupos submetidos à suplementação de melatonina apresentaram concentrações plasmáticas reduzidas de TNF- $\alpha$  e ausência de reabsorção óssea alveolar.

Os resultados indicam que não houve diferença estatística significativa na massa corporal e na ingestão alimentar entre os grupos ao longo dos 28 dias (Figura 3 e 4). Estudos semelhantes envolvendo modelos experimentais com DP (COLOMBO, 2012; MATTERA *et al.*, 2016) e pinealectomizados (ALONSO-VALE *et al.*, 2004; CASTRO *et al.*, 2002; FARIAS, 2010) corroboram os resultados do presente estudo, indicando que essas variáveis não alteraram o peso corporal e ingestão alimentar entre esses animais. Por outro lado, outros estudos (SAAD; REIS, 2004; FERREIRA, 2014), considerando um tempo maior após a pinealectomia (90 dias) utilizada em relação ao presente estudo, mostraram que a pinealectomia promove aumento do peso corporal. Essa diferença no tempo de realização do experimentos após a pinealectomia pode explicar a falta de alterações significativas no peso corporal dos animais pinealectomizados em relação ao grupo controle.

Deve-se destacar que diversos estudos apontam influencia da MEL no comportamento alimentar em mamíferos. Em um estudo com ratos pinealectomizados e suplementados com MEL (BUONFIGLIO *et al.*, 2018) não foram observados diferenças na ingestão alimentar e no peso corporal entre os grupos pinealectomizados e controle após 13 semanas de estudo. Entretanto, nos animais tratados com melatonina, na água de beber durante a fase escura, apresentaram redução no peso corporal e na ingestão alimentar a partir da 9ª semana. Montano *et al.*, (2010) verificou que a suplementação via oral de melatonina durante 4 semanas causou saciedade levando a uma diminuição no consumo alimentar, alterando a frequência e a duração das refeições desses animais. Em um outro trabalho com ratos idosos e obesos (ZANUTO *et al.*, 2013) verificou que a MEL, via oral na água de beber durante 12 semanas, reduziu o consumo alimentar acompanhada de queda no peso corporal. Sabe-se que a pineal de roedores recebe densa inervação de áreas hipotalâmicas como o núcleo paraventricular e o hipotálamo lateral que estão

envolvidas no comportamento alimentar (SIMMONEAUX; RIBELAYGA, 2003) e que em humanos os receptores de melatonina MT1 são amplamente expressos na região hipotalâmica responsáveis pela regulação central do consumo alimentar e termogênese (WU et al., 2006). Assim, os estudos apontam que em longo prazo, a MEL tem grande influência em modular o balanço energético, controlando o peso corporal.

Além da influência da MEL sobre o balanço energético, estudos apontam ações da MEL em processos inflamatórios, como a DP, que contribuem para o aumento dos níveis de mediadores inflamatórios local e sistêmico, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-6 (COLOMBO, 2012; HERNÁNDEZ et al., 2011; KARA et al., 2013). Entretanto, o presente estudo observou que não houve nenhuma alteração nas concentrações plasmáticas de IL-6 entre os grupos avaliados (Figura 6). Com relação aos resultados do grupo controle e com DP, observamos que estão de acordo com os dados da literatura que não identificou diferenças entre esses dois grupos (COLOMBO, 2012).

Estudos que investigaram as concentrações plasmáticas de IL-6 em modelos de DP são contraditórios. Em um estudo de Takahashi et al., (1994) que analisou os níveis séricos e a expressão gênica de IL-6 nos tecidos gengivais de pacientes saudáveis ou com periodontite, não foi observado diferença significativa nos níveis séricos entre os indivíduos com DP e saudáveis. Entretanto, os autores verificaram aumento na expressão gênica de IL-6 nos tecidos gengivais inflamados, sugerindo que as células não linfóides presentes no local da inflamação podem contribuir para a patogênese da DP por meio da produção de IL-6. Por outro lado, estudos em humanos com DP observaram aumento na expressão de IL-6 nos espécimes de tecido periodontal (ROSS *et al.*, 2010) e das concentrações plasmáticas de IL-6 (BRETZ *et al.*, 2005) nos indivíduos com DP. Dentro deste contexto, estudos que analisaram a IL-6 em modelo de DP são controversos. Isto pode ser devido ao horário de coleta de sangue, pois a concentração de IL-6 se altera ao longo do dia (BAUER *et al.*, 1994; LISSONI *et al.*, 1998).

Por outro lado, no presente estudo observou-se um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  em animais dos grupos DP, PNX e PNXDP quando comparados aos outros grupos (Figura 5). Assim, as elevadas concentrações de TNF- $\alpha$ , associadas com respostas imune e inflamatória, podem ter contribuído com a perda óssea alveolar nos animais com DP do presente estudo.

Esse aumento de TNF- $\alpha$  promove aumento de espécies reativas de oxigênio, o qual causa danos nos tecidos, elevando ainda mais os mediadores inflamatórios e formando um círculo vicioso (BLASER et al.; 2016; DAHIYA et al., 2013). Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas no processo de osteoclastogênese (GARRETT et al., 1990). Lee et al. (2005), verificou que a produção de espécies reativas de oxigênio induzida por RANKL em células da medula óssea, estimulou a diferenciação osteoclástica, por regular a via de sinalização de RANKL, incluindo a c-Jun N-terminal quinase (JNK) e MAP quinase (p38), que são necessárias para a diferenciação osteoclástica. E ao utilizar um antioxidante (N- acetil cisteína) houve uma diminuição de espécies reativas de oxigênio induzida por RANKL, atenuando o processo de osteoclastogênese. Ademais, em um processo inflamatório como a DP, as respostas imunes do hospedeiro e ações das bactérias presentes no biofilme também geram quantidades consideráveis de espécies reativas de oxigênio que acentuam a destruição dos tecidos da cavidade oral (GUSTAFSSON; ASMAN, 1996; KIMURA; YONEMURA; KAYA, 1993), promovendo aumento da osteoclastogênese. Portanto, a produção de mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$  estimulam a osteoclastogênese (LIU; LERNER; TENG, 2010; NAKASHIMA et al., 2000).

