

**BRUNA SOARES TAVARES**

**EFEITOS DA MELATONINA NA VIA INSULÍNICA E  
INFLAMATÓRIA DE RATOS COM PERIODONTITE APICAL**

**ARAÇATUBA**  
**2020**

**BRUNA SOARES TAVARES**

**EFEITOS DA MELATONINA NA VIA INSULÍNICA E  
INFLAMATÓRIA DE RATOS COM PERIODONTITE APICAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Titular Doris Hissako Matsushita

**ARAÇATUBA**  
**2020**

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

T231e      Tavares, Bruna Soares.  
              Efeitos da melatonina na via insulínica e inflamatória de  
              ratos com periodontite apical / Bruna Soares Tavares. -  
              Araçatuba, 2020  
              109 f. : il. ; tab.

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

              1. Inflamação 2. Melatonina 3. Resistência à insulina  
              4. Periodontite periapical I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

## **DADOS CURRICULARES**

**Nascimento:** 15.08.1992, Garça – SP

**Filiação:** José Nildo Moreira Tavares  
Zenaide Soares Tavares

**2013/2017:** Curso de Graduação em Fisioterapia pela Faculdade de Filosofia e Ciências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Marília – SP

**2018/2020:** Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

*Dedico este trabalho ao meu amado esposo, George, aos meus queridos pais, José Nildo e Zenaide e à minha irmã, Taiane, por sempre estarem ao meu lado me apoiando e incentivando a seguir os meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a luz e alimento da minha vida e por ser o meu refúgio quando tudo parecia não dar certo.

À minha orientadora, **Prof.<sup>a</sup> Doris Hissako Matsushita**, por ter me acolhido de braços abertos em seu laboratório, onde tudo me era novo. Obrigada pela paciência, confiança e orientação deste trabalho. Mais do que isso, obrigada pelos conselhos e ensinamentos que transcenderam a relação profissional. Amiga como sempre, obrigada pela compreensão, pelas palavras gentis e incentivo quando eu mais precisei.

Ao meu amado esposo, **George Pantaroto Perez**, por acreditar em meu potencial, me apoiar incondicionalmente, me despertar a coragem e por estar ao meu lado em meus momentos de dificuldades. Você foi minha fortaleza, onde eu recarregava minhas energias para continuar minha jornada. Faltam-me palavras para expressar tamanha gratidão a você. Te amo.

Aos meus queridos pais, **José Nildo Moreira Tavares** e **Zenaide Soares Tavares**, que mesmo longe estavam sempre em meus pensamentos. Obrigada pelo amor, carinho e orações.

À minha doce irmã, **Taiane Soares Tavares**, por compartilhar conselhos que foram essenciais para o meu crescimento profissional e pessoal.

Às amigas, **Roberta Moraes** e **Priscila Braga Stevanato**, por acalmarem meu coração com suas sábias palavras nos momentos de desespero, por me mostrarem que podemos construir infinitas oportunidades e possibilidades e que um passo de cada vez torna o caminho menos árduo.

Às amigas, **Jéssica Luiza de Oliveira Fonseca Zanardo** e **Damaris Raissa dos Santos**, companheiras de jornada, por compartilharem comigo os mesmos sentimentos.

Aos amigos do laboratório: **Thaís Verônica Saori Tsosura**, **Maria Sara de Lima Coutinho Mattera**, **Bianca Elvira Belardi**, **Rodrigo Martins dos Santos**, **Ana Carolina Nascimento Carnevali**, **Júlia Ogata Santelli**, **Nayara Gabriely Dourado** e **Heloísa Sampaio Macedo**. E aos amigos que um dia participaram deste grupo de pesquisa: **Fernando Yamamoto Chiba**, **Fernando Marani**, **Beatriz Costa E Silva Pinheiro**, **Jhenifer Haiane Pereira Mateus**, **Renan Akira Fujii de Oliveira** e **Renato Felipe Pereira**, pela paciência, companheirismo e risadas. Vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Luciano Tavares Ângelo Cintra**, por ter contribuído imensamente para a realização deste estudo. Estendo meus agradecimentos à sua aluna, **Cristiane Cantiga da Silva**, pela imensa ajuda e disposição.

