



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba

**NICOLLE CARVALHO BARBOSA**

**EFEITO DA MELATONINA NA VIA INSULÍNICA  
DE RATOS COM PERIODONTITE APICAL  
SUBMETIDOS À INALAÇÃO PASSIVA DE TABACO**

**Araçatuba  
2023**

**NICOLLE CARVALHO BARBOSA**

**EFEITO DA MELATONINA NA VIA INSULÍNICA  
DE RATOS COM PERIODONTITE APICAL  
SUBMETIDOS À INALAÇÃO PASSIVA DE TABACO**

Trabalho de conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de Odontologia de  
Araçatuba da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
UNESP, como parte dos requisitos para o  
título de Cirurgiã-Dentista.

**Araçatuba  
2023**

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, **Milton José Barbosa** e **Francielle Carvalho Oliveira** e aos meus amigos **Ana Julia Moreno Barreto** e **André Luís Venâncio Sampaio**, sem o apoio, ajuda e incentivo de vocês este trabalho não seria possível.

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho de conclusão de curso contou com apoios e incentivos importantes, sem os quais não teria se tornado uma realidade.

À minha orientadora, **Prof.a Titular Doris Hissako Matsushita**, pela oportunidade de ser orientada e de fazer parte do seu grupo de pesquisa, por sempre confiar e acreditar no meu potencial e por todos os ensinamentos transmitidos. Serei eternamente grata pela confiança depositada em mim.

Agradeço imensamente a minha família: minha mãe **Francielle Carvalho Oliveira**, meu pai **Milton José Barbosa**, à minha irmã, **Caroline**, e meu cunhado **Breno**, que estiveram ao meu lado em todos os momentos desta jornada, acreditando no meu potencial para a realização dos meus sonhos.

Ao **Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra**, pela colaboração científica e pela indução da periodontite apical.

Aos amigos do laboratório de Endocrinologia e de Endodontia, mestrandos, doutorandos e pós doutorandos: **Maria Sara de Lima Coutinho Mattered**, **Thaís Verônica Saori Tsosura**, **Thaís Paiva Moraes**, **Rodrigo Martins dos Santos**, **Bianca Elvira Belardi**, **Ana Carla Nobumoto**, **Cristiane Cantiga**, e aos alunos de iniciação científica: **Heloisa Macedo Sampaio**, **Lorena Umbelino Rodrigues**, **Gabrielle Fernandes Baliero**, **Maria Clara Venceslau dos Santos**, **Gustavo Feitosa Vargas** pelos ensinamentos, pelos bons momentos compartilhados, pelas risadas, pela compreensão e pelo imenso apoio que foi dado por todos vocês durante minha trajetória. Muito obrigada a todos! Foi e sempre será uma honra fazer parte dessa equipe. Às minhas duplas que me apoiaram por todo o percurso: Ana Julia Moreno Barreto, Maurício Veríssimo, Pedro Faneco, Maria Helena Rocha, Maria Paula Garcia e Renan Grisoste.

Aos professores dos departamentos de Ciências Básicas e Odontologia Preventiva e Restauradora: **Luciano Tavares Ângelo Cintra**, **Edilson Ervolino**, **Eloi Dezan, Júnior**, **João Eduardo Gomes Filho** e **Rogério Jacinto Castilho**, pelos ensinamentos e colaboração científica na execução do meu projeto.

Aos membros titulares e suplentes da Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso: **Prof.a Titular Doris Hissako Matsushita**, **Lara Teschi Bravo** e **Prof.a Assistente Doutora Ana Cláudia Okamoto**, pela gentileza e presteza em aceitar o convite de participação em minha banca.

A **todos os professores** que fizeram parte da minha formação, os meus sinceros agradecimentos, principalmente aos professores **Paulo Roberto Botacin**, **Ana Cláudia Okamoto**, **Leonardo Perez Faverani** e **Karina Helga Turcio de Carvalho**.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)** e a **Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP)**, pela oportunidade da realização da graduação.

Ao diretor e ao vice-diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem** e **Prof. Associado Luciano Tavares Ângelo Cintra**.

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 Biblioteca, **Ana Cláudia Martins Griege Manzatti**, **Cláudio Hideo Matsumoto**, **Ana Paula Rimoli de Oliveira**, **Denise**

**Haruyo Nakamura, Maria Cláudia de Castro Benez e Luís Cláudio Sedlacek**, por sempre estarem dispostos a nos ajudar.

À secretária do departamento de Ciências Básicas **Eliseide Maria Ferreira Silva Navega** e do departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora **Jorge Luís Trevellim**, pela ajuda e carinho.

Ao assistente de suporte técnico de suporte acadêmico **Carlos Suetake**, por nos assistir no uso dos equipamentos do laboratório.

Aos funcionários do Setor de Biotério, **João Batista Alves Correa e Arnaldo César dos Santos**, pelo fornecimento de animais, ração e maravalha.

A todos os funcionários da UNESP, que de acordo com suas funções, prestaram suas importantes parcelas de contribuição nas diferentes etapas da realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e a Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP, pela concessão da bolsa de estudos, o qual foi imprescindível para a execução do projeto de iniciação científica e do TCC.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP-processo 2022/04868-4**), pelos recursos financeiros necessários para a realização da nossa pesquisa.

A todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

A todos, muito obrigada

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos, não é senão uma gota de água no mar, mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa De Calcutá

## RESUMO

O diabetes mellitus do tipo 2 é uma alteração metabólica caracterizada pela resistência à insulina (RI) que pode ser exacerbada pela periodontite apical (PA) e pelo tabagismo. Estudos têm mostrado que a melatonina (MEL) diminui a RI e melhora o sinal insulínico no músculo gastrocnêmio (MG) em ratos com PA. Nesse contexto, hipotetizou-se que os danos causados pela associação do tabagismo e da PA possam exacerbar estas alterações sistêmicas e que o tratamento com MEL pode reverter e/ou atenuar as mesmas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da MEL na RI e no sinal insulínico no MG de ratos adultos com PA submetidos à inalação passiva da fumaça do cigarro. Para tanto, utilizou-se 128 ratos Wistar com 2 meses de idade que foram distribuídos em 8 grupos: controle (CN); ratos tabagistas (T); ratos com PA (PA); ratos tabagistas com PA (T+PA); controle tratados com MEL (ME); ratos tabagistas tratados com MEL (T+ME); ratos com PA tratados com MEL (PA+ME); ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+ME). A inalação passiva da fumaça do cigarro ocorreu por 50 dias, sendo que no 20º dia foi induzida a PA em primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito. Além disso, iniciou-se o tratamento com MEL utilizando 5 mg/Kg via gavagem até o último dia de experimento. Ao final da manutenção dos animais foram analisados os seguintes parâmetros: 1) glicemia por meio do método de glicose oxidase; 2) insulinemia pelo método de ELISA; 3) RI por meio do cálculo de HOMA-IR; 4) grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS1/IRS2) no MG pela técnica de *Western Blotting*. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, utilizando testes paramétricos a fim de comparar o índice glicêmico, a insulinemia, a RI e o grau de fosforilação em tirosina da pp185 no MG, com nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística na massa corpórea e na ingestão alimentar entre os grupos. Os grupos PA, T e T+PA apresentaram aumento na RI quando comparados ao grupo CN. Salientamos que houve incremento na RI no grupo T+PA com relação aos grupos PA e T, avaliados de forma isolada. Ademais, foi verificada alteração no grau de fosforilação de pp185 no MG nos grupos PA, T e T+PA quando comparados ao grupo CN. A MEL promoveu melhora neste parâmetro somente no grupo com PA. Conclui-se que a associação das variáveis tabaco e PA exacerba a RI e piora o sinal insulínico no MG. A MEL foi capaz de melhorar a RI nos grupos T, PA e T+PA. Entretanto, em relação ao sinal insulínico, a MEL melhorou este parâmetro somente no grupo PA. Estes resultados mostram que a MEL pode ser utilizada como agente terapêutico e/ou preventivo nas alterações sistêmicas decorrentes da PA e do tabagismo.

**Palavras-chave:** Melatonina. Tabaco. Periodontite apical. Resistência insulínica.

## ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by insulin resistance (IR) that can be exacerbated by apical periodontitis (AP) and smoking. Studies have shown that melatonin (MEL) decreases IR and improves the insulin signal in the gastrocnemius muscle (GM) in rats with AP. In this context, we hypothesize that the damage caused by the association of smoking and AP can exacerbate these systemic changes and that treatment with MEL can reverse and/or attenuate them. The aims of this study was to evaluate the effects of MEL on IR and on the insulin signal in the GM of adult rats with AP submitted to passive inhalation of cigarette smoke. For this, 128 Wistar rats (2-month-old) were distributed into 8 groups: control (CN); smoking rats (T); rats with AP (AP); smoking rats with PA (T+AP); control treated with MEL (ME); smoking rats treated with MEL (T+ME); rats with AP treated with MEL (AP+ME); smoking rats with AP treated with MEL (T+AP+ME). Passive inhalation of cigarette smoke was carried out for 50 days, and on the 20th day AP was induced in the upper and lower first and second molars on the right side. In addition, treatment with MEL was started using 5 mg/Kg via gavage until the last day of the experiment. At the end of the animals' maintenance, the following parameters were analyzed: 1) blood glucose using the glucose oxidase method; 2) insulinemia by the ELISA method; 3) IR by calculating HOMA-IR; 4) phosphorylation status in tyrosine of pp185 in the GM by the *Western Blotting* technique. Data normality was assessed by Shapiro-Wilk test, using parametric tests to compare the glycemic index, insulinemia, IR and the phosphorylation status in tyrosine of pp185 in GM, with a significance level of 5%. The results showed that there was no statistical difference in body weight and food intake among the groups. The AP, T and T+AP groups showed an increase in IR when compared to the CN group. We emphasize that there was an increase in IR in the T+AP group in relation to the AP and T groups, evaluated separately. Furthermore, there was an alteration in the phosphorylation status in tyrosine of pp185 in the GM in the AP, T and T+AP groups when compared to the CN group. MEL promoted improvement in this parameter only in the group with AP. It is concluded that the association of tobacco and AP exacerbates IR and worsens the insulin signal in the GM. MEL was able to improve IR in the T, AP and T+AP groups. However, regarding the insulin signal, MEL improved this parameter only in the AP group. These results show that MEL can be used as a therapeutic and/or preventive agent in systemic alterations resulting from AP and smoking.