Já está bem estabelecido na literatura que na DP há aumento de mediadores inflamatórios, como o TNF- $\alpha$  (COLOMBO et al., 2012; HERNÁNDEZ et al., 2011; KARA et al., 2013), que acentua o processo inflamatório causando danos nos tecidos do periodonto. Ainda, destaca-se que em todos os parâmetros ósseos analisados verificou-se que os animais com DP apresentaram reabsorção óssea alveolar acentuada. Diversos estudos demonstram que os grupos com DP apresentam maior reabsorção óssea alveolar (ARABACI et al., 2015; COLOMBO et al., 2012; MATTERA et al., 2016; RICOLDI et al., 2017).

Diferentes modelos experimentais de doenças ósseas inflamatórias tem apontado que o TNF- $\alpha$  causa osteoclastogênese. Mucci et al., (2012) verificou em um estudo *in vitro*, em um modelo químico da doença de Gaucher, que a infusão de TNF- $\alpha$  promoveu osteoclastogênese. Kudo et al., (2002) verificou que o TNF- $\alpha$  pode estimular diretamente a formação de osteoclastos humanos a partir de precursores de fagócitos mononucleares por um mecanismo independente de RANKL. Assim, em um processo inflamatório as elevadas concentrações de TNF- $\alpha$  associada ao aumento de

espécies reativas de oxigênio são os principais fatores que acentuam esse processo inflamatório levando a destruição dos tecidos ósseos (BLASER et al.; 2016; KIMURA; YONEMURA; KAYA, 1993).

Por outro lado, os grupos tratados com melatonina apresentaram níveis plasmáticos reduzidos de TNF- $\alpha$  e menor reabsorção óssea alveolar quando comparados aos grupos DP sem MEL. Diversos estudos demonstraram redução das concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  após tratamento com MEL. Em um estudo em ratos (LI et al., 2015) analisaram os níveis séricos de MEL e de mediadores pró-inflamatório incluindo o TNF- $\alpha$  durante 5 dias após a indução de pulpíte aguda e observaram um aumento significativo do TNF- $\alpha$  e diminuição dos níveis séricos de MEL nesses animais, enquanto a administração de MEL (10 mg/Kg, via intraperitoneal, durante cinco dias) diminuiu os níveis séricos de TNF- $\alpha$ . A MEL também reduziu significativamente as concentrações plasmática de TNF- $\alpha$  em camundongos com senescência acelerada ou resistentes a senescência quando submetidos ao tratamento crônico com MEL (10 mg/Kg, na água de beber, entre 1 a 10 meses), apontando que a melatonina pode ter aplicabilidade clínica potencial para alguns distúrbios relacionados à idade (RODRIGUEZ et al., 2007). Em um outro estudo com ratas ovariectomizadas e pinealectomizadas (OZTEKIN et al., 2006) também observaram, após administração de MEL (3 mg/ kg, via intraperitoneal, durante 4 semanas), menor concentração plasmática de TNF- $\alpha$ . Os estudos citados acima, evidenciam os benefícios do tratamento com MEL no controle de um processo inflamatório, por atenuar a produção de TNF- $\alpha$ . Ressalta-se, que no presente estudo o tratamento com MEL nos grupos DP, PNx e PNxDP foi capaz de reduzir a concentração desta citocina.

Esse efeito da MEL sobre os níveis de TNF- $\alpha$ , envolve alguns mecanismos apontados pela literatura. Entre eles, destaca-se que a melatonina possui efeitos anti-inflamatórios, por meio da inibição do rolamento e da adesão de neutrófilos (MARKUS et al., 2007). Lotufo et al., (2001), demonstraram que ativação de receptores de melatonina (MT2) pela melatonina e seu precursor N-acetil-serotonina inibiu a resposta inflamatório aguda na microcirculação de ratos por inibir tanto a adesão quanto o rolamento de leucócitos, resultando na diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Desta forma, a MEL atenua a produção de

mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , por amenizar a etapa inicial de um processo inflamatório.

Neste contexto, Markus et al., (2007) aponta existir uma relação bidirecional entre a glândula pineal e o sistema imune. Em um estudo de Fernandes et al., (2006) que analisou o efeito do TNF- $\alpha$  (30ng/mL, 30 min a 48 h) na transcrição dos genes da proteína AA-NAT, enzima chave na biossíntese de melatonina, em glândulas pineais desnervadas de ratos e estimulados por 5 horas com norepinefrina, verificou que a codificação da enzima AANAT foi inibida pelo TNF- $\alpha$ . Contudo, esta inibição foi transitória, e uma nova pré-incubação de TNF- $\alpha$  durante mais de 24 horas não apresentou efeito detectável. Estes dados suportam a hipótese de que o aumento noturno da MEL é prejudicado no início de uma resposta inflamatória e restaurado durante a finalização de uma resposta aguda ou em uma patologia inflamatória crônica. Em um outro estudo (PONTES et al., 2007), comparou a secreção diurna e noturna de melatonina e citocinas (TNF- $\alpha$ ) no colostro e no leite por 30 dias, de mulheres que deram à luz por parto vaginal ou cesárea, e observaram que o aumento de TNF- $\alpha$  após a cirurgia de cesariana resultou na supressão de MEL noturna.

A inibição da síntese de MEL, via glândula pineal, pelo TNF- $\alpha$  ocorre pela ativação do fator de transcrição NF-kappa B (NF-kB) (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2012; FERNANDES et al., 2006). O NF-kB é constituído por homo ou heterodímeros de cinco proteínas Rel diferentes, p65 (RelA), p50 (NF-kB1), p52 (NF-kB2), c-Rel e RelB. Em células não estimuladas, o NF-kB está presente no citoplasma em uma forma inativa ligada às proteínas inibidoras kB (I $\kappa$ B) (KARIN; BEN-NERIAH, 2000). Após estimulação, com uma ampla gama de estímulos, incluindo o LPS, a I $\kappa$ B se torna fosforilada, ubiquitinada e depois degradada. Então, os dímeros NF-kB ativados são translocados para o núcleo, ligam-se aos sítios de ligação a kB nas regiões promotoras genes-alvo, e induz a transcrição de vários mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- $\alpha$  (COVERT et al., 2005; CHOI et al., 2011; DA SILVEIRA-CRUZ et al., 2010; KARIN; BEN-NERIAH, 2000).