Ao **Prof. Antônio Hernandes Chaves Neto**, pela amizade e por disponibilizar seu laboratório para a dosagem do colesterol.

À **Prof.<sup>a</sup> Suely Regina Mogami Bomfim**, pelos pareceres semestrais do projeto.

À coordenadora e à vice-coordenadora do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP, **Prof.<sup>a</sup> Cristina Antoniali Silva** e **Prof.<sup>a</sup> Sandra Helena Penha de Oliveira**, pelo excelente trabalho em relação ao nosso programa de pós-graduação.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP, **Prof.<sup>a</sup> Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune**, **Prof. Antonio Hernandes Chaves Neto**, **Prof.<sup>a</sup> Cristina Antoniali Silva**, **Prof.<sup>a</sup> Doris Hissako Matsushita**, **Prof. João Carlos Callera**, **Prof.<sup>a</sup> Rita Cássia Menegati Dornelles**, **Prof.<sup>a</sup> Sandra Helena Penha de Oliveira** e **Prof. Wilson Galhego Garcia**.

Aos professores membros da banca do Exame Geral de Qualificação, **Prof. Luciano Tavares Ângelo Cintra** e **Prof.<sup>a</sup> Suely Regina Mogami Bomfim**, pelos apontamentos que contribuíram com o engrandecimento desta dissertação.

Aos membros titulares da Banca Examinadora de defesa da Dissertação, **Prof. Luciano Tavares Ângelo Cintra** e **Prof. Vitor Engrácia Valenti**, que prontamente aceitaram o convite.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) e à Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) pela oportunidade da realização do meu mestrado.

Ao diretor e vice-diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Prof. Glauco Issamu Miyahara** e **Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

À secretária do Departamento de Ciências Básicas, **Eliseide Maria Ferreira Silva Navega**, pela atenção e presteza com os alunos.

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

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

Aos funcionários da Biblioteca, **Ana Claudia Martins Grieger Manzatti**, **Ana Paula Rímoli de Oliveira**, **Claudio Hideo Matsumoto**, **Denise Haruyo Nakamura Maeda** e **Maria Claudia de Castro Benez** sempre tão prestativos.

Aos funcionários do Setor de Biotério, **Camilo Roberto Venâncio** e **João Batista Alves Correa**.

Aos animais utilizados, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro (Processo n°: 2018/23346-3).

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

A todos, minha eterna gratidão!

*O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a veemência e perseverante energia de sua alma a um fim, vencerá os obstáculos, e, se não atingir o alvo fará, pelo menos, coisas admiráveis.*

*José de Alencar*

TAVARES, B. S. **Efeitos da melatonina na via insulínica e inflamatória de ratos com periodontite apical**. 2020. 109 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