**Keywords:** Melatonin. Tobacco. Apical Periodontitis. Insulin resistance. Animal model.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma contendo os grupos experimentais, número de animais (n) correspondentes a cada grupo, tecidos que foram coletados e as análises realizadas em cada tecido. 17

Figura 2 - Indução da Periodontite Apical (PA) em maxila e mandíbula do lado direito, nos primeiros e segundos molares superiores e inferiores, com auxílio de uma broca LN (LN Long Neck, Dentisply Maillefer, Ballaigues- Suíça) acoplada em baixa rotação. 18

Figura 3 - Ingestão alimentar (média) dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+ME), ratos com PA tratados com MEL (PA+ME), ratos tabagistas tratados com MEL (T+ME) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+ME) avaliado desde o início até o final do experimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=16 animais por grupo). 22

Figura 4 - Massa corpórea dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+ME), ratos com PA tratados com MEL (PA+ME), ratos tabagistas tratados com MEL (T+ME) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+ME) avaliado desde o início o final do experimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=16 animais por grupo). 23

Figura 5 - Valores de glicemia, insulinemia e HOMA-IR dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+ME), ratos com PA tratados com MEL (PA+ME), ratos tabagistas tratados com MEL (T+ME) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+ME). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM de cada grupo (n=10 animais por grupo). Letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ). 23

Figura 6 - Avaliação do grau de fosforilação da pp185 em tirosina (pTyr) antes (-) e após (+) estímulo insulínico, no músculo gastrocnêmico (MG) dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+ME), ratos com PA tratados com MEL (PA+ME), ratos tabagistas tratados com MEL (T+ME) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+ME). Em A autorradiografias típicas: quantidades iguais de proteínas foram analisadas (185  $\mu$ g), sendo a  $\beta$ -actina usada como controle. Em B são demonstrados os valores do grau de fosforilação em tirosina da pp185 apresentados como média  $\pm$  EPM (n=6 animais por grupo). Letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ). 24

## LISTA DE ABREVIACOES

CAMK II	Proteína quinase II dependente de cálcio-calmodulina
CN	Ratos do grupo controle
CN+ME	Ratos do grupo controle tratados com melatonina
CREB	Proteína Ligante de Elemento Responsivo a Cálcio
DP	Doença periodontal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPM	Erro padrão da média
GLUT4	Transportador de Glicose tipo 4
HOMA-IR	Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina
IL-1 $\beta$	Interleucina 1- $\beta$
IL-6	Interleucina 6
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MEL	Melatonina
MG	Músculo gastrocnêmio
PA	Periodontite apical
PA+ME	Ratos com peridontite apical tratados com melatonina
PGC-1 $\alpha$	Proliferador do peroxissoma
PKB	Proteína quinase $\beta$
pp185	Substrato do receptor de insulina (IRS-1/IRS-2)
RI	Resistência à insulina
SB	Solução basal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio
T	Ratos tabagistas
T+PA	Ratos tabagistas com periodontite apical
T+PA+ME	Ratos tabagistas com periodontite apical tratados com melatonina
T+ME	Ratos tabagistas tratados com melatonina
TEMED	Tetrametil etilenodiamina
TLR	Receptores do tipo toll
TLR4	Receptor do tipo toll 4
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
TRIS	Hidroximetil aminometano

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
3.1 Animais	16
3.2 Indução da periodontite apical	17
3.3 Protocolo de tabagismo – fumante passivo	18
3.4 Administração de melatonina	19
3.5 Avaliação da glicemia, insulinemia e sensibilidade à insulina	19
3.6 Avaliação da etapa inicial da via insulínica (pp185) em MG	19
3.7 Análise estatística	21
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>22</b>
4.1 Ingestão alimentar	22
4.2 Avaliação da massa corpórea	22
4.3 Avaliação da glicemia, insulinemia e índice de HOMA-IR	23
4.2 Grau de fosforilação em tirosina da pp185 (antes e após o estímulo insulínico) no MG	24
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>25</b>
<b>6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS</b>	<b>27</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>29</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A periodontite apical (PA) é uma doença de caráter inflamatório dos tecidos perirradiculares, ocasionada por infecção microbiana persistente no sistema de canais radiculares (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965), caracterizando-se de forma aguda (sintomática) ou crônica (assintomática), localizada junto ao ápice dentário (STASHENKO *et al.*, 1994). A PA possui, principalmente, etiologia bacteriana, embora fungos, arqueas e vírus tenham sido encontrados em associação com esta lesão. A microbiota é encontrada em entidades altamente organizadas e complexas, conhecidas como biofilmes multiespécies, localizadas principalmente no interior dos canais radiculares, porém, em circunstâncias específicas, os microrganismos podem ultrapassar a barreira de defesa e estabelecer uma infecção extra-radicular (SUNDE *et al.*, 2019; NAIR, 2006).

O estudo de Kakehashi, Stanley e Fitzgerald (1965) mostrou que os animais “germ-free” submetidos à exposição pulpar ao meio bucal desenvolveram uma resposta inflamatória mínima, enquanto em animais comuns com presença de microbiota observou-se uma infecção pulpar com necrose e abscesso apical. Sendo assim, o aparecimento da PA é consequente de uma infecção bacteriana inicial, a qual envolve processos de recrutamento de mediadores inflamatórios, produção de citocinas e enzimas líticas e ativação de osteoclastos, que desencadeia a reabsorção óssea (XIONG *et al.*, 2007).

Inicialmente, durante o processo de infecção intrarradicular primária, há invasão e colonização do tecido pulpar necrosado, podendo resultar em lesão perirradicular caso a infecção não seja eliminada. Nestes casos há predominância de bactérias anaeróbias estritas (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2007; SUNDQVIST, 1976). A parede celular dos microrganismos Gram-negativos possui endotoxina denominada de lipopolissacarídeo (LPS) (PÁLSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2004). O LPS atua como o principal padrão molecular associado à patógenos (PAMPs) de bactérias Gram-negativas e é reconhecido por receptor Toll-like (TLR4), que induz respostas inflamatórias e age na imunidade inata (VIJAY, 2018), elevando as concentrações de mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL), incluindo IL-6 e IL-1 $\beta$  (MNICH *et al.*, 2010; RÔÇAS *et al.*, 2014). Estes mediadores relacionam-se com o processo de destruição óssea devido a intensificação da inflamação, osteoclastogênese, destruição das fibras do ligamento periodontal e produção de colagenase (PEREIRA *et al.*, 2021; TAUBMAN *et al.*, 2005).

As infecções periapicais causam uma série de alterações locais, disparando mecanismos no tecido no intuito de impedir a propagação de agentes infecciosos. Entretanto, a PA não promove apenas alterações locais, mas também distúrbios sistêmicos (SEGURA-EGEA; MARTÍN-GONZÁLEZ; CASTELLANOS-COSANO, 2015). Na medicina endodôntica constata-se a relação entre a PA e doenças sistêmicas (CINTRA *et al.*, 2018). Nesse contexto, Walton e Langeland (1978) relataram estar bem elucidado na literatura que uma ampla gama de materiais e substâncias, quando inoculados em tecido pulpar, podem migrar para tecidos adjacentes ao dente ou para a circulação sistêmica, devido à ligação circulatória entre a polpa dental e outras estruturas distantes da cavidade oral. Esta associação torna-se válida quando doenças orais de caráter inflamatório ocorrem simultaneamente com outros danos sistêmicos, tais como osteoporose (DODD; ROWE, 2013), doenças cardiovasculares (CAPLAN *et al.*, 2006; SEYMOUR *et al.*, 2007), doenças respiratórias (PAJU; SCANNAPIECO, 2007) e RI (ASTOLPHI *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2017).

A RI é definida como a incapacidade de tecidos periféricos responsivos à insulina responderem adequadamente às concentrações circulantes deste hormônio, resultando em

diminuição da sua ação biológica nesses tecidos (ROBERTS; HEVENER; BARNARD, 2013). Como consequência, as células beta pancreáticas secretam mais insulina a fim de evitar a hiperglicemia. A sobrecarga da função secretória destas células induz a falência celular, ocasionando diminuição da secreção de insulina (PRADHAN; GOEL, 2011).

Em condições normais, a insulina liga-se ao seu receptor de membrana e aumenta a atividade tirosinaquinase do receptor da insulina, promovendo a fosforilação de substratos de receptores da insulina (IRS- 1, IRS-2). A fosforilação da tirosina do IRS-1 resulta na interação da subunidade p85 reguladora da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e ativa a subunidade p110 catalítica. Isto conduz à ativação proteína quinase B (PKB/Akt) e fosforilação do seu substrato, AS160, facilitando a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) para o sarcolema e possibilitando a entrada de glicose na célula. Portanto, a manutenção das respostas adequadas da via IRS-PI3K-Akt é crucial para o metabolismo de glicose mediada pela insulina em tecidos sensíveis à mesma (WEI *et al.*, 2008).

Os estudos anteriores em nosso laboratório mostraram que ratos com PA apresentaram: 1) RI; 2) aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ ; 3) redução no grau de fosforilação em tirosina do receptor insulínico em tecido adiposo branco e muscular; 4) redução no grau de fosforilação em serina da Akt em músculo gastrocnêmio (MG) e 5) diminuição no conteúdo de GLUT4 em MG (ASTOLPHI *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2017). Ademais, no estudo de Pereira *et al.* (2017) foi constatado aumento do conteúdo de macrófagos e ativação de via inflamatória relacionada à atenuação do sinal insulínico no MG, concomitante ao aumento das concentrações séricas de LPS em ratos com PA. Assim, esses resultados demonstram que a PA promove alterações sistêmicas e em outros tecidos como o tecido adiposo e muscular (PEREIRA *et al.*, 2017).

Outro fator que promove inflamação é o tabagismo, o qual apresenta correlação entre alterações orais e sistêmicas, constituindo-se como um fator de risco para diversas patologias (MACFARLANE *et al.*, 1992; SÖDER; NEDLICH; JIN, 1999). Um dos principais componentes químicos do tabaco é a nicotina, sendo que a exposição ao fumo na forma de tabaco gera alterações sobre o sistema imune, como a diminuição dos linfócitos T e B (BARBOUR *et al.*, 1997). A nicotina também possui ação vasoconstritora crônica interferindo no processo de cicatrização gengival (CARVALHO; SANTOS; CURY, 2008).

Kirkevang e Wenzel (2003) constataram a associação da presença de lesões de PA com o hábito de fumar. Sopińska e Bołtacz-Rzepkowska (2020) também concluíram que os fumantes são considerados um grupo de risco ao aparecimento da PA e necessitam de diagnóstico e tratamento precoce frente às lesões de cárie. Pinto *et al.* (2020) em uma revisão sistemática, indicaram que os fumantes têm uma prevalência aumentada de periodontite periapical e tratamentos de canal radicular. Estes dados corroboram os resultados encontrados por Cheng (2020), por meio de revisão sistemática com estudos coorte longitudinais com pelo menos 1 ano de acompanhamento, estudos caso-controle e estudos transversais, verificou, com evidências limitadas, que fumar associa-se com a prevalência de PA. Por outro lado, Bergström, Babcan e Eliasson (2004) demonstraram que não houve influência significativa do tabagismo na prevalência de periodontite apical ou tratamento endodôntico. Estes pesquisadores propõem que a justificativa da divergência em relação ao trabalho de Kirkevang e Wenzel foi que os indivíduos do seu estudo apresentaram homogeneidade social e econômica, boa higiene oral e saúde bucal, além de acesso a tratamento odontológico. Esses achados estão de acordo com Rodriguez *et al.* (2013) que avaliaram a associação entre o tabagismo e a frequência de PA em pacientes do sexo feminino e masculino, onde o tabagismo não foi associado à PA em fumantes de ambos os sexos.

Sabe-se que o uso de MEL propicia efeitos anti-inflamatórios melhorando o estado de RI (TAVARES *et al.*, 2021). A MEL é uma molécula sintetizada em diferentes tipos celulares, tecidos e órgãos como a retina, linfócitos, leucócitos, pele e trato gastrointestinal.

Entretanto, as concentrações de MEL encontradas no plasma circulante e no líquido cefalorraquidiano derivam quase exclusivamente da glândula pineal (CAROCCI; CATALANO; SINICROPI, 2014). Estudos apontam que a produção de MEL tem associação direta com a intensidade de exposição à luminosidade, sendo mais sensível à luz azul com comprimento de ondas curtos (466-477nm) quando comparadas aos de ondas mais longas (>500nm) (BRAINARD *et al.*, 1984; SOUSA NETO; CASTRO, 2008). Outro fator limitante na produção da MEL é o avanço da idade, pois estudos em indivíduos mais velhos observaram concentrações menores de produção da MEL (KARASEK, 2004; SACK *et al.*, 1986).