Em um estudo de Da Silveira-Cruz et al., (2010) verificaram na glândula pineal de ratos fêmeas a presença de receptores para o LPS (CD14 e receptor de tipo Toll 4 - TLR4) e sua capacidade de desencadear a via do NF-kB, induzindo síntese local de TNF- $\alpha$  e do receptor de TNF 1 (TNFR1). Assim, durante a montagem de uma resposta imune inata, a ativação dos receptores TLR4 / CD14 por LPS induz a

translocação nuclear dos dímeros do NF- $\kappa$ B p50/p50 e p50/pRelA, que leva à expressão de TNF em glândulas cultivadas, aumentando a expressão de TNFR1 em pinealócitos e inibição da via biossintética da melatonina estimulado pelo TNF- $\alpha$  que promove a translocação nuclear dos dímeros p50/p50 do NF $\kappa$ B inibindo a transcrição da enzima AA-NAT.

Por outro lado, a melatonina inibe a ligação do NF- $\kappa$ B ao DNA, pois altera a translocação deste fator de transcrição para o núcleo (CHUANG et al., 1996; NEGI; KUMAR; SHARMA, 2011; SZCZEPANIK, 2007). Em um estudo que investigou os efeitos da melatonina na produção de mediadores inflamatórios por macrófagos estimulados com LPS (CHOI et al., 2011) verificaram que a via do NF- $\kappa$ B foi inibida pela melatonina por meio da inibição da translocação e atividade de ligação ao DNA da subunidade p50 do NF- $\kappa$ B. Em um outro estudo (NEGI; KUMAR; SHARMA, 2011) verificou em ratos com neuropatia diabética induzida pela estreptozotocina que doses diárias de melatonina (3 ou 10 mg/kg) modulou o processo de neuroinflamação por diminuir a ativação da via NF- $\kappa$ B, ao reduzir a expressão de NF- $\kappa$ B (p65), I $\kappa$ B- $\alpha$  e I $\kappa$ B- $\alpha$  fosforilado e diminuir os níveis de TNF- $\alpha$ . Portanto, esses estudos evidenciam os possíveis mecanismos que a MEL atenua o processo inflamatório inibindo a via do NF- $\kappa$ B.

Com relação aos efeitos da pinealectomia sobre parâmetros ósseos, especialmente sobre o osso alveolar, são escassos. Os resultados do presente estudo verificou que a pinealectomia (PNX) não afetou os parâmetros ósseos analisados. Ressalta-se que devido a importância da MEL sobre o metabolismo ósseo, seria esperado que nos animais pinealectomizados houvesse reabsorção óssea. Entretanto, tal fato não foi observado e ainda destaca-se que a associação entre a pinealectomia e DP não incrementou reabsorção óssea alveolar. Podemos aventar, que esse resultado (grupo PNXDP) pode ser decorrente da produção de MEL local por células do sistema imune (como os linfócitos), agindo como substância autócrina e/ou parácrina coordenando a resposta imune local (MARKUS *et al.*, 2007; CARRILLO-VICO *et al.*, 2005) atenuando o processo inflamatório exacerbado causado pela DP.

A falta de diferenças sobre os parâmetros ósseos analisados no presente estudo nos animais pinealectomizados também pode ser devido ao menor período avaliado depois da pinealectomia (48 dias; 20 dias de recuperação após a cirurgia e



28 dias do protocolo de DP) em relação aos trabalhos da literatura. Diversos estudos verificaram alterações no metabolismo óssea em animais pinealectomizados, utilizando outras espécies animais e/ou locais ósseos diferentes ao analisado no presente trabalho. Em um estudo com ovelhas (ERGERMANN et al., 2011) observaram na crista ilíaca após seis meses da pinealectomia diminuição do volume ósseo percentual (BV/TV), aumento da separação trabecular (Tb.Sp) e diminuição da espessura trabecular (Tb.Th) indicando reabsorção óssea. Ostrowska et al., (2002) verificou em ratos fêmeas após 18 semanas da pinealectomia maior atividade de fosfatase alcalina e propeptídeo carboxiterminal do procolágeno tipo I indicando prejuízos na qualidade óssea. E conforme descrito anteriormente, em ratos machos após 90 dias de da pinealectomia, (SAAD; REIS, 2004) verificaram na tibia, menor espessura do disco epifisário e espessura da tábua óssea. Em outro estudo com frangos (TURGUT et al., 2006) observaram após 8 semanas da pinealectomia, escoliose severa decorrente ao processo de degeneração do disco intervertebral. Destaca-se que tais alterações ósseas, observadas nos estudos acima decorrente da pinealectomia, ocorreram após um tempo maior ao utilizado no presente estudo depois da pinealectomia.

No presente estudo, os grupos DP e PNXPDP apresentaram um baixo padrão de imunomarcção para OCN, indicando baixa atividade dos osteoblastos nesses grupos. Por outro lado, houve um alto padrão de imunomarcção para TRAP, o qual é um marcador de reabsorção óssea indicando aumento da atividade dos osteoclastos (BLUMSOHN; EASTELL, 1997; WHEATER et al., 2013). Destaca-se que nos grupos DP tratados com melatonina (PNXPDPMEL e DPMEL) essas imunomarcções apresentaram um padrão próximo ao do grupo CN, indicando que a melatonina protegeu esses animais da reabsorção óssea, favorecendo a formação óssea alveolar.