## RESUMO

A relação entre processos inflamatórios orais e saúde sistêmica vem se tornando um aspecto de grande interesse da comunidade médica e odontológica, visto que o número de publicações sobre este tema aumentou consideravelmente nos últimos anos. A periodontite apical (PEA) é uma inflamação oral associada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias que podem atuar de forma local e sistêmica. Além disso, possui associações com outras doenças, tais como a síndrome metabólica e *Diabetes Mellitus*. Estudos do nosso laboratório demonstraram que a PEA em ratos ocasiona resistência insulínica (RI) e alterações no sinal insulínico. Sabe-se que a melatonina (MEL) melhora a RI. Nesse sentido, hipotetizamos que a suplementação de MEL em ratos com PEA poderia prevenir ou diminuir a RI encontrada nestes animais. Considerando-se os efeitos regulatórios da MEL sobre processos inflamatórios, se faz relevante avaliar a influência da suplementação de MEL sobre um processo inflamatório localizado como a PEA. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação da MEL na RI, na via insulínica e inflamatória, nas concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias e no perfil lipídico em ratos com PEA. Para tanto, 72 ratos Wistar foram distribuídos em 4 grupos: a) controle (CN); b) controle suplementado com MEL (CNMEL); c) PEA (PEA); d) PEA suplementado com MEL (PEAMEL). As PEA foram induzidas aos 60 dias de idade pela exposição da polpa dentária dos primeiros e segundos molares direitos (superiores e inferiores) ao ambiente oral. Após a indução das PEA, foi iniciada a suplementação com MEL (5 mg/kg) por via oral (diluída em água de beber) por 60 dias. Ao término do tratamento foram analisados os seguintes parâmetros: 1) glicemia; 2) insulinemia; 3) resistência à insulina (HOMA-IR); 4) grau de fosforilação em tirosina da pp185 e em serina da Akt em músculo sóleo (MS) e extensor digital longo (EDL); 5) grau de fosforilação de IKK $\alpha$ / $\beta$  e JNK em MS e EDL; 6) concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10); 7) perfil lipídico (colesterolemia e triacilgliceridemia). As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância

de dois ou três fatores seguida pelo teste de Bonferroni. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ . Os resultados demonstraram que a PEA em ratos promoveu: 1) RI; 2) dislipidemia; 3) aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ); 4) aumento do grau de fosforilação de IKK $\alpha/\beta$  em MS e EDL; 5) diminuição da concentração da citocina anti-inflamatória IL-10; 6) prejuízo no sinal insulínico (grau de fosforilação da pp185 em tirosina e Akt em serina) em MS. A suplementação com MEL em ratos com PEA melhorou a sensibilidade insulínica, diminuiu as concentrações de VLDL, TG, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , aumentou IL-10 e alterou o sinal insulínico em MS e o grau de fosforilação de IKK $\alpha/\beta$  em MS e EDL. Esses resultados demonstraram que a MEL é um potente tratamento adjuvante para melhorar a sensibilidade insulínica, dislipidemia e alterações nas vias de sinalização insulínica e inflamatória promovidas pela PEA. Além disso, o impacto da PEA na saúde geral também foi demonstrado.

**Palavras-chave:** Inflamação. Melatonina. Resistência à insulina. Periodontite apical.

**TAVARES, B. S. Effects of melatonin on the insulin signaling and inflammatory pathways of rats with apical periodontitis.** 2020. 109 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

## **ABSTRACT**

The relationship between oral inflammatory processes and systemic health has become an aspect of great interest to the medical and dental community, since the number of publications on this topic has increased considerably in recent years. Apical periodontitis (PEA) is an oral inflammation associated with an increase in proinflammatory cytokines that can act locally and systemically. In addition, it has associations with other diseases, such as metabolic syndrome and Diabetes Mellitus. Studies in our laboratory have shown that PEA in rats causes insulin resistance (IR) and changes in insulin signal. Melatonin (MEL) is known to improve IR. In this sense, we hypothesized that the supplementation of MEL in rats with PEA could prevent or decrease the IR found in these animals. Considering the regulatory effects of MEL on inflammatory processes, it is important to assess the influence of MEL supplementation on a localized inflammatory process such as PEA. Therefore, the present study aimed to verify the effects of MEL supplementation on IR, on the insulin and inflammatory pathways, on the plasma concentrations of inflammatory cytokines and on the lipid profile in rats with PEA. For that, 72 Wistar rats were divided into 4 groups: a) control (CN); b) control supplemented with MEL (CNMEL); c) PEA (PEA); d) PEA supplemented with MEL (PEAMEL). PEA were induced at 60 days of age by dental pulp exposure of the first and second right molars (upper and lower) to the oral environment. After PEA induction, supplementation with MEL (5 mg/kg) orally (diluted in drinking water) for 60 days was initiated. At the end of treatment, the following parameters were analyzed: 1) glycemia; 2) insulinemia; 3) insulin resistance (HOMA-IR); 4) phosphorylation status of pp185 tyrosine and Akt serine in soleus (SM) and extensor digitorum longus (EDL) muscles; 5) phosphorylation status of IKK $\alpha/\beta$  and JNK in SM and EDL; 6) plasma concentrations of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-10); 7) lipid profile (cholesterolemia and triacylglyceridemia). The statistical analysis were performed by analysis of variance of two or three factors followed by the Bonferroni test. Differences between groups were considered