No estudo de Balaji e Rao (2020) foi verificado aumento na concentração de MEL no tecido gengival de pacientes periodontalmente saudáveis sem hábito de fumar, enquanto houve diminuição nesse parâmetro em pacientes fumantes com periodontite crônica generalizada. Os autores deste estudo concluíram que a MEL pode ser usada como suplemento para aumentar os mecanismos anti-inflamatórios na terapia periodontal, especialmente em fumantes de cigarros. Sabendo-se que às alterações locais e sistêmicas podem ser desencadeadas tanto pela PA como pelo tabagismo e que a MEL apresenta propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, torna-se fundamental investigar o papel da MEL sobre parâmetros sistêmicos e em tecidos à distância da cavidade bucal de ratos com PA submetidos a inalação passiva de tabaco.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos da melatonina sobre sensibilidade insulínica e sinal insulínico no tecido muscular gastrocnêmio em ratos adultos com periodontite apical submetidos a inalação passiva de tabaco.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar os parâmetros sistêmicos e teciduais da melatonina em ratos com periodontite apical submetidos à inalação passiva de tabaco como:

- massa corpórea e ingestão alimentar;
- glicemia, insulinemia e resistência insulínica (HOMA-IR);
- grau de fosforilação em tirosina da pp185 (antes e após o estímulo insulínico) no tecido muscular gastrocnêmio.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Salientamos que o presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP (Processo FOA no 0204-2021).

No presente estudo foram utilizados 128 ratos Wistar machos com 60 dias de idade oriundos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA – Unesp, mantidos em ambiente sob condições padronizadas de temperatura ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias, com período claro iniciado às 7:00 horas) e umidade ( $55\pm 10\%$ ). Todos os animais foram alimentados durante todo o período experimental com ração padrão para ratos (Presence, Paulínia, São Paulo, SP, Brasil) e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 8 grupos (n=16): controle (CN); ratos tabagistas (T); ratos com PA (PA); ratos tabagistas com PA (T+PA); controle tratados com MEL (CN+ME); ratos tabagistas tratados com MEL (T+ME); ratos com PA tratados com MEL (PA+ME); ratos tabagistas com PA com uso de MEL (T+PA+ME).

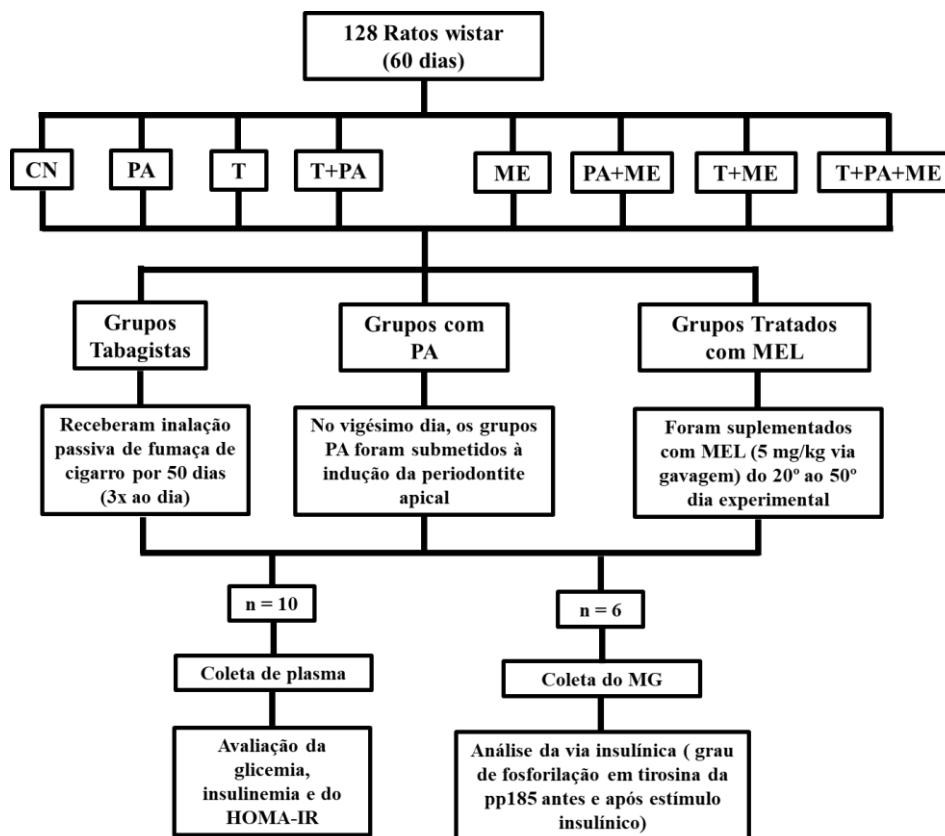
Os grupos tabagistas (T, T+PA, T+ME e T+PA+ME) receberam à inalação passiva de cigarro durante 50 dias (3 vezes ao dia por 8 minutos), sendo que no 20º dia, os grupos PA (PA, T+PA, PA+ME e T+PA+ME) foram submetidos à indução da periodontite apical, com auxílio de uma broca em aço carbono em primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito. Ademais, os animais dos grupos MEL (CN+ME, T+ME, PA+ME, T+PA+ME) foram tratados com melatonina (5 mg/Kg, via oral por meio de gavagem) do 20º dia até 50º dia experimental.

Após o término do tratamento, os ratos foram submetidos a jejum de 12 horas, antes dos procedimentos experimentais, e anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5 mg/100 g p. c., i. p.). A eutanásia dos animais ocorreu entre 19 h e 20 h.

Um grupo de ratos CN, T, PA, T+PA, CN+ME, T+ME, PA+ME e T+PA+ME (n=10 animais por grupo) foi submetido à laparotomia mediana para a coleta de sangue (4 ml) pela veia cava inferior. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados (BV Vacutainer, Flanklin Lakes, NJ, EUA) e centrifugadas a  $3000 \times g$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O plasma obtido foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para avaliação das concentrações plasmáticas de glicose e insulina. Estas análises estão exemplificadas em um fluxograma na Figura 1. Após este procedimento, os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico tiopental sódico (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP, Brasil; 3%, 150 mg/100 g p. c., i. p.).

Em outro grupo de ratos CN, T, PA, T+PA, CN+ME, T+ME, PA+ME e T+PA+ME (n=6 animais por grupo) foram coletadas amostras de MG para analisar a etapa inicial da via de sinalização insulínica por meio da técnica de *Western Blotting*. Para quantificação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (antes e após estímulo insulínico) os animais de cada grupo foram anestesiados conforme descrito acima, realizando-se em seguida: laparotomia mediana, com retirada de amostras dos tecidos antes e após 90 segundos da injeção de 1,5 U.I de insulina regular (Humulin® ELI LILLY and Company – Indianapolis IN, EUA) (i. v., veia porta). Estas análises estão exemplificadas em um fluxograma na Figura 1. Após os experimentos, todos os animais foram eutanasiados por dose excessiva do anestésico tiopental sódico (Thiopentax, Cristália, Itapira/SP, Brasil; 3%, 150 mg/kg p. c., i. p.).

**Figura 1 - Fluxograma contendo os grupos experimentais, número de animais (n) correspondentes a cada grupo, tecidos que foram coletados e as análises realizadas em cada tecido.**

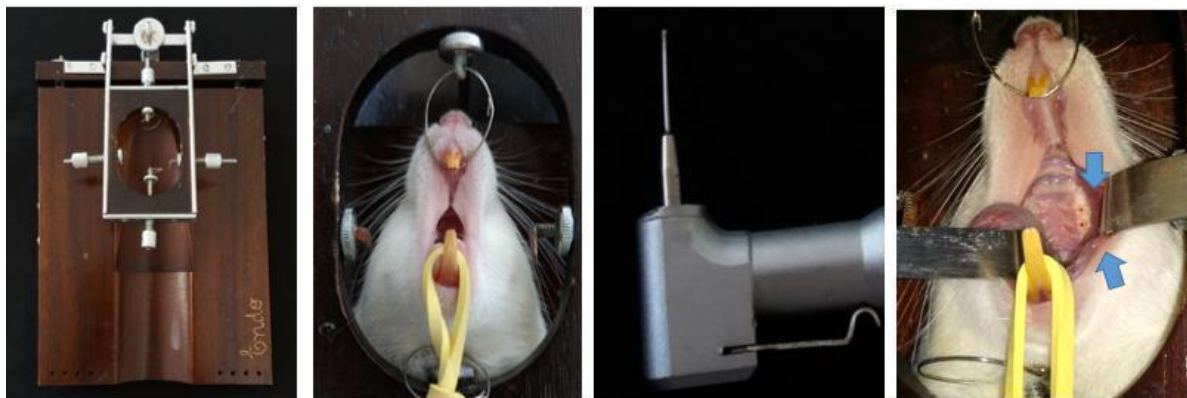


Fonte: Autor

### 3.2 Indução da periodontite apical

Os animais dos grupos com PA (PA, T+PA, PA+ME e T+PA+ME) foram submetidos a indução das PAs. As PAs foram induzidas em quatro dentes (primeiro e segundo molares superiores e inferiores do lado direito) sob anestesia com cloridrato de quetamina (80 mg/Kg p.c., i.m.) e xilazina (10 mg/Kg p.c., i.m.), empregando-se uma broca de aço carbono (Broca Ln Long NeckMaillefer, Dentsply) dotada de uma esfera na extremidade com 0,1 mm de diâmetro (TSOSUTA *et al.*, 2019) A permanência da abertura é o método mais utilizado para o desenvolvimento de periodontites apicais. Após a indução das PAs, os animais receberam analgésico cloridrato de tramadol na dose de 5 mg/kg, administrada via intraperitoneal no intervalo de 12/12h por 1 dia. Diariamente foram avaliados a ingestão de ração e o peso corporal dos ratos.

**Figura 2 – Indução da PA em maxila e mandíbula do lado direito, nos primeiros e segundos molares superiores e inferiores, com auxílio de uma broca LN (LN Long Neck, Dentisply Maillefer, Ballaigues- Suíça) acoplada em baixa rotação**



Fonte: do autor

### 3.3 Protocolo de tabagismo – fumante passivo

Os animais do grupo T, T+PA, T+ME e T+PA+ME foram submetidos à inalação da fumaça do cigarro por meio de uma câmara de exposição de corpo inteiro à fumaça dos cigarros (CARVALHO *et al.*, 2006; CÉSAR-NETO *et al.*, 2003; ERCAN *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2018; NOCITI JÚNIOR *et al.*, 2002; ROSA *et al.*, 2017).

A câmara de exposição a fumaça foi confeccionada em madeira com as medidas 40x33x17 cm, tampa de vidro transparente para observação dos animais durante a inalação da fumaça. A câmara de exposição foi dividida em duas repartições por uma tela perfurada. A área maior era usada para alojar os animais, cinco por vez, e a menor para os cigarros, que foram acoplados em uma base de madeira com orifícios adaptado de (ERCAN *et al.*, 2019). Em uma das paredes da câmara foi instalado um ventilador com a finalidade de fazer circular o ar. Na parede oposta ao ventilador, foram realizadas algumas perfurações para ventilação, gerando um fluxo de ar contínuo dentro da câmara de experimento.

O protocolo de indução ao tabagismo no presente estudo foi baseado nos estudos de Nociti Júnior *et al.* (2002) e César-Neto *et al.* (2003), no qual os animais foram expostos à fumaça de 10 cigarros, da marca Marlboro (Phillips Morris, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil) (ROSA *et al.*, 2017), por 8 minutos, três vezes ao dia, com um intervalo de 4 horas entre cada exposição (08:30, 12:30, 16:30), 7 dias da semana, pelo tempo experimental de 50 dias. A quantidade de cigarros utilizada em nosso estudo foi proposta por González *et al.* (1996), demonstrando que a inalação passiva da fumaça de 10 cigarros, três vezes ao dia, por um período 50 dias produz concentração sérica de nicotina semelhante a fumantes ativos. Resultados não publicados do nosso grupo, utilizando o mesmo modelo experimental, demonstraram que a concentração plasmática de nicotina encontrada no grupo tabagista equivale a um fumante ativo.