Em geral, há evidências substanciais de que a melatonina pode ser benéfica ao osso. Em um estudo de Arabaci et al., (2015) que investigou os efeitos da administração sistêmica de melatonina (10 mg/kg, intraperitoneal por 15 dias) na reabsorção óssea alveolar em modelo de periodontite experimental em ratos, verificou no grupo tratado com MEL menor atividade osteoclástica, caracterizada por meio da redução do RANKL, quando comparado ao grupo controle. Histing et al., (2012) analisou o efeito da melatonina na formação de calos, remodelação óssea e expressão de RANKL e OPG em um modelo de fratura de fêmur estavelmente fixo em

camundongos e verificaram expressão significativamente reduzida de RANKL e número reduzido de células positivas para TRAP dentro do calo da fratura, destacando que a melatonina afeta o processo de remodelação durante a cicatrização da fratura. Muñoz et al., (2009) demonstraram que a aplicação tópica de melatonina e hormônio de crescimento acelera a consolidação óssea em torno de implantes dentários em cães. Cutando et al., (2008) também mostraram um aumento significativo da formação óssea e da densidade óssea após a aplicação tópica de melatonina em implantes dentários em cães, postulando que a melatonina aumenta a osteointegração. Em um ensaio clínico controlado randomizado (EL-GAMMAL et al., 2016) verificaram que a aplicação local de melatonina em gel no local da osteotomia melhorou a estabilidade dos implantes dentários e atenuou a reabsorção óssea.

Diversos estudos indicam que a melatonina aumenta a formação óssea por meio de suas ações estimulantes na diferenciação dos osteoblastos (RADIO; DOCTOR; WITT-ENDERBY, 2006; ROTH et al., 1999; SETHI et al., 2010; PARK et al. 2011), ativando os receptores de melatonina 2 (MT<sub>2</sub>) nos osteoblastos, aumentando a atividade das vias de sinalização da MAPKs e beta-catenina, que estimula a osteoblastogênese por aumentar a expressão gênica de runt-related transcription factor 2 (Runx2) que induz a expressão osteogênica incluindo osterix, proteínas morfogenética óssea-2 (Bmp-2), e OCN (MARIA; WITT-ENDERBY, 2014; PARK et al. 2011). Evidências indicam que a melatonina também influencia inibindo diferenciação dos osteoclastos, por suprimir a expressão do ligante ativador do receptor de NFκB (RANKL) (KOYAMA et al., 2002).

Estudos apontam que os níveis de melatonina salivar e gengival diminuem em indivíduos com periodontite em comparação com sujeitos clinicamente saudáveis, indicando que a melatonina pode desempenhar um papel protetor contra a DP (CUTANDO et al., 2006; SRINATH AC; HARYA; THAKUR, 2010). A diminuição dos níveis de melatonina salivar nas doenças periodontais podem ocorrer em resposta ao aumento do estresse oxidativo e ataque bacteriano, esgotando-a na cavidade oral (BERTL et al., 2013), reforçando sua ação antioxidante e captadora de radicais livres.

Assim, a melatonina atua favorecendo a formação óssea, contribuindo na homeostase deste tecido. Além disso, a MEL contribui com a neutralização de grande parte dos radicais livres, por meio de mecanismos não dependentes de receptor, estimulando a atividade de enzimas antioxidantes como glutatona redutase,

superóxido dismutase e glutathione peroxidase reduzindo assim a destruição lipídica das células e danos oxidativos ao DNA, apresentando uma importante ação antioxidante (REITER et al., 1998).

Logo, a melatonina favorece a formação óssea promovendo a diferenciação osteoblástica e agindo como um sequestrador (“scavengers”) de radicais livres com propriedades antioxidantes (CENGIZ; CENGIZ; WANG, 2012; GALANO; TAN; REITER, 2011; MARIA; WITT-ENDERBY, 2014).

Portanto, este estudo evidenciou que a melatonina inibe significativamente a reabsorção óssea alveolar na DP induzida em ratos, sugerindo que a melatonina pode ter funções terapêuticas e protetivas nas doenças da cavidade oral.

## **6 CONCLUSÃO**

Com base nos resultados do presente estudo, verificou-se que os animais pinealectomizados e com DP apresentaram elevada concentração de TNF- $\alpha$ , mas a perda óssea alveolar ocorreu apenas nos animais com DP. A pinealectomia não promoveu alteração óssea como também, não agravou esse parâmetro em animais com DP. A suplementação com melatonina promoveu diminuição de TNF- $\alpha$  nos animais pinealectomizados e com DP. Em todos os grupos com DP a melatonina protegeu-os da reabsorção óssea alveolar. Portanto, estes resultados demonstram que a melatonina é eficiente no controle tanto da reabsorção óssea alveolar como da concentração plasmática de TNF- $\alpha$  em ratos com DP e PNX, demonstrando sua importância local e sistêmica.

## REFERÊNCIAS

- ABDOSALMADI, H. et al. Reduction of Melatonin Level in Patients with Type II Diabetes and Periodontal Diseases. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**. v. 8, n. 3, p. 160-165, 2014.
- ARABACI, T.; KERMEN, E.; ÖZKANLAR, S. et al. Therapeutic Effects of Melatonin on Alveolar Bone Resorption After Experimental Periodontitis in Rats: A Biochemical and Immunohistochemical Study. **J. Periodontol.** v.86, p.874-881, 2015.
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; VENEGAS, C.; DÍAZ-CASADO, ME.; LIMA-CABELLO, E.; LÓPEZ, LC.; ROSALES-CORRAL, S.; TAN, DX.; REITER, RJ. Extrapineal MEL: sources, regulation, and potential functions. **Cell Mol Life Sci.** V.71, p. 2997-3025, 2014.
- AHMAD, R.; HALDAR, C. Melatonin and androgen receptor expression interplay modulates cell-mediated immunity in tropical rodent *Funambulus pennanti*: an in-vivo and in-vitro study. **Scand J Immunol.** v. 71, N. 6, P. 420-430, 2010.
- ALI, J. et al. Autoimmune responses in periodontal diseases. **Autoimmun Rev.** v. 7, n. 10, p. 426-431, 2011.
- 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.
- AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol Med Lab.** v. 42, n.1, p. 5-12, 2006.
- AMSTRUP, A. K. et al. Melatonin and skeleton. **Osteoporos International.** v. 24, p. 2919-2927, 2013.
- ARABACI, T. et al. Therapeutic effects of melatonin on alveolar bone resorption after experimental periodontitis in rats: a biochemical and immunohistochemical study. **J Periodontal**, v. 86, n. 7, p. 874-881, 2015.
- BARTOLD, P. M.; WIEBKIN, O. W.; THONARD, J. C. The effect of oxygen-derived free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid. **J Periodontal Res.** V. 19, p. 390-400, 1984.
- BARROS, J.M. O osso como órgão endócrino. Porto, Maio, 2011.
- BATTINO, M.; BULLON, P.; WILSON, M.; NEWMAN, H. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.** V.10, p. 458-476, 1999.
- 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.