significant when  $p < 0,05$ . The results demonstrated that the PEA in rats promoted: 1) IR; 2) dyslipidemia; 3) increased plasma concentrations of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ ); 4) increased phosphorylation status of IKK $\alpha/\beta$  in SM and EDL; 5) decreased concentration of the anti-inflammatory cytokine IL-10; 6) impaired in the insulin signal (phosphorylation status of pp185 tyrosine and Akt serine) in SM. MEL supplementation in rats with PEA improved insulin sensitivity, decreased concentrations of VLDL, TG, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , increased IL-10 and changed the insulin signal in SM and the phosphorylation status of IKK $\alpha/\beta$  in SM and EDL. These results demonstrated that MEL is a potent adjuvant treatment to improve insulin sensitivity, dyslipidemia and changes in the insulin signaling and inflammatory pathways promoted by PEA. In addition, the impact of PEA on general health has also been demonstrated.

**Keywords:** Inflammation. Melatonin. Insulin resistance. Apical periodontitis.

## LISTA DE FIGURAS

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> | Indução da periodontite apical em rato com o auxílio de uma broca em baixa rotação.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 34 |
| <b>Figura 2</b> | Imagens representativas da análise histológica da região periapical após 60 dias de exposição pulpar. A coloração de H&E no grupo CN (a1, a2) mostrou região periapical livre de infiltrado inflamatório; o grupo PEA (b1, b2) com infiltrado inflamatório moderado ao redor do ápice, ruptura do ligamento periodontal e área de reabsorção óssea; o grupo CNMEL (c1, c2) apresentou região periapical livre de infiltrado inflamatório; o grupo PEAMEL (d1, d2) com infiltrado inflamatório moderado e área de reabsorção óssea periapical. (a1-d1, 100x; a2-d2, aumento de 400x).                  | 43 |
| <b>Figura 3</b> | A. Massa corpórea semanal. B. Média da ingestão alimentar semanal. Grupos de ratos controle (CN), periodontite apical (PEA), controle suplementados com melatonina (CNMEL) e PEA suplementados com melatonina (PEAMEL). Parâmetros avaliados desde a indução das PEA e início do tratamento com melatonina, até o final da manutenção dos animais. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM de 18 animais por grupo.                                                                                                                                                                             | 44 |
| <b>Figura 4</b> | Avaliação do grau de fosforilação de pp185 em tirosina (pTyr) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em tecido muscular esquelético sóleo (MS) (A e B) e extensor digital longo (EDL) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). Em A e C, auto-radiografia típica: quantidades iguais de proteína (185 $\mu$ g) foram submetidas a SDS-PAGE. $\beta$ -actina foi utilizada como controle. Em B e D, valores do grau de fosforilação em tirosina da proteína pp185, | 48 |

expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média  $\pm$  EPM, n=8. \* p < 0,05 insulina (-) vs. insulina (+); † p < 0,05 PEA (+) vs. CN (+), CNMEL (+) e PEAMEL (+).