### 3.4 Administração de melatonina

Os animais dos grupos CN+ME, T+ME, PA+ME e T+PA+ME receberam MEL (Melatonin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) via oral por meio de gavagem. Salientamos que a MEL foi ministrada em dose única (5 mg/kg de peso corpóreo; volume de 0,2 ml de MEL), diariamente às 19:00 durante 30 dias. Os animais não tratados (C, T, PA, T+PA) receberam a solução salina via oral por meio de gavagem, seguindo os mesmos critérios para os animais tratados (PALIN *et al.*, 2018).

### 3.5 Avaliação da glicemia, insulinemia e sensibilidade à insulina

A glicemia foi analisada pelo método enzimático glicose-oxidase (Análise Diagnóstica, São Paulo, Brasil) e a insulinemia foi avaliada pelo método Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) com a utilização de kit, seguindo as instruções do fabricante (Sensitive Rat Insulin, SRI-13K, Millipore, St Charles, MO, EUA). A sensibilidade insulínica foi avaliada por meio do índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance / Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina), calculado a partir da fórmula:  $HOMA - IR = \text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum } (\mu\text{IU/ml}/22,5)$  (BONORA *et al.*, 2000).

### 3.6 Avaliação da etapa inicial da via insulínica (pp185) em MG

#### 3.6.1 Preparação das amostras para a técnica de “Western blotting”

Imediatamente após a extração, os tecidos foram homogeneizados em Polytron (24000 rpm durante 10 s) em 2 ml de tampão de extração (Tris 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; SDS 1%; NaF 100 mM; Pirofosfato de Na 10 mM; Ortovanadato de Na 10 mM; 0,1 mg/mL Aprotinina), e mantidos em banho-maria (100° C) durante 10 min, transferidos para gelo, e então centrifugados 16000 G durante 40 min (4° C). Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para determinação da concentração proteica pelo método de Lowry (Bio-Rad Protein Assay - Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), e para estoque em tampão desenvolvido por Laemmli (azul de bromofenol 0,1 %; SDS 10 %; fosfato de sódio 1 M, pH 7,0; glicerol 50 %; DTT 15 %) (MATTERA, *et al.*, 2019).

- **“SDS-PAGE” - (“Sodium Dodecil Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis”):** A primeira etapa do Western blotting consistiu na submissão das amostras à corrida eletroforética em gel de poli(acrilamida). Por meio deste método, foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades proteicas fossem perdidas, permitindo estudos posteriores dessas frações proteicas. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli (1970) e modificado por Garfin (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: o gel de “stacking” (3,39% T, 2,7% C – acrilamida 3,3%; bisacrilamida 0,09%; Tris 25 mM, pH 8,9; EDTA 2,0 mM; SDS 0,1%; TEMED 0,111%; persulfato de amônio 0,27%) e o gel de resolução (6,16% T, 2,7% C - acrilamida 8%; bisacrilamida 0,16%; Tris 388 mM, pH 6,7; EDTA 2,1 mM; SDS 0,1%; TEMED 0,115%; persulfato de amônio 0,17%; glicerol 10%).

Na montagem, o gel de resolução ficou sob o gel de “stacking”, com orientação vertical, num sistema de câmaras que manteve as porções superiores e inferiores do gel em contato com um tampão de corrida (Tris 50 mM; glicina 375 mM; SDS 0,1%; EDTA 1,8 mM). No gel de “stacking” foram aplicadas as amostras solubilizadas em tampão de “Laemmli”. Imediatamente antes da aplicação, as amostras foram fervidas por 4 min. A eletroforese foi realizada em equipamento para mini gel da Bio Rad (Mini-Protean, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA), e começou com a corrida no gel de “stacking” sob voltagem constante em 30 V até que ocorresse o empacotamento da amostra, o que pode ser observado na transição dos géis. Posteriormente foi aplicada voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante 2 h. Juntamente com as amostras, sempre foi colocado um padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (Amersham ECL Full-Range Rainbow, GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA).

- **Transferência eletroforética:** Após a separação das frações proteicas no gel de poliacrilamida, foi feita a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE Healthcare Buckinghamshire, Germany). A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 2 h, a 4° C, utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,02%).
- **“Immunoblotting”:** Após a transferência eletroforética, foi iniciado o processo de imunodeteção de proteínas específicas (KRUGER; HAMMOND, 1988). As membranas de nitrocelulose foram, primeiramente, incubadas na presença de solução bloqueadora (solução basal [SB] - NaCl 150 mM; Tris 10 mM; "Tween" 20 0,02%; pH 7,2 - acrescida de 5% de leite desnatado - 0% de gordura) durante 2 h à temperatura ambiente, e então, lavadas com SB por três sessões de 10 min. Em seguida, as membranas foram incubadas em solução (SB + 3% de leite desnatado) contendo os anticorpos antifosfotirosina, e anti- $\beta$ -actina. Todos os anticorpos foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA. Posteriormente foram realizadas três lavagens com SB, e as membranas foram incubadas durante 1 h com segundo anticorpo contendo peroxidase de “horseradish” (kit de quimioluminescência – ECL – GE Healthcare Buckinghamshire, Germany). Novamente, foram realizadas 3 lavagens da membrana de nitrocelulose com SB, com duração de 10 min cada lavagem. Após estes procedimentos, as membranas foram levadas até uma câmara escura, onde foi adicionado 1 ml de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL), e foram incubadas por 1 minuto. Por fim, foi drenado o excesso de reagente e as membranas de nitrocelulose foram expostas a filme de RX (Hyperfilm ECL – GE Healthcare Buckinghamshire, Germany), durante 10 min em temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR) e solução fixadora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR). A intensidade dos "blots" foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se um proGrama Scion Image (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, USA).

### **3.7 Análise estatística**

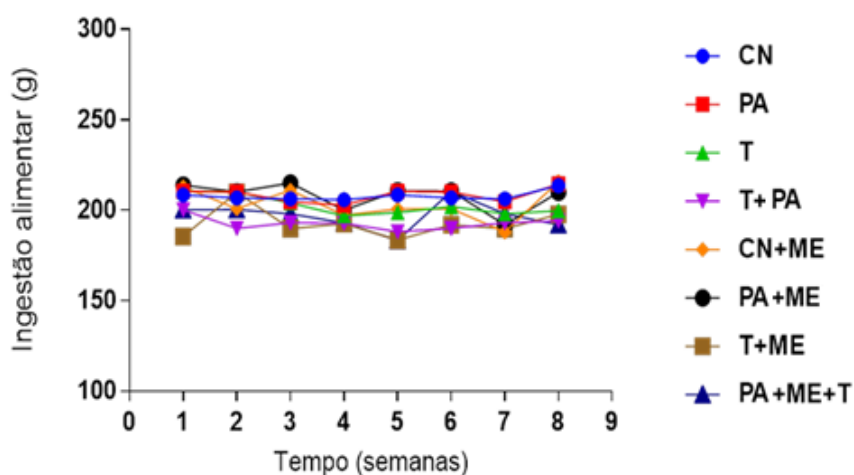
A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA) em função dos resultados do teste de normalidade, para comparar glicemia, insulinemia, sensibilidade à insulina e grau de fosforilação em tirosina da pp185 no MG entre os grupos, com nível de significância de 5%, sendo o processamento dos dados realizado com auxílio do software Graph Pad Prism versão 7.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Ingestão alimentar

A Figura 3 mostra a ingestão alimentar dos grupos CN, PA, T, T+PA, CN+ME, PA+ME, T+ME e T+PA+ME avaliada durante todo o período experimental. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa nesse parâmetro entre os grupos avaliados.

**Figura 3 - Ingestão alimentar (média) dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+ME), ratos com PA tratados com MEL (PA+ME), ratos tabagistas tratados com MEL (T+ME) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+ME) avaliado desde o início até o final do experimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=16 animais por grupo).**

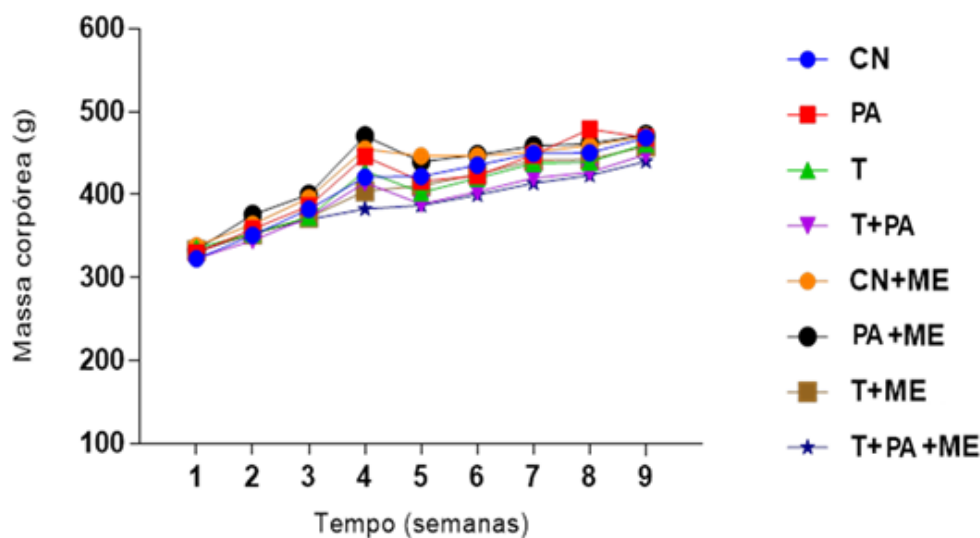


Fonte: do Autor

### 4.2 Avaliação da massa corpórea

A Figura 4 representa os resultados da massa corpórea dos grupos experimentais que foram avaliados semanalmente, desde o início até o final do experimento. Pode-se observar um aumento da massa dos animais em todos os grupos no decorrer das semanas experimentais, não apresentando diferença estatística entre os diferentes grupos analisados.

**Figura 4 - Massa corpórea dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+ME), ratos com PA tratados com MEL (PA+ME), ratos tabagistas tratados com MEL (T+ME) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+ME) avaliado desde o início o final do experimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=16 animais por grupo).**

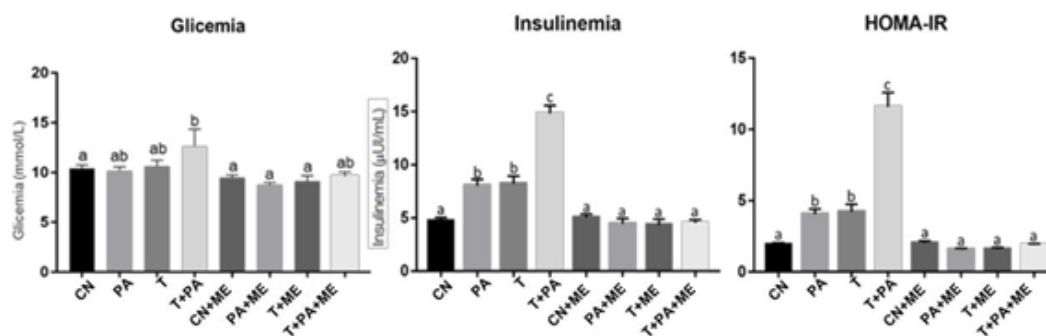


Fonte: do Autor

### 4.3 Avaliação da glicemia, insulinemia e índice de HOMA-IR

A Figura 5 a seguir apresenta os resultados da avaliação da glicemia, insulinemia de jejum e do índice de HOMA-IR. O grupo T+PA apresentou aumento na glicemia quando comparado aos grupos CN, CN+ME, PA+ME e T+ME. Em relação à insulinemia, houve aumento neste parâmetro no grupo T, PA e T+PA quando comparado aos demais grupos; o grupo T+PA apresentou valor significativamente maior a outros grupos. Os resultados de HOMA-IR foram semelhantes aos encontrados na insulinemia.