BERTL, K.; SCHOIBER, A.; HARIRIAN, H. et al. Non-surgical periodontal therapy influences salivary melatonin levels. **Clin Oral Invest**. v.17, p.1219–1225, 2013.

BLASER, H.; DOSTERT, C.; MAK, T. W.; BRENNER, D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. **Trends Cell Biol**. V. 26, n. 4, p. 249-261, 2016.

BLUMSOHN, A.; EASTELL, R. The performance and utility of biochemical markers of bone turnover: do we know enough to use them in clinical practice? **Am Clin Biochem**. v. 34, p. 449-459, 1997.

BOYCE, B. F. et al. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. **Eur J Clin Invest**. v. 42, n. 12, p. 1332-1341, 2012.

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.

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.

BUBENIK, G. A.; KONTUREK, S. J. Melatonin and aging: prospects for human treatment. **J Physiol Pharmacol**. v. 62, n. 1, p. 13-19, 2011.

BURCH, J. B. et al. Melatonin, sleep and shift work adaptation. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**. v. 47, n. 9, p. 893-901, 2005.

BURGESS, T. L. et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. **J Cell Biol**. v. 145, n.3, p. 527-538, 1999.

BULLON, P.; CHANDLER, L.; SEGURA EGEA, J. J.; PEREZ CANO, R.; MARTINEZ SAHUQUILLO, A. Osteocalcin in serum, saliva and gingival crevicular fluid: their relation with periodontal treatment outcome in postmenopausal women. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. V.12 p.193-7, 2007.

BUONFGLIO, D.; PARTHIMOS, R.; DANTAS, R. et al. Melatonin absence leads to long-Term leptin resistance and Overweight in rats. **Front. Endocrinol**. v. 9, p.1-12, 2018.

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, 06/2002 2002.

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

CARRILLO-VICO et al. 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, 2005.

CENGIZ MI, CENGIZ S, WANG HL. Melatonin and oral cavity. **International Journal of Dentistry**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

CHEN, H.; SENDA. T.; KUBO, K. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. **Med Mol Morphol**. v. 48, n.2, p. 61-68, 2015.

CHOI, E. Y.; JIN, J. Y.; LEE, J. Y. et al. Melatonin inhibits Prevotella intermedia lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and interleukin-6 in murine macrophages by suppressing NF- $\kappa$ B and STAT1 activity. **J. Pineal Res**. V.50, p.197-206, 2011.

CHUANG, J. I.; MOHAN, N.; MELTZ, M. L.; REITER, R. J. Effect of melatonin on nf- $\kappa$ B dna-binding activity in the rat spleen. **Cell Biology International**. v. 20, n.10, p.687-692, 1996.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S. C.; Glândula Pineal: in Aires, M. M. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 1046-1053, 2012.

COCHRAN, D. L. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. **Journal of Periodontol**. v. 79, n. 8 (suppl.), p. 1569-1576, 2008.

COLOMBO, N.H. **Avaliação do sinal insulínico em ratos com doença periodontal**. 2012. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

COVERT, M. W.; LEUNG, T. H.; GASTON, J. E. et al. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. **Science**. V.309, p.1854–1857, 2005.

CUTANDO, A.; GALINDO, P.; GÓMEZ-MORENO, G. et al. Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. **J Periodontol**. v.77, p.1533-1538, 2006.

CUTANDO, A. et al. Melatonin: Potential Functions in the Oral Cavity. **J Periodontol**. v. 78, n. 6, p. 1094-1102, 2007.

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

DAHIYA, P.; KAMAL, R.; GUPTA, R.; BHARDWAJ, R.; CHAUDHARY, K.; KAUR, S. Reactive oxygen species in periodontitis. **Journal of Indian Society of Periodontology**. v. 17, n.4, p. 411-416, 2013.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; CARVALHO SOUSA, C. E.; TAMURA, E. et al. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. **J. Pineal Res.** v.49, p.183-192, 2010.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; PINATO, L.; TAMURA, E. K.; CARVALHO-SOUSA, C. E.; MARKUS, R. P. Glia-Pinealocyte Network: The Paracrine Modulation of Melatonin Synthesis by Tumor Necrosis Factor (TNF). **PLoS ONE**. v.7, n.7, p.1-7, 2012.

DAWSON, D.; ARMSTRONG, S. M. Chronobiotics-drugs that shift rhythms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, n. 1, p. 15-36, 1996.

DI BENEDETTO, A.; GIGANTE, I.; COLUCCI, S.; GRANO, M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol*. p, 503754. 2013.

DIJK, D. J. et al. Amplitude reduction and phase shifts of melatonin, cortisol and other circadian rhythms after a gradual advance of sleep and light exposure in humans. **PloS One**, v. 7, n. 2, p. e3037, jan. 2012.

DUCY, P. The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism. **Diabetologia**. v.54, p. 54:1291-1297, 2011.

EGERMANN, M. et al. Pinealectomy affects bone mineral density and structure - an experimental study in sheep. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 271, n.12, p. 1-9, 2011.

EL-GAMMAL, M. Y.; SALEM, A. S.; ANEES, M. M.; TAWFIK, M. A. Clinical and Radiographic Evaluation of Immediate Loaded Dental Implants With Local Application of Melatonin: A Preliminary Randomized Controlled Clinical Trial. **Journal of Oral Implantology**. v.42 , n.2, p. 119-125, 2016.

FARIA, P. E.; OKAMOTO, R.; BONILHA-NETO, R. M. et al. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. **Clin. Oral Implants Res.** v.19, n. 4, p. 393-401, 2008.

FARIAS, T. S. M. **Caracterização do perfil diário da lipólise e lipogênese no tecido adiposo de ratos adultos e a influência da pinealectomia**. 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Biofísica) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FENN, A. M.; FONKEN, L. K.; NELSON, R. J. Sustained melatonin treatment blocks body mass, pelage, reproductive, and fever responses to short day lengths in female Siberian hamsters. **J Pineal Res.** v. 51, n. 2, p. 180-186, 2011.

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.