- Figura 5** Avaliação do grau de fosforilação de Akt em serina (pSer 473) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em tecido muscular esquelético sóleo (MS) (A e B) e extensor digital longo (EDL) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). Em A e C, auto-radiografia típica: quantidades iguais de proteína (185  $\mu$ g) foram submetidas a SDS-PAGE.  $\beta$ -actina foi utilizada como controle. Em B e D, valores do grau de fosforilação em serina da proteína Akt, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média  $\pm$  EPM, n=8. \* p < 0,05 insulina (-) vs. insulina (+); † p < 0,05 PEA (+) vs. CN (+), CNMEL (+) e PEAMEL (+). 49
- Figura 6** Avaliação do grau de fosforilação da IKK $\alpha/\beta$  em tecido muscular esquelético sóleo (MS) (A e B) e extensor digital longo (EDL) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). Em A e C, auto-radiografia típica: quantidades iguais de proteína (185  $\mu$ g) foram submetidas a SDS-PAGE. IKK $\alpha/\beta$  foi utilizada como controle. Em B e D, valores do grau de fosforilação da proteína IKK $\alpha/\beta$ , expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média  $\pm$  EPM, n=8. \* p < 0,05 PEA vs. CN, CNMEL e PEAMEL. 50
- Figura 7** Avaliação do grau de fosforilação da JNK em tecido muscular esquelético sóleo (MS) (A e B) e extensor digital longo (EDL) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL 51

(PEAMEL). Em A e C, auto-radiografia típica: quantidades iguais de proteína (185 µg) foram submetidas a SDS-PAGE. JNK foi utilizada como controle. Em B e D, valores do grau de fosforilação da proteína JNK, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média  $\pm$  EPM, n=8.

## LISTA DE TABELAS

|                 |                                                                                                                  |    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> | Glicemia, insulinemia e índice HOMA-IR.                                                                          | 44 |
| <b>Tabela 2</b> | Concentrações plasmática de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ e IL-10.                                          | 45 |
| <b>Tabela 3</b> | Concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, colesterol-VLDL e triglicerídeos. | 46 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

µm: Micrômetro

5-HT: Serotonina

5-HTP: 5-hidroxitriptofano

AA-NAT: Arilalquilamina-N-acetiltransferase

AGL: ácidos graxos livres

AgRP: Neurônio peptídeo relacionado ao gene agouti

AINEs: Anti-inflamatórios não esteroidais

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina

AP-1: Proteína ativadora 1

AS160: Substrato da Akt de 160 kDa

CAMK II: Proteína quinase II dependente de cálcio-calmodulina

CD14: Cluster de diferenciação 14

CD4+: Linfócito T CD4 positivo

CD8+: Linfócito T CD8 positivo

CN: Ratos do grupo controle

CNMEL: Ratos do grupo controle suplementados com melatonina

CREB: Proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc

CT: Colesterol total

DH: Dieta hiperlipídica

DM2: *Diabetes Mellitus* tipo II

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DP: Doença periodontal

DTT: Ditioneitol

EDL: Músculo extensor digital longo

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

EPM: Erro padrão da média

GLUT4: transportador de glicose tipo 4

HDL: Lipoproteínas de alta densidade

HIOMT: Hidroxi-indol-O-metil-transferase

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

IFN- $\gamma$ : Interferon gama  
IKK: Complexo I $\kappa$ B quinase  
IL-1: Interleucina 1  
IL-10: Interleucina 10  
IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 beta  
IL-2: Interleucina 2  
IL-4: Interleucina 4  
IL-5: Interleucina 5  
IL-6: Interleucina 6  
IRS: Substrato do receptor de insulina  
IRS-1: Substrato-1 do receptor de insulina  
IRS-2: Substrato-2 do receptor de insulina  
IR $\beta$ : Subunidade  $\beta$  do receptor de insulina  
I $\kappa$ B: Inibidor de proteínas  $\kappa$ B  
JNK: c-Jun N-terminal quinase  
LBP: Proteína ligante de LPS  
LDL: Lipoproteínas de baixa densidade  
LPS: Lipopolissacarídeos  
MD2: Proteína de diferenciação mieloide 2  
MEL: Melatonina  
MG: Músculo gastrocnêmio  
mM: Milimolar  
mmol: Milimol  
MS: Músculo sóleo  
mV: Milivolt  
MyD88: Fator de diferenciação mieloide 88  
Na: Sódio  
NaCl: Cloreto de sódio  
NaF: Fluoreto de sódio  
NAS: N-acetilserotonina  
NEMO: modulador essencial do NF- $\kappa$ B  
NF- $\kappa$ B: Fator de transcrição nuclear kappa B  
ng: Nanograma  
NPY: Neuropeptídeo Y