**Figura 5 – Valores de glicemia, insulinemia e HOMA-IR dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+ME), ratos com PA tratados com MEL (PA+ME), ratos tabagistas tratados com MEL (T+ME) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+ME). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM de cada grupo (n=10 animais por grupo). Letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ).**

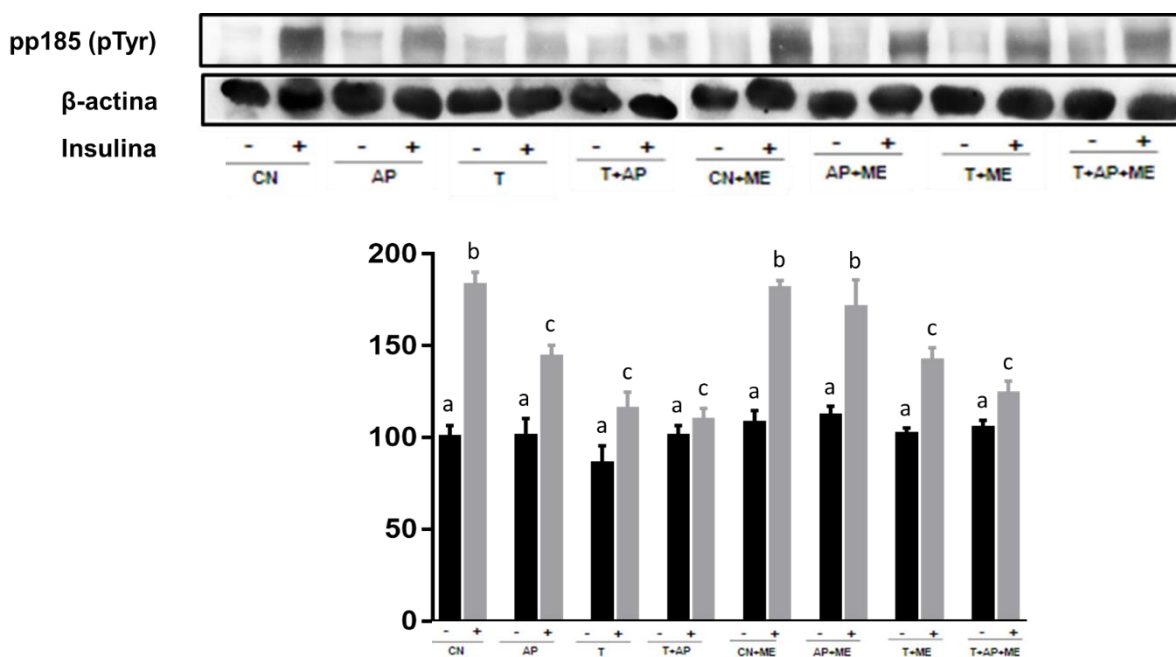


Fonte: do Autor

## 4.2 Grau de fosforilação em tirosina da pp185 (antes e após o estímulo insulínico) no MG

Com o objetivo de verificar os mecanismos envolvidos na RI, avaliamos o grau de fosforilação em tirosina da pp185 no MG antes (-) e após (+) o sinal insulínico (Figura 6). Nesta Figura observa-se uma redução significativa no grau de fosforilação da pp185 em tirosina, após o estímulo insulínico, nos grupos PA, T, T+PA, T+ME e T+PA+ME quando comparados aos grupos CN, CN+ME e PA+ME. Entretanto, não houve diferença estatística neste parâmetro entre os três últimos grupos citados anteriormente.

**Figura 6 - Avaliação do grau de fosforilação da pp185 em tirosina (pTyr) antes (-) e após (+) estímulo insulínico, no músculo gastrocnêmio (MG) dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+ME), ratos com PA tratados com MEL (PA+ME), ratos tabagistas tratados com MEL (T+ME) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+ME). Em A autorradiografias típicas: quantidades iguais de proteínas foram analisadas (185 µg), sendo a β-actina usada como controle. Em B são demonstrados os valores do grau de fosforilação em tirosina da pp185 apresentados como média ± EPM (n=6 animais por grupo). Letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significantes (p<0,05).**



Fonte: do Autor

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a MEL, o tabaco, a PA e/ou a associação destes elementos não causaram alterações significativas na ingestão de alimentos e no peso corporal dos grupos analisados. Na literatura, há dados relevantes acerca da atuação da MEL e do tabaco sobre esses parâmetros. Referente a MEL, sabe-se que este hormônio medeia a integração entre o ambiente cíclico e a distribuição circadiana de processos fisiológicos e comportamentais necessários para otimizar a homeostase energética (CIPOLLA-NETO *et al.*, 2014). Estudos indicam que a MEL controla a expressão do gene pró-opiomelanocortina (POMC) hipotalâmico (RASMUSSEN *et al.*, 2003), o que pode resultar em um efeito anorexigênico direto na ingestão alimentar desses animais. Estes resultados corroboram com o estudo de Zanuto *et al.* (2013), que concluiu que ratos idosos e obesos suplementados com MEL na água de beber por 8 semanas não apresentaram alterações nestes parâmetros. Já o estudo de Buonfiglio *et al.* (2018), que utilizou ratos pinealectomizados, constatou um aumento da resistência à leptina, além da alteração de mecanismos termorreguladores, redução da atividade do tecido adiposo marrom, resposta orexigêna e aumento do peso corporal. No entanto, neste estudo, o tratamento com MEL reduziu a ingestão de alimento e o peso corporal devido ao seu efeito no hipotálamo, modulando a expressão de peptídeos relacionados à ingestão alimentar.

O tabagismo é associado ao aumento do consumo de energia, à diminuição do apetite e da palatabilidade. Isso está ligado ao fato de fumantes terem menor massa corporal do que não fumantes. Também é possível notar um aumento de peso em pessoas que deixam de fumar, uma vez que aumentam a ingestão de alimentos (CHIOLERO *et al.*, 2008). Como já foi mencionado, não houve alteração na massa corporal nem na ingestão alimentar entre os grupos analisados neste estudo (Figuras 3 e 4). A justificativa, neste caso, é provavelmente a exposição insuficiente à fumaça do cigarro, por um período curto para causar a redução da ingestão alimentar e da palatabilidade. O estudo realizado por Ebersbach-Silva *et al.* (2013) envolveu a exposição passiva a fumaça de cigarro por 8 semanas em ratos sedentários e que fizeram exercício físico. Não houve alteração entre os grupos estudados. Entretanto, Wager-Srdar *et al.* (1984) constataram que ratos submetidos a 14 dias à fumaça do cigarro tiveram uma redução no peso e na ingestão de alimentos quando comparados aos animais não expostos, salientando que a exposição à fumaça do cigarro foi superior em comparação ao presente estudo. Nossos resultados estão de acordo com os de Azzalini *et al.* (2010), que não encontraram alterações destes parâmetros em ratos expostos à fumaça de cigarro por 4 semanas. Por isso, a ingestão alimentar e a massa corpórea são influenciadas pela quantidade de cigarro e tempo de exposição à fumaça.

Os resultados também demonstraram que os grupos PA, T e T+PA apresentaram aumento da RI quando comparados ao grupo CN e aos grupos tratados com MEL. Ademais, a associação das variáveis tabaco e periodontite apical promoveu alteração exacerbada neste parâmetro metabólico em relação aos grupos analisados isoladamente. Interessantemente, a administração de MEL em animais com tabaco (grupos T+ME), periodontite apical (PA+ME) e a associação destas variáveis (grupo T+PA+ME) foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina. Alguns dos resultados apresentados são corroborados pelos estudos conduzidos por Astolphi *et al.* (2013) e Pereira *et al.* (2017), nos quais foi demonstrado que ratos com PA apresentam RI. Tavares *et al.* (2021) mostraram que a MEL melhora a sensibilidade à insulina em ratos com PA. Ademais, no estudo de Santos *et al.* (2018), verificou-se que ratos com doença periodontal (DP) e/ou pinealectomizados suplementados com MEL tiveram uma redução na RI. Agil *et al.* (2011) demonstraram que a administração de MEL reduziu os índices de HOMA-IR e a insulinemia em ratos Zucker com diabetes Tipo 2. Adicionalmente, Kitagawa, Ohta e Ohashi (2012) demonstraram que a MEL atenua

a síndrome metabólica em ratos obesos induzidos por dieta hipercalórica composta por frutose.

Estudos têm sido realizados para aprimorar a compreensão da conexão entre as enfermidades orais e as mudanças sistêmicas, bem como os efeitos da administração de certos compostos no surgimento dessas enfermidades (AZUMA *et al.*, 2018; TAVARES *et al.*, 2021). A RI é definida como uma reação inadequada dos tecidos periféricos à insulina, resultando em uma utilização inadequada da glicose e, conseqüentemente, levando a um quadro de hiperglicemia (REHMAN; AKASH, 2016). Pesquisas indicam que o tabagismo está associado a RI e à diminuição da tolerância à glicose (SAIRENCHI *et al.*, 2004; WEITZMAN *et al.*, 2005). Kose *et al.* (2016) conduziram um estudo com ratos diabéticos induzidos por aloxana, no qual foi constatada uma redução significativa nos níveis plasmáticos de glicose em animais diabéticos tratados com MEL. Ademais, a MEL é capaz de reverter a RI e melhorar captação de glicose em tecido adiposo de ratos pinealectomizados (LIMA *et al.*, 1998; ZANQUETTA *et al.*, 2003). Oliveira *et al.*, (2012) verificaram que a MEL promoveu alterações metabólicas positivas em ratos diabéticos em longo prazo, incluindo a RI e o controle glicêmico. Patel *et al.* (2022) relacionam uma ligação funcional entre a MEL e a insulina que pode estar envolvida no surgimento do diabetes mellitus tipo 2, salientando que o tratamento com MEL exógena em modelos celulares, animais e pessoas diabéticas ajuda a aliviar o diabetes e as complicações associadas a essa doença.

Estudos de KAMSRIJAI *et al.* (2020) demonstraram que o tratamento com MEL restaurou a atividade das proteínas que atuam na via de sinalização insulínica em hipocampos de ratos diabéticos. Ademais, ZANUTO *et al.* (2013) observaram resultados semelhantes em hipotálamo, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo marrom de ratos idosos e obesos. Neste mesmo estudo de Zanuto *et al.*, constatou-se que o envelhecimento diminuiu a produção de MEL e prejudicou a sinalização insulínica; e a suplementação com MEL promoveu aumento na sensibilidade à insulina e preveniu a RI relacionada à idade.

HEO *et al.*, (2018) demonstrou que a MEL melhora a sensibilidade insulínica e reduz o grau de esteatose hepática em camundongos que receberam dieta hiperlipídica. Evidências indicam que a MEL tem um impacto no metabolismo da glicose e na patogênese do diabetes mellitus tipo 2 em ratos e humanos (PESCHKE; MÜHLBAUER, 2010).

Os benefícios da MEL na sinalização insulínica em células musculares esqueléticas foram demonstrados em estudos clínicos (TAVARES *et al.*, 2021; TEODORO *et al.*, 2014) e *in vitro* (QUAN *et al.*, 2015). Um dos mecanismos intracelulares pelo qual a MEL pode melhorar a RI nessas células foi identificado por Teodoro *et al.* (2014), que descobriram que a MEL, pela ativação da proteína quinase II dependente de cálcio-calmodulina (CAMK II), induz a fosforilação da CREB. A CREB aumenta a expressão do coativador-1 $\alpha$  do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ) que, por sua vez, ativa genes-chave envolvidos na biogênese mitocondrial, levando a fosforilação da Akt e aumento da captação de glicose no músculo esquelético. Quan *et al.* (2015) mostraram que o tratamento com tunicamicina reduziu a fosforilação da Akt estimulada pela insulina, mas o pré-tratamento com MEL restaurou a via de sinalização insulínica em células musculares esqueléticas.