FERREIRA R. F. D. **Efeitos da reposição terapêutica central de melatonina em animais pinealectomizados - implicações no comportamento alimentar e peso corporal**. 2015. 50 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

FOLKARD, S. Do permanent night workers show circadian adjustment? A review based on the endogenous melatonin rhythm. **Chronobiology International**, v. 25, n. 2, p. 215-24, 2008.

GALANO, A.; TAN, D.X; REITER, R.J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. **J Pineal Res**, v.51, p. 1-16, 2011.

GALLI, C.; PASSERI, G.; MACALUSO, G. M. FoxOs, Wnts and oxidative stress-induced bone loss: New players in the periodontitis arena? **J Periodontal Res**, v.46, p. 397-406, 2011.

GARCIA-MAURIÑO, S.; GONZALEZ-HABA, M. G.; CALVO, J. R.; RAFII-EL-IDRISSI, M.; SANCHEZ-MARGALET, V.; GOBERNA, R.; GUERRERO, J. M. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. **J. Immunol.**, v. 159, n. 2, p. 574-581, 1997.

GARLET, G. P.; CARDOSO, C. R.; SILVA, T. A. et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. **Oral Microbiology and Immunology**. v. 21, p.12-20, 2006.

GARRETT, I. R.; BOYCE, B. F.; OREFFO, R. O.; BONEWALD, L.; POSER, J.; MUNDY, G. R. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. **J Clin Invest**. v.85, p.632-639,1990.

GUERRERO, J. M.; REITER, R. J. Melatonin-immune system relationships. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v. 2, n. 2, p. 167-179, 2002.

GUSTAFSSON, A.; ASMAN, B. Increased release of free oxygen radicals from peripheral neutrophils in adult periodontitis after Fcg-receptor stimulation. **J Clin Periodontol**. v. 23, p.38-44, 1996.

HAN, Y.; YOU, X.; XING, W.; ZHANG, Z.; ZOU, W. Paracrine and endocrine actions of bone-the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. **Bone Reseach**. v. 6, n. 16, p.1-11, 2018.

HANSEN, A. M.; GARDE, A. H.; HANSEN, J. Diurnal urinary 6-sulfatoxymelatonin levels among healthy Danish nurses during work and leisure time. **Chronobiology International**, v. 23, n. 6, p. 1203-15, 2006.



HARDELAND, R. et al. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in Neurobiology**, London, v. 93, n. 3, p. 350-384, mar. 2011.

HARDELAND, R.; FUHRBERG, B. Ubiquitous melatonin – Presence and effects in unicells, plants and animals. **Trends in Comparative Biochemistry & Physiology**, v. 2, p. 25-45, 1996.

HAUS, E.; SMOLENSKY, M. Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. **Cancer Causes & Control**, v. 17, n. 4, p. 489-500, 2006.

HENRIKSEN, K. et al. Osteoclast activity and subtypes as a function of physiology and pathology-implications for future treatments of osteoporosis. **Endocrine Reviews**. v.32, n. 1, p. 31-63, 2011.

HERNÁNDEZ, M. et al. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. **J. Dent. Res.**, v. 90, n. 10, p. 1164-1170, 2011.

HISTING, T. et al. Melatonin Impairs Fracture Healing by Suppressing RANKL-Mediated Bone Remodeling. **Journal of Surgical Research**. V. 173, p. 83–90, 2012.

HOFFMAN, R. A.; REITER, R. J. Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. **Anat Rec**. v. 53, p. 19-22, 1965.

HSU, H. et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. **Proc. Natl. Acad. Sci**. v. 96, p.3540-3545, 1999.

IACOPINO, A. M.; CUTLER, C. W. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 8, p. 1375-1384, 2000.

KAJIYA, M.; GIRO, G.; TAUBMAN, M. A. et al. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. **J Oral Microbiol**. v. 2, p.5532, 2010.

KAMIOKA, H.; HONJO, T.; TAKANO-YAMAMOTO, T. A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. **Bone**. v. 28, p. 145-149, 2001.

KARA, E.; AKMAN, S.; OZKANLAR, S. et al. Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 55, p. 21-26, 2013.

KARASEK, M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. **Exp. Gerontol.**, v. 39, n.11-12, p. 1723-1729, 2004.

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of nf- $\kappa$ b activity. **Annual Review of Immunology**. V.18, p.621–663, 2000.

KAPPERS, J. A. The development, topographic relations and innervation of the epiphysis cerebral in the albino rat. **Zietch Zellforsh.** v.52, p.163-215, 1960.

KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. **Histologia e Biologia Celular – Uma Introdução à Patologia.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier Inc. cap. 4, p. 140, 2012.

KIM, K. H.; WOO, H. Y.; LIM, S. W. Association study of a serotonin receptor 2A gene –1438A/G polymorphism and anxiety-related traits. **Psychiatry Investig.**, v. 5, n. 4, p. 244-246, 2008.

KIMURA S, YONEMURA T, KAYA H. Increased oxidative product formation by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in human periodontal disease. **J Periodontal Res.** v.28, p.197-203, 1993.

KNOTHE-TATE, M. L. et al. The osteocyte. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 36, n. 1, p. 1-8, 2004.

KOSE, O. et al. Effects of Melatonin on Oxidative Stress Index and Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats With Periodontitis. **J Periodontol,** v. 87, n. 5, p. 82-90, 2016.

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

KUDO, O.; FUJIKAWA, Y.; ITONAGA, I.; SABOKBAR, A.; TORISU, T.; ATHANASOU, N. A. Proinflammatory cytokine (TNF $\alpha$ /IL-1 $\alpha$ ) induction of human osteoclast formation. **J Pathol.** v. 198, p.220-227, 2002.

KUMAR, K. R. et al. Assessment of high sensitivity C-reactive protein and lipid levels in healthy adults and patients with coronary artery disease, with and without periodontitis - a cross-sectional study. **J. Periodontal Res,** v. 49, n. 6, p. 836-44, 2014.

LACEY, D. L. et al. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. **Cell.** v. 93, p. 165-176, 1998.

LALLA, E. et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. **J. Clin. Invest.,** v. 105, n. 8, p. 1117-1124, Apr. 2000.