Esses resultados demonstraram que a associação de T e PA exacerba a RI e a MEL foi capaz de reverter esta alteração. Entretanto, no sinal insulínico, a MEL não foi capaz de reverter a alteração neste parâmetro no grupo T+PA, demonstrando que a MEL pode atuar em outros mecanismos que interferem na sensibilidade à insulina.

## 6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

Frente aos resultados encontrados pode-se observar que:

- Não houve diferença estatística na ingestão alimentar e na massa corpórea entre os grupos analisados.
- A glicemia aumentou somente no grupo T+PA em relação ao controle;
- Tanto a insulinemia e a RI foram maiores na presença de PA e tabagismo, sendo que a MEL reverteu este aumento;
- A associação da PA e do tabagismo promoveu exacerbação tanto da insulinemia como da RI, com diminuição desta alteração na presença de MEL;
- Os grupos T, PA e T+PA apresentaram redução no grau de fosforilação da pp185 em tirosina, sendo que a MEL só conseguiu reverter essa alteração no grupo PA, demonstrando que o T promove uma alteração mais intensa, dificultando a ação da MEL.

## **7 CONCLUSÃO**

Pode-se concluir que a PA e T promoveram RI. A associação destas variáveis exacerbou a RI e a melatonina conseguiu reverter esta alteração. Estes resultados demonstram a ação benéfica da MEL na sensibilidade insulínica, podendo ser utilizada como agente terapêutico e/ou preventivo em alterações sistêmicas e locais decorrentes da PA e do tabagismo.

## REFERÊNCIAS

AGIL, A.; NAVARRO-ALARCÓN, M.; RUIZ, R.; ABUHAMADAH, S.; EL-MIR, M. Y.; VÁZQUEZ, G. F. Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 2, p. 207-212, 2011.

ALMEIDA, J. M.; PAZMINO, V. F. C.; NOVAES, V. C. N.; BOMFIM, S. R. M.; NAGATA, M. J. H.; OLIVEIRA, F. L. P.; MATHEUS, H. R.; ERVOLINO, E. Chronic consumption of alcohol increases alveolar bone loss. **PLoS One**, v. 15, n. 8, p. e0232731, 2020.

AMARANATH, B. J.; DAS, N.; GRUPTA, I.; GRUPTA, R.; JOHN, B.; DEVI, M. P. Types of bone destruction and its severity in chronic periodontitis patients with tobacco smoking habit using periapical radiographs and transgingival probing: A cross-sectional study. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 24, n. 1, p.20-25, 2020.

AMSTRUP, A. K.; SIKJAER, T.; MOSEKILDE, L.; REJNMARK, L. Melatonin and skeleton. **Osteoporos International**, v. 24, p. 2919-2927, 2013.

ASTOLPHI, R. D.; CURBETE, M. M.; COLOMBO, N. H.; SHIRAKASHI, D. J.; CHIBA, F. Y.; PRIETO, A. K.; CINTRA, L. T.; BOMFIM, S. R.; ERVOLINO, R.; SUMIDA, D. H. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. **Journal of Endodontics**, 39, n. 5, p. 648-652, 2013.

AZUMA, M. M.; GOMES-FILHO, J. E.; ERVOLINO, E.; CARDOSO, C. B. M.; PIPA, C. B.; KAWAI, T.; CONTI, L. C.; CINTRA, L. T. A. Omega-3 fatty acids reduce inflammation in rat apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v.44, n. 11, p. 604-608, 2018.

AZZALINI, L.; FERRER, E.; RAMALHO, L. N.; MORENO, M.; DOMÍNGUEZ, M.; COLMENERO, J.; PEINADO, V. I.; BARBERÀ, J. A.; ARROYO, V.; GINÈS, P.; CABALLERÍA, J.; BATALLER, R. Cigarette smoking exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in obese rats. **Hepatology**, v. 51, n. 5, p. 1567-1576, 2010.

BALAJI, T. M.; RAO, S. R. Salivary, plasma, and gingival levels of melatonin and TNF- $\alpha$  in nonsmokers and current smokers with and without periodontal disease. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 21, n. 8, p. 897-904, 2020.

BANDEIRA, S.; DA FONSECA, L. J.; DA S GUEDES, G.; RABELO, L. A.; GOULART, M. O.; VASCONCELOS, S. M. Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3265-3284, 2013.

BARBOUR, S. E.; NAKASHIMA, K.; ZANG, J. B.; TANGALA, S.; HAHN, C. L.; SCHENKEIN, H. A.; TEW, J. G. Tobacco and smoking: environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 8, n. 4, p. 437-460, 1997.

BERGSTRÖM, J.; BABCAN, J.; ELIASSON, S. Tobacco smoking and dental periapical condition. **European Journal of Oral Sciences**, v. 112, n. 2, p. 115-120, 2004.

BIGUETTI, C. C.; COUTO, M. C. R.; SILVA, A. C. R.; SHINDO, J. V. T. C.; ROSA, V. M.; SHINOHARA, A. L.; ANDREO, J. C.; DUARTE, M. A. H.; WANG, Z.; BROTTTO, M.; MATSUMOTO, M. A. New surgical model for bone-muscle injury reveals age and gender-related healing patterns in the 5 lipoxygenase (5LO) knockout mouse. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 484, 2020.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAVCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BODAS, M.; VAN WESTPHAL, C.; CARPENTER-THOMPSON, R.; MOHANTY, D. K.; VIJ, N. Nicotine exposure induces bronchial epithelial cell apoptosis and senescence via ROS mediated autophagy-impairment. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 97, p. 441-453, 2016.

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

BORGES, L. S.; DERMARGOS, A.; DA SILVA JUNIOR, E. P.; WEIMANN, E.; LAMBERTUCCI, R. H.; HATANAKA, E. Melatonin decreases muscular oxidative stress and inflammation induced by strenuous exercise and stimulates growth factor synthesis. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 2, p. 166-172, 2015.

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 Research**, v. 294, n. 2, p. 333-339, 1984.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302, 1978.

BUENO, C. R. E.; SUMIDA, D. H.; DUARTE, M. A. H.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; AZUMA, M. M.; GUIMARÃES, G.; PINHEIRO, T. N.; CINTRA, L. T. A. Accuracy of radiographic pixel linear analysis in detecting bone loss in periodontal disease: Study in diabetic rats. **Saudi Dental Journal**, v. 33, n. 8, p. 987-996, 2021.

BUONFIGLIO, D.; PARTHIMOS, R.; DANTAS, R.; CERQUEIRA SILVA, R.; GOMES, G.; ANDRADE-SILVA, J.; RAMOS-LOBO, A.; AMARAL, F. G.; MATOS, R.; SINÉSIO JÚNIOR, J.; MOTTA-TEIXEIRA, L. C.; DONATO JÚNIOR, J.; REITER, R. J.; CIPOLLA-NETO, J. Melatonin absence leads to long-term leptin resistance and overweight in rats. **Frontiers in Endocrinology**, v. 27, n. 9, p. 122, 2018.

CAI, H.; LIU, Y.; MEN, H.; ZHENG, Y. Protective mechanism of humanin against oxidative stress in aging-related cardiovascular diseases. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 683151, 2021.

CAI, H.; WANG, C. Graphical review: The redox dark side of e-cigarettes; exposure to oxidants and public health concerns. **Redox Biology**, v. 13, p. 402-406, 2017.

CAMPA, C. C.; CIRAULO, E.; GHIGO, A.; GERMENA, G.; HIRSCH, E. Crossroads of PI3K and Rac pathways. **Small GTPases**, v. 6, n. 2, p. 71-80, 2015.

CAPLAN, D. J.; CHASEN, J. B.; KRALL, E. A.; CAI, J.; KANG, S.; GARCIA, R. I.; OFFENBACHER, S.; BECK, J. D. Lesions of endodontic origin and risk of coronary heart disease. **Journal of Dental Research**, v. 85, n. 11, p. 996-1000, 2006.

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

CAROCCI, A.; CATALANO, A.; SINICROPI, M. S. Melatonergic drugs in development. **Clinical Pharmacology: Advances and Applications**, v. 6, p. 127-37, 2014.

CARVALHO, A. E.; SANTOS, I. G.; CURY, V. F. tabagism influence on periodontal diseases: literature review. **Revista Virtual de Odontologia**, v. 12, n. 40, p. 470-479, 2008.

CARVALHO, M. D.; BENATTI, B. B.; CÉSAR-NETO, J. B.; NOCITI, F. H.; NOGUEIRA FILHO G. R.; CASATI, M. Z.; SALLUM, E. A. Effect of cigarette smoke inhalation and estrogen deficiency on bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. **Journal of Periodontology**, v. 77, n. 4, p. 599-605, 2006.

CÉSAR-NETO, J. B.; DUARTE, P. M.; SALLUM, E. A.; BARBIERI, D.; MORENO, H.; NOCITI, F. H. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 10, p. 1454-1459, 2003.

CHENG, L. L. Smoking may increase the risk of periapical periodontitis. **The Journal of Evidence-Based Dental Practice**, v. 20, n. 4, p. 101500, 2020.

CHIOLERO, A.; FAEH, D.; PACCAUD, F.; CORNUZ, J. Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 4, p. 801-809, 2008.

CINTRA, L. T. A.; ESTRELA, C.; AZUMA, M. M.; QUEIROZ, Í. O. A.; KAWAI, T.; GOMES-FILHO, J. E. Endodontic medicine: interrelationships among apical periodontitis, systemic disorders, and tissue responses of dental materials. **Brazilian Oral Research**, v. 32, n. suppl 1, p. e68, 2018.

CINTRA, L. T.; SAMUEL, R. O.; AZUMA, M. M.; QUEIRÓZ, A. O.; ERVOLINO, E.; SUMIDA, D. H.; LIMA, V. M.; GOMES-FILHO, J. E. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 5, p. 747-751, 2016.

CINTRA, L. T.; SAMUEL, R. O.; FACUNDO, A. C.; PRIETO, A. K.; SUMIDA, D. H.; BOMFIM, S. R.; SOUZA, J. C.; DEZAN-JÚNIOR, E.; GOMES-FILHO, J. E. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. **International Endodontic Journal**, v. 47, n. 3, p. 228-237, 2014.

CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G.; AFEICHE, S. C.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **Journal of Pineal Research**, v. 56, n. 4, p. 371-381, 2014.

DEZEREGA, A.; MADRID, S.; MUNDI, V.; VALENZUELA, M. A.; GARRIDO, M.; PAREDES, R.; GARCÍA-SESNICH, J.; ORTEGA, A. V.; GAMONAL, J.; HERNÁNDEZ, M. Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response. **Journal of Inflammation**, v. 9, n. 1, p. 8, 2012.

DI BELLA, G.; MASCIA, F.; GUALANO, L.; DI BELLA, L. Melatonin anticancer effects: review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 2410-2430, 2013.

DODD, D. Z.; ROWE, D. J. The relationship between postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. **Journal of Dental Hygiene**, v. 87, n. 6, p. 336-344, 2013.

DOKKEN, B. B.; SAENGSIRISUWAN, V.; KIM, J. S.; TEACHEY, M. K.; HENRIKSEN, E. J. Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 294, n. 3, p. e615-e621, 2008.

EBERSBACH-SILVA, P.; ALVES, T.; FONSECA, A. T.; OLIVEIRA, M. A.; MACHADO, U. F.; SERAPHIM, P. M. Cigarette smoke exposure severely reduces peripheral insulin sensitivity without changing GLUT4 expression in oxidative muscle of Wistar rats. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 1, p. 19-26, 2013.

ERCAN, A.; BAGHAKI, S.; SULEYMANOV, S.; AYDIN, O.; KONUKOGLU, D.; CETINKALE, O. Effects of cigarette smoke on fat graft survival in an experimental rat model. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 43, n. 3, p. 815-825, 2019.