LALLA, E.; LAMSTER, I. B.; SCHMIDT, A. M. Enhanced interaction of advanced glycation end products with their cellular receptor RAGE: implications for the pathogenesis of accelerated periodontal disease in diabetes. **Ann. Periodontol.,** v. 3, n. 1, p. 13-19, Jul. 1998.

LEE, N. K., CHOI, Y. G., BAIK, J. Y., HAN, S. Y., JEONG, D., BAE, Y. S., KIM, N., LEE, S. Y. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood Journal*, v. 106, n. 3, p. 852 – 859, 2005.

LERNER, U. H. Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. **Journal of Dental Research**. V.85, n.7, p.584-595, 2006.

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.

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.

LIU, Y. C. G.; LERNER, U. H.; TENG, Y. T. A. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. **Periodontology 2000**. v. 52, p.163-206, 2010.

LOTUFO, C. M. C.; LOPES, C.; DUBOCOVICH, M. L.; FARSKY, S. H. P.; MARKUS, R. P. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. **Eur J Pharmacol**. v. 430, p.351-357, 2001

MARIA, S.; WITT-ENDERBY, P. A. Melatonin effects on bone: potential use for the prevention and treatment for osteopenia, osteoporosis, and periodontal disease and for use in bone-grafting procedures. **J. Pineal Res**. v. 56, p. 115-125, 2014.

MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S.; FERNANDES, P. A. C. M.; CECON, E. The Immune-Pineal Axis: A Shuttle between Endocrine and Paracrine Melatonin Sources. **Neuroimmunomodulation**. v.14, p.126-133, 2007.

MATTERA, M. S. L. C.; CHIBA, F. Y.; MOTA, M. S. O.; PEREIRA, R. F. ERVOLINO, E.; NETO, A. H. C. et al. Maternal periodontitis decreases plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle of adult offspring. **Life Sciences**. v.148, p.194-200, 2016.

MAYO, J. C. et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. **Journal of Neuroimmunology**. v. 165, p. 139-149, 2005.

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

MELO, R. M. **Efeitos da suplementação com melatonina e do treinamento físico aeróbio sobre o perfil metabólico de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina**. 2012. 75 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MOLLER, M. Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. **Microsc Res Technol**. v.21, p.188-204, 1992.

MONTANO, M. E.; MOLPECERES, V.; MAURIZ, J. L. et al. Effect of melatonin supplementation on food and water intake in streptozotocin-diabetic and non-diabetic male Wistar rats. **Nutr Hosp**. v. 25, n.6, p. 931-938, 2010.

MORRISON, D. C.; RYAN, J. L. Endotoxins and disease mechanisms. **Annu Rev Med.** V. 38, p. 417-32, 1987.

MUÑOZ, F.; LÓPEZ-PEÑA, M.; MIÑO, N.; GÓMEZ-MORENO, G.; GUARDIA, J.; CUTANDO, A. Topical application of melatonin and growth hormone accelerates bone healing around dental implants in dogs. **Clin Implant Dent Relat Res.** V.14, n. 2, p.226-235, 2012.

MUCCI, J. M.; SCIAN, R.; FRANCESCO, P. N. et al. Induction of osteoclastogenesis in an in vitro model of Gaucher disease is mediated by T cells via TNF- $\alpha$ . **Gene.** v. 509, p.51–59, 2012.

NEGI, G.; KUMAR, A.; SHARMA, S. S. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF-kB and Nrf2 cascades. **J. Pineal Res.** v.50, p.124-131, 2011.

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.

OSTROWSKA, Z. et al: The influence of pinealectomy and melatonin administration on the dynamic pattern of biochemical markers of bone metabolism in experimental osteoporosis in the rat. **Neuro Endocrinol Lett.** V.23, s. 1, p. 104-109, 2002.

PANDI-PERUMAL, S.R. et al. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? **FEBS J.** v. 273, n. 13, p. 2813-2838, 2006.

PARK, K. H.; KANG, J. W.; LEE, E. M. et al. Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ERK/Wnt signaling pathways. **J Pineal Res.** v. 51, p.187-194, 2011.

PATTI, A.; GENNARI, L.; MERLOTTI, D.; DOTTA, F.; NUTI, R. Endocrine Actions of Osteocalcin. **International Journal of Endocrinology.** V.2013, p.1-11, 2013.

PEDROSA, A. M. et al. Melatonin protects CD4+ T cells from activation-induced cell death by blocking NFAT-mediated CD95 ligand upregulation. **J Immunol.** v. 184, n. 7, p. 3487-3494, 2010.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **The Lancet.** v. 366, n. 9499, p. 1809-1820, 2005.

POLO, T.O.B. **Avaliação do reparo ósseo na interface osso/implante em ratos pinealectomizados – análise histológica, imunoistoquímica, histométrica, biomecânica e por microct.** 2016. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

PONTES, G. N.; CARDOSO, E. C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M.; MARKUS, R. P. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after

cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. **J Pineal Res.** v. 43, n. 4, p.365-371, 2007.

RADIO, N. M.; DOCTOR, J. S.; WITT-ENDERBY, P. A. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity idifferentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. **J Pineal Res.** v.40, p.332-342, 2006.

RAISZ, L. G; SEEMAN, E. Causes of age-related bone loss and bone fragility: An alternative view. **J Bone Miner Res.** v. 16, p. 1948-1952, 2001.

RASLAN, S. A.; ALENCAR, C. O.; CORTELLI, J. R.; CORTELLI, S. C.; AQUINO, D. R. Presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em associação a *Prophyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em pacientes periodontais / Presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in association with *Prophyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in periodontal patients. **Rev Odontol UNESP.** V.40, p.304-309, 2011.

REITER, R. J. et al. Melatonin and reproduction revisited. **Biol Reprod.** v. 81, p. 445-456, 2009.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; QI, W. B. Suppression of oxygen toxicity by melatonin. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* V.19, n. 6, p. 575-81, 1998.

REPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; GODSON, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 17, n. 3, p. 100-102, 1996.

RICOLDI, M. S. T.; FURLANETO, F. A. C.; OLIVEIRA, L. F. F.; et al. Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. **PLoS ONE.** v.12, n.6, p.1-15, 2017.

RODINI, C. O.; BATISTA, A. C; DIONISIO, T. J; SANTOS, C. F.; CUNHA, F. Q. LARA, V. S. Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. **J Mol Histol.** v.39, p. 275-282, 2008.

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.

ROSENBERG, N.; ROSENBERG, O.; SOUDRY, M. Osteoblasts in Bone Physiology—Mini Review. **Rambam Maimonides Med J.** v. 3, n.2, p. e0013, 2012.

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.

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

RUCCI, N. Molecular biology of bone remodelling. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism.** v. 5, n. 1, p. 49-56, 2008.

SAAD, K.; REIS, L. C. Influencia da melatonina sobre o desenvolvimento corporal e ósseo de ratos. **Ver Med Minas Gerais.** V.14, n.4, p. 228-232, 2004.

SACK, R. L. et al. Human melatonin production decreases with age. **J Pineal Res.** v. 3, p. 379-388, 1986.

SANCHEZ-BARCELO, E. J.; MEDIAVILLA, M. D.; REITER, R. J. Scientific basis for the potential use of melatonin in bone diseases: osteoporosis and adolescent idiopathic scoliosis. **J Osteoporos.** p.1-10, 2010.

SCHOPPET, M.; PREISSNER, K. T.; HOFBAUER, L. C. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 22, n. 4, p. 549-553, 2002.

SETHI, S.; RADIO, N. M.; KOTLARCZYK, M. P. et al. Determination of the minimal melatonin exposure required to induce osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells and these effects on downstream signaling pathways. **J Pineal Res.** v.49, p.222-238, 2010.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. **Pharmacological Reviews.** v. 55, n.2, p. 325-395, 2003.

SLOMINSKI, R.M.; REITER, R.J.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.; OSTROM, R.S.; SLOMINSKI, A.T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. **Mol Cell Endocrinol.** V.351, p. 152-66, 2012.

SLOTS, J. BRAGD, L.; WIKSTROM, M. et al. The occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis and Bacteroides intermedius in destructive periodontal disease in adults. **J Clin Periodontol.** V. 13, p. 570-577, 1986.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; XIMENEZ-FYVIE, L.A.; FERES, M.; MAGER, D. Ecological consideration in the treatment of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis periodontal infections. **Periodontol 2000.** V. 20, p. 341-362, 1999.

SOSROSENO, W.; BIRD, P.S.; GEMMELL, E.; SEYMOUR, G.J. The role of CD4<sub>+</sub> cells in vivo on the induction of the immune response to Porphyromonas gingivalis in mice. **J Periodontol.** v.73, p. 1133-1140, 2002.

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.

- SOYSA, N. S.; ALLES, N. NF kappa beta functions in osteoclast. **Biochem Biophys Rev Commum.** V.378, p. 378:1-5, 2009.
- SRINATH, R.; ACHARYA, A. B.; THAKUR, S. L. Salivary and gingival crevicular fluid melatonin in periodontal health and disease. **J Periodontol.** v.81, p.277-283, 2010.
- STEINHILBER, D.; BRUNGS, M.; WERZ, O.; WIESENBERG, I.; DANIELSSON, C.;KAHLEN, J. P.; NAYERI, S.; SCHRÄDER, M.; CARLBERG, C. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. **J. Biol.Chem.**, v. 270, n. 13, p. 7037-7040, 1995.
- 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. et al. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. **Journal of periodontology.** v. 65, n. 2, p. 147-153, 1994.
- TAUBMAN, M. A. et al. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. **J Periodontol.** n. 76, p. 2033-2041, 2005.
- THEILL, L. E.; BOYLE, W. J.; PENNINGER, J. M. RANK-L AND RANK: T Cells, Bone Loss, and Mammalian Evolution. **Annual Review of Immunology.** v. 20, p. 795-823, April, 2002.
- TILDEN, A. R.; HUTCHINSON, V. H. Influence of photoperiod and temperature on serum melatonin in the Diamondback Water Snake (*Nerodia rhombifera*). **General and Comparative Endocrinology.** v.92, n.3, p. 347-354, 1993.
- TRESGUERRES, I. F. *et al.* Melatonin dietary supplement as an anti-aging therapy for age-related bone loss. **Rejuvenation Research.** V. 17, n. 4, p. 341-346, 2014.
- TURGUT, M.; BASALOGLU, H. K.; YENISEY, C.; OZSUNAR, Y. Surgical pinealectomy accelerates intervertebral disc degeneration process in chicken. **Eur Spine J.** v.15, p. 605-612, 2006.
- WADA, T.; NAKASHIMA, T.; HIROSHI, N.; PENNINGER, J. M. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. **Trends Mol Med.** V. 12, n. 1, p. 17-25, 2006.
- WHEATER et al. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. **Journal of Translational Medicine.** v. 11, n. 201, p 1-14, 2013.
- WILLIAMS, R.C. Periodontal disease. **N Engl J Med.** v 322, n.6, p.373-82, 1990.
- WU, Y. H.; ZHOU, J. N.; BALESAR, R. et al. Distribution of MT1 Melatonin Receptor Immunoreactivity in the Human Hypothalamus and Pituitary Gland: Colocalization of MT1 with Vasopressin, Oxytocin, and Corticotropin-Releasing Hormone. **The Journal of Comparative Neurology.** v. 499, p.897-910, 2006.

ZANUTO, R.; SIQUEIRA-FILHO, M. A.; CAPERUTO, L. C. Melatonin improves insulin sensitivity independently of weight loss in old obese rats. **J Pineal Res.** v. 55, p. 156-165, 2013.

ZEITZER, J. M.; DIJK, D. J.; KRONAUER, R. E.; BROWN, E. N.; CZEISLER, C. A. Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: melatonin phase resetting and suppression. **J Physiol (Lond).** v.526, p. 695-702, 2000.

ZHAO, S. et al. MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. **Journal Bone Mineral Research.** v. 17, p. 2068-2079, 2002.



## **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 com melatonina na remodelação óssea alveolar em ratos pinealectomizados com doença periodontal", Processo FOA nº 00544-2016, 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 with melatonin in alveolar bone remodeling in pinealectomized rats with periodontal disease", Protocol FOA nº 00544-2016, 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 Pefez Faverani  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

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