FERREIRA, C. L.; NUNES, C. M. M.; BERNARDO, D. V.; PEDROSO, J. F.; LONGO, M.; SANTAMARIA, M.; SANTAMARIA, M. P.; JARDINI, M. A. N. Effect of orthodontic force associated with cigarette smoke inhalation in healthy and diseased periodontium. A histometric and immunohistochemistry analysis in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 53, n. 5, p. 924-931, 2018.

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

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 3, p. 245-457, 2013.

GONZÁLEZ, Y. M.; DE NARDIN, A.; GROSSI, S. G.; MACHTEI, E. E.; GENCO, R. J.; DE NARDIN, E. Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. **Journal of Dental Research**, v. 75, n. 2, p. 796-802, 1996.

HACIŞEVKI, A.; BABA, B. An overview of melatonin as an antioxidant molecule: a biochemical approach. *In*: DRĂGOI, C. M.; NICOLAE, A. C. (Eds). **Melatonin: molecular**

**biology, clinical and pharmaceutical approaches.** London: IntechOpen, 2018. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/62672>. Acesso em: 30 nov. 2022.

HEO, J. I.; YOON, D. W.; YU, J. H.; KIM, N. H.; YOO, H. J.; SEO, J. A.; KIM, S. G.; CHOI, K. M.; BAIK, S. H.; CHOI, D. S.; KIM, N. H. Melatonin improves insulin resistance and hepatic steatosis through attenuation of alpha-2-HS-glycoprotein. **Journal of Pineal Research**, v. 65, n. 2, p. e12493, 2018.

HONG, N.; LIN, Y.; YE, Z.; YANG, C.; HUANG, Y.; DUAN, Q.; XIE, S. The relationship between dyslipidemia and inflammation among adults in east coast China: A cross-sectional study. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 13, p. 937201, 2022.

HURRELL, S.; HSU, W. H. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. **Biomedical Journal**, v. 40, n. 5, p. 257-262, 2017.

INCHINGOLO, F.; MARRELLI, M.; ANNIBALI, S.; CRISTALLI, M. P.; DIPALMA, G.; INCHINGOLO, A. D.; PALLADINO, A.; INCHINGOLO, A. M.; GARGARI, M.; TATULLO, M. Influence of endodontic treatment on systemic oxidative stress. **International Journal of Medical Science**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2013.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v. 20, p. 340-349, 1965.

KAMSRIJAI, U.; WONGCHITRAT, P.; NOPPARAT, C.; SATAYAVIVAD, J.; GOVITRAPONG, P. Melatonin attenuates streptozotocin-induced Alzheimer-like features in hyperglycemic rats. **Neurochemistry International**, v. 132, p. 104601, 2020.

KANETO, H.; KAWAMORI, D.; MATSUOKA, T. Oxidative stress and pancreatic beta-cell dysfunction. **American Journal of Therapeutics**, v. 12, n. 6, p. 529-533, 2005.

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

KIRKEVANG, L. L.; WENZEL, A. Risk indicators for apical periodontitis. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 31, n. 1, p. 59-67, 2003.

KITAGAWA, A.; OHTA, Y.; OHASHI, K. Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rats. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 4, p. 403-413, 2012.

KOPA, P. N.; PAWLICZAK, R. IQOS - a heat-not-burn (HnB) tobacco product - chemical composition and possible impact on oxidative stress and inflammatory response. A systematic review. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 30, n. 2, p. 81-87, 2020.

KOSE, O.; ARABACI, T.; KARA, A.; YEMENOGLU, H.; KERMEN, E.; KIZILDAG, A.; GEDIKLI, S.; OZKANLAR, S. Effects of melatonin on oxidative stress index and alveolar bone loss in diabetic rats with periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 5, p. e82-e90, 2016.

KOVACIC, P.; COOKSY, A. Iminium metabolite mechanism for nicotine toxicity and addiction: Oxidative stress and electron transfer. **Medical Hypotheses**, v.64, n. 1, p. 104-111, 2005.

KRUGER, N. J.; HAMMOND, J. B. W. Immunodetection of proteins on "Western" blots using 125 I-labeled protein A. **Methods in Molecular Biology**, v. 3, p. 409-417, 1988.

LAN, M.; ZHANG, Y.; WAN, X.; PAN, M. H.; XU, Y.; SUN, S. C. Melatonin ameliorates ochratoxin A-induced oxidative stress and apoptosis in porcine oocytes. **Environmental Pollution**, v. 256, p. 113374, 2020.

LEE, J. S.; CUA, D. J. Melatonin lulling Th17 cells to sleep. **Cell**, v. 162, n. 6, p. 1212-1214, 2015.

LIMA, F. B.; MACHADO, U. F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; MORAES, S. M.; HELL, N. S.; OKAMOTO, M. M.; SAAD, M. J.; CARVALHO, C. R.; CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 6, p. e934-e941, 1998.

LOH, K.; DENG, H.; FUKUSHIMA, A.; CAI, X.; BOIVIN, B.; GALIC, S.; BRUCE, C.; SHIELDS, B. J.; SKIBA, B.; OOMS, L. M.; STEPTO, N.; WU, B.; MITCHELL, C. A.; TONKS, N. K.; WATT, M. J.; FEBBRAIO, M. A.; CRACK, P. J.; ANDRIKOPOULOS, S.; TIGANIS, T. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. **Cell Metabolism**, v. 10, n. 4, p. 260-272, 2009.

MACFARLANE, G. D.; HERZBERG, M. C.; WOLFF, L. F.; HARDIE, N. A. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking. **Journal of Periodontology**, v. 63, n. 11, p. 908-913, 1992.

MACNEE, W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 2, n. 1, p. 50-60, 2005.

MADDUX, B. A.; SEE, W.; LAWRENCE, J. C. J. R.; GOLDFINE, A. L.; GOLDFINE, I. D.; EVANS, J. L. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. **Diabetes**, v. 50, n. 2, p. 404-410, 2001.

MANCHESTER, L. C.; COTO-MONTES, A.; BOGA, J. A.; ANDERSEN, L. P.; ZHOU, Z.; GALANO, A.; VRIEND, J.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 4, p. 403-419, 2015.

MARANI, F.; SANTOS, R. M.; MATTERA, M. S. L. C.; TSOSURA, T. V. S.; CHIBA, F. Y.; PEREIRA, R. F.; JACON, M. U.; BELARDI, B. E.; DOURADO, N. G.; TESSARIN, G. W. L.; GALLINARI, M. O.; ERVOLINO, E.; SUMIDA, D. H. Supplementation with melatonin prevents alveolar bone resorption in rats with periodontal disease and pinealectomized. **Journal of the International Academy of Periodontology**, v. 23, p. 211-223, 2021.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003.

MARTON, I. J.; BALLA, G.; HEGEDUS, C.; REDI, P.; SZILAGYI, Z.; KARMAZSIN, L.; KISS, C. The role of reactive oxygen intermediates in the pathogenesis of chronic apical periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 8, n. 4, p. 254-257, 1993.

MATTERA, M.S.L.C. et al. Effect of maternal periodontitis on GLUT4 and inflammatory pathway in adult offspring. *Journal of periodontology*, v. 90, p. 884-893, 2019.

MAURIZ, J. L.; COLLADO, P. S.; VENEROSO, C.; REITER, R. J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 1, p. 1-14, 2013.

MINCZYKOWSKI, A.; WOSZCZYK, M.; SZCZEPANIK, A.; LEWANDOWSKI, L.; WYSOCKI, H. Hydrogen peroxide and superoxide anion production by polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic periapical granuloma, before and after surgical treatment. **Clinical Oral Investigations**, v. 5, n. 1, p. 6-10, 2001.

MNICH, S. J.; BLANNER, P. M.; HU, L. G.; SHAFFER, A. F.; HAPPA, F. A.; O'NEIL, S.; UKAIRO, O.; WEISS, D.; WELSH, E.; STORER, C.; MBALAVIELE, G.; ICHIJO, H.; MONAHAN, J. B.; HARDY, M. M.; EDA, H. Critical role for apoptosis signal-regulating kinase 1 in the development of inflammatory K/BxN serum-induced arthritis. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 10, p. 1170-1176, 2010.

NAIR, P. N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 15, n. 6, p. 348-381, 2004.

NAIR, P. N. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **Int Endod J**, v.39, n.4, p. 249-281, 2006.

NAPIERALA, M.; MERRITT, T. A.; MIECHOWICZ, I.; MIELNIK, K.; MAZELA, J.; FLOREK, E. The effect of maternal tobacco smoking and second-hand tobacco smoke exposure on human milk oxidant-antioxidant status. **Environmental Research**, v. 170, p. 110-121, 2019.

NEVES, J.; CRUZ, A. S.; AZEVEDO, I.; VAZ, A. C.; VASCO, P.; SANTOS, P. J.; BICHO, M. P. Reduced and oxidized glutathione of the placenta in pregnancy complicated by pre-eclampsia. **Acta Médica Portuguesa**, v. 10, n. 5, p. 357-360, 1997.

NISHIDA, S. Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p.131-136, 2005.

NITA, M.; GRZYBOWSKI, A. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 3164734, 2016.

NOCITI JÚNIOR, F. H.; CESAR NETO, J. B.; CARVALHO, M. D.; SALLUM, E. A.; SALLUM, A. W. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. **Journal of Periodontology**, v. 73, n. 9, p. 982-987, 2002.

OLIVEIRA, A. C.; ANDREOTTI, S.; FARIAS, T. D. A. S.; TORRES-LEAL, F. L.; PROENÇA, A. R.; CAMPAÑA, A. B.; SOUZA, A. H.; SERTIÉ, R. A.; CARPINELLI, A. R.; CIPOLLA-NETO, J.; LIMA, F. B. Metabolic disorders and adipose tissue insulin responsiveness in neonatally STZ-induced diabetic rats are improved by long-term melatonin treatment. **Endocrinology**, v. 153, n. 5, p. 2178-2188, 2012.

PAJU, S.; SCANNAPIECO, F. A. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. **Oral Diseases**, v. 13, n. 6, p. 508-512, 2007.

PALIN, L. P.; POLO, T. O. B.; BATISTA, F. R. S.; GOMES-FERREIRA, P. H. S.; GARCIA JUNIOR, I. R.; ROSSI, A. C.; FREIRE, A.; FAVERANI, L. P.; SUMIDA, D. H.; OKAMOTO, R. Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 26, p. e20170470, 2018.

PÅLSSON-MCDERMOTT, E. M.; O'NEILL, L. A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. **Immunology**, v. 113, n. 2, p. 153-162, 2004.

PATEL, R.; PARMAR, N.; PRAMANIK PALIT, S.; RATHWA, N.; RAMACHANDRAN, A. V.; BEGUM, R. Diabetes mellitus and melatonin: Where are we? **Biochimie**, v. 202, p. 2-14, 2022.

PEREIRA, R. F.; CINTRA, L. T. A.; TESSARIN, G. W. L.; CHIBA, F. Y.; MATTERA, M. S. L. C.; SCARAMELE, N. F.; TSOSURA, T. V. S.; ERVOLINO, E.; OLIVEIRA, S. H. P.; SUMIDA, D. H. Periapical lesions increase macrophage infiltration and inflammatory signaling in muscle tissue of rats. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 6, p. 982-988, 2017.

PEREIRA, R. F.; TESSARIN, G. W. L. T.; CHIBA, F. Y.; MATTERA, M. S. L. C.; GOMES, P. A.; TSOSURA, T. V. S.; BRITO, G. B. V., OLIVEIRA, R. A. F.; ERVOLINO, E.; OLIVEIRA, S. H.; CINTRA, L. T. A.; MATSUSHITA, D. H. Apical periodontitis promotes insulin resistance and alters adaptive immunity markers in rats. **Elsevier Enhanced Reader**, v. 33, n. 8, p. 979-986, 2021.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 427318, 2014.

PESCHKE, E.; MÜHLBAUER, E. New evidence for a role of melatonin in glucose regulation. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 5, p.829-841, 2010.

PINTO, K. P.; FERREIRA, C. M.; MAIA, L. C.; SASSONE, L. M.; FIDALGO, T. K. S.; SILVA, E. J. N. L. Does tobacco smoking predispose to apical periodontitis and endodontic treatment need? A systematic review and meta-analysis. **International Endodontic Journal**, 53, n. 8, p. 1068-1083, 2020.

PRADHAN, S.; GOEL, K. Interrelationship between diabetes and periodontitis: a review.

**JNMA Journal of the Nepal Medical Association**, v. 51, n. 183, p. 144-153, 2011.

QUAN, X.; WANG, J.; LIANG, C.; ZHENG, H.; ZHANG, L. Melatonin inhibits tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in skeletal muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 463, n. 4, p. 1102-1107, 2015.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, n. 5, p. 567-575, 2011.

RASMUSSEN, D. D.; MARCK, B. T.; BOLDT, B. M.; YELLON, S. M.; MATSUMOTO, A. M. Suppression of hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) gene expression by daily melatonin supplementation in aging rats. **Journal of Pineal Research**, v. 34, n. 2, p. 127-133, 2003.

REHMAN, K.; AKASH, M. S. Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance: how are they interlinked? **Journal of Biomedical Science**, v. 23, n. 1, p. 87, 2016.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; ROSALES-CORRAL, S.; GALANO, A.; ZHOU, X. J.; XU, B. Mitochondria: central organelles for melatonin's antioxidant and anti-aging actions. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 509, 2018.

REPINE, J. E.; BAST, A.; LANKHORST, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, n. 2 Pt 1, p. 341-357, 1997.

ROBERTS, C. K.; HEVENER, A. L.; BARNARD, R. J. Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 1, p. 1-58, 2013.

RÔÇAS, S. I. N.; SIQUEIRA, J. F.; DEL AGUILA, C. A.; PROVENZANO, J. C.; GUILHERME, B. P.; GONÇALVES, L. S. Polymorphism of the CD14 and TLR4 genes and post-treatment apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 2, p. 168-172, 2014.

RODRIGUEZ, F. R.; TANER, B.; WEIGER, R.; WALTER, C. Is smoking a predictor of apical periodontitis? **Clinical Oral Investigations**, v. 17, n. 8, p. 1957-1959, 2013.

ROSA, R. C.; PEREIRA, S. C.; CARDOSO, F. A. G.; CAETANO, A. G.; SANTIAGO, H. A. R.; VOLPON, J. B. Second hand tobacco smoke adversely affects the bone of immature rats. **Clinics**, v. 72, n. 12, p. 785-789, 2017.

SACK, R.; LEWY, A.; ERB, D.; VOLLMER, W. M.; SINGER, C. M. Human melatonin production decreases with age. **Journal of Pineal Research**, v. 3, n. 4, p. 379-388, 1986.

SAIRENCHI, T.; ISSO, H.; NISHIMURA, A.; HOSODA, T.; IRIE, F.; SAITO, Y.; MURAKAMI, A.; FUKUTOMI, H. Cigarette smoking and risk of type 2 diabetes mellitus among middle-aged and elderly Japanese men and women. **American Journal of Epidemiology**, v. 160, n. 2, p. 158-162, 2004.

SANTOS, R. M.; MARANI, F.; CHIBA, F. Y.; MATTERA, M. S. L. C.; SOSURA, T. V. S.; TESSARIN, G. W. L.; PEREIRA, R. F.; BELARDI, B. E.; PINHEIRO, B. C. E. S.; SUMIDA, D. H. Melatonin promotes reduction in TNF levels and improves the lipid profile and insulin sensitivity in pinealectomized rats with periodontal disease. **Life Sciences**, v. 213, p. 32-39, 2018.

SANTOS, R. M.; TSOSURA, T. V. S.; BELARDI, B. E.; CHAVES-NETO, A. H.; CHIBA, F. Y.; MATTERA, M. S. L. C.; TESSARIN, G. W. L.; BRAVO, L. T.; CINTRA, L. T. A.; MATSUSHITA, D. H. Melatonin decreases plasma TNF- $\alpha$  and improves nonenzymatic antioxidant defence and insulin sensitivity in rats with apical periodontitis fed a high-fat diet. **International Endodontic Journal**, 2022. *In press*.

SARITEKIN, E.; ÜREYEN KAYA, B.; AŞCI, H.; ÖZMEN, Ö. Anti-inflammatory and antiresorptive functions of melatonin on experimentally induced periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 10, p. 1466-1478, 2019.

SEGURA-EGEA, J. J.; MARTÍN-GONZÁLEZ, J.; CASTELLANOS-COSANO, L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. **International Endodontic Journal**, v. 48, n. 10, p. 933-951, 2015.

SEYMOUR, G. J.; FORD, P. J.; CULLINAN, M. P.; LEISHMAN, S.; YAMAZAKI, K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. **Clinical Microbiology and Infection**, v.13 Suppl 4, p. 3-10, 2007.

SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. N. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. **Brazilian Dental Journal**, v. 18, n. 4, p. 267-80, 2007.

SÖDER, B.; NEDLICH, U.; JIN, L. J. Longitudinal effect of non-surgical treatment and systemic metronidazole for 1 week in smokers and non-smokers with refractory periodontitis: a 5-year study. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 7, p. 761-771, 1999.

SOPIŃSKA, K.; BOLTACZ-RZEPKOWSKA, E. The influence of tobacco smoking on dental periapical condition in a sample of an adult population of the Łódź region, Poland. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 33, n. 1, p. 45-57, 2020.

SOUSA NETO, J. A.; CASTRO, B. F. Melatonina, ritmos biológicos e sono - uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 44, n. 1, p. 5-11, 2008.

STASHENKO, P.; WANG, C. Y.; TANI-ISHII, N.; YU, S. M. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v. 78, n. 4, p. 494-502, 1994.

SUN, H.; HUANG, F. F.; QU, S. Melatonin: a potential intervention for hepatic steatosis. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, p. 75, 2015.

SUNDE, P. T.; TRONSTAD, L.; ERIBE, E. R.; LIND, P. O.; OLSEN, I. Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. **Endod Dent Traumatol**, v.16, n.5. p. 191-6, 2000.

SUNDQVIST, G. **Bacteriological studies of necrotic dental pulps**. Umeå: University of Umeå, 1976.

TAN, D. X.; HARDELAND, R.; MANCHESTER, L. C.; GALANO, A.; REITER, R. J. Cyclic-3-hydroxymelatonin (C3HOM), a potent antioxidant, scavenges free radicals and suppresses oxidative reactions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 13, p. 1557-1565, 2014.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; QIN, L.; REITER, R. J. Melatonin: A Mitochondrial Targeting Molecule Involving Mitochondrial Protection and Dynamics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2124, 2016.

TAUBMAN, M. A.; VALVERDE, P.; HAN, X.; KAWAI, T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. **Journal of Periodontology**, 76, n. 11 Suppl, p. 2033-2041, 2005.

TAVARES, B. S.; TSOSURA, T. V. S.; MATTERA, M. S. L. C.; SANTELLI, J. O.; BELARDI, B. E.; CHIBA, F. Y.; CINTRA, L. T. A.; SILVA, C. C.; MATSUSHITA, D. H. Effects of melatonin on insulin signaling and inflammatory pathways of rats with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 6, p. 926-940, 2021.

TEODORO, B. G.; BARALDI, F. G.; SAMPAIO, I. H.; BOMFIM, L. H.; QUEIROZ, A. L.; PASSOS, M. A.; CARNEIRO, E. M.; ALBERICI, L. C.; GOMIS, R.; AMARAL, F. G.; CIPOLLA-NETO, J.; ARAÚJO, M. B.; LIMA, T.; AKIRA UYEMURA, S.; SILVEIRA, L. R.; VIEIRA, E. Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 2, p.155-167, 2014.

TRESGUERRES, I. F.; TAMIMI, F.; EIMAR, H.; BARRALET, J. E.; PRIETO, S.; TORRES, J.; CALVO-GUIRADO, J. L.; TRESGUERRES, J. A. Melatonin dietary supplement as an anti-aging therapy for age-related bone loss. **Rejuvenation Research**, v. 17, n. 4, p. 341-346, 2014.

TSOSURA, T. V.S. *et al.* Maternal apical periodontitis is associated with insulin resistance in adult offspring. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 7, p. 1040-1050, 2019.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VIJAY, K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. **International Immunopharmacology**, v. 59, p. 391, 2018.

WAGER-SRDAR, S. A.; LEVINE, A. S.; MORLEY, J. E.; HOIDAL, J. R.; NIEWOEHRER, D. E. Effects of cigarette smoke and nicotine on feeding and energy. **Physiology & Behavior**, v. 32, n. 3, p. 389-395, 1984.

WALTON, R. E.; LANGELAND, K. Migration of materials in the dental pulp of monkeys. **Journal of Endodontics**, v. 4, n. 6, p. 167-177, 1978.

WANG, X.; LIANG, T.; ZHU, Y.; QIU, J.; QIU, X.; LIAN, C.; GAO, B.; PENG, Y.; LIANG, A.; ZHOU, H.; YANG, X.; LIAO, Z.; LI, Y.; XU, C.; SU, P.; HUANG, D.

Melatonin prevents bone destruction in mice with retinoic acid-induced osteoporosis. **Molecular Medicine**, v. 25, n. 1, p. 43, 2019.

WEI, Y.; CHEN, K.; WHALEY-CONNELL, A. T.; STUMP, C. S.; IBDAH, J. A.; SOWERS, J. R. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 3, p. R673-R680, 2008.

WEITZMAN, M.; COOK, S.; AUINGER, P.; FLORIN, T. A.; DANIELS, S.; NGUYEN, M.; WINICKOFF, J. P. Tobacco smoke exposure is associated with the metabolic syndrome in adolescents. **Circulation**, v. 112, n. 6, p. 862-869, 2005.

WILLIAMS, M.; VILLARREAL, A.; BOZHILOV, K.; LIN, S.; TALBOT, P. Metal and silicate particles including nanoparticles are present in electronic cigarette cartomizer fluid and aerosol. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e57987, 2013.

XIONG, H.; PENG, B.; WEI, L.; ZHANG, X.; WANG, L. Effect of an estrogen-deficient state and alendronate therapy on bone loss resulting from experimental periapical lesions in rats. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 11, p. 1304-1308, 2007.

YAVUZ, O.; CAM, M.; BUKAN, N.; GUVEN, A.; SILAN, F. Protective effect of melatonin on beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Acta Histochemica**, v. 105, n. 3, p. 261-266, 2003.

ZANQUETTA, M. M.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; CIPOLLA-NETO, J.; MACHADO, U. F. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. **Journal of Pineal Research**, v. 35, n. 3, p. 141-148, 2003.

ZANUTO, R.; SIQUEIRA-FILHO, M. A.; CAPERUTO, L. C.; BACURAU, R. F.; HIRATA, E.; PELICIARI-GARCIA, R. A.; DO AMARAL, F. G.; MARÇAL, A. C.; RIBEIRO, L. M.; CAMPOREZ, J. P.; CARPINELLI, A. R.; BORDIN, S.; CIPOLLA-NETO, J.; CARVALHO, C. R. Melatonin improves insulin sensitivity independently of weight loss in old obese rats. **Journal of Pineal Research**, v. 55, n. 2, p. 156-165, 2013.

ZARAGOZA, C.; LÓPEZ-RIVERA, E.; GARCÍA-RAMA, C.; SAURA, M.; MARTÍNEZ-RUÍZ, A.; LIZARBE, T. R.; MARTÍN-DE-LARA, F.; LAMAS, S. Cbfa-1 mediates nitric oxide regulation of MMP-13 in osteoblasts. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 9, p. 1896-1902, 2006.