Nrf2: Fator nuclear relacionado ao eritroide 2

NSQ: Núcleo supraquiasmático

p110: Subunidade catalítica da PI3K

p85: Subunidade regulatória da PI3K

PACAP: Peptídeo de ativação cíclica do adenilato hipofisário

PEA: Periodontite apical

PEAMEL: Ratos do grupo periodontite apical suplementados com melatonina

pg: Picograma

PG: Prostaglandina

PGC-1 $\alpha$ : Coativador-1 $\alpha$  do receptor ativado por proliferador do peroxissoma

PGE2: Prostaglandina E2

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase

PKA: Proteína quinase A

PKB/Akt: Proteína quinase B

PMN: Leucócitos polimorfonucleares

POMC: Pró-opiomelanocortina

pp185: Substrato do receptor de insulina (IRS-1/IRS-2)

QR2: Quinona redutase 2

RI: Resistência insulínica

SB: Solução basal

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio

Ser: Serina

TAB-P: Tecido adiposo branco periepididimal

TEMED: Tetrametil etilenodiamina

TG: Triglicerídeos

Th: Linfócitos T-helper

TLR: Receptores do tipo toll

TLR2: Receptores do tipo toll 2

TLR4: Receptores do tipo toll 4

TNFR1: Receptor 1 de TNF

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

TPOH: Triptofano hidroxilase

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano

Tyr: Tirosina

UI: Unidades Internacionais

UV: Radiação ultravioleta

V: Volt

VIP: Peptídeo vasoativo intestinal

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

XIAP: Inibidor da apoptose ligado ao cromossomo X

µg: Micrograma

µUI: Microunidades internacionais

## SUMÁRIO

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                                                          | 23 |
| 1.1 Melatonina e suas funções.....                                                                         | 23 |
| 1.2 Periodontite apical (PEA).....                                                                         | 27 |
| 1.3 Sinalização insulínica e mecanismos relacionados à resistência insulínica na PEA....                   | 29 |
| 2 OBJETIVOS .....                                                                                          | 32 |
| 2.1 Objetivo Geral.....                                                                                    | 32 |
| 2.2 Objetivos específicos .....                                                                            | 32 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                                                 | 33 |
| 3.1 Animais.....                                                                                           | 33 |
| 3.2 Indução da periodontite apical.....                                                                    | 33 |
| 3.3 Administração de melatonina.....                                                                       | 34 |
| 3.4 Eutanásia .....                                                                                        | 35 |
| 3.5 Análise histológica da região apical.....                                                              | 36 |
| 3.6 Avaliação da glicemia .....                                                                            | 36 |
| 3.7 Avaliação da insulinemia .....                                                                         | 37 |
| 3.8 Avaliação do índice HOMA-IR .....                                                                      | 37 |
| 3.9 Avaliação das concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias .....                               | 37 |
| 3.10 Avaliação do perfil lipídico.....                                                                     | 38 |
| 3.10.1 Avaliação da concentração plasmática de triglicerídeos .....                                        | 38 |
| 3.10.2 Avaliação da concentração plasmática de colesterol total .....                                      | 38 |
| 3.10.3 Avaliação da concentração plasmática de colesterol HDL.....                                         | 39 |
| 3.10.4 Avaliação da concentração plasmática de colesterol LDL e VLDL .....                                 | 39 |
| 3.11 Avaliação da via inflamatória (IKK e JNK) e da sinalização insulínica (pp185 e Akt) em MS e EDL ..... | 40 |
| 3.11.1 Preparação das amostras para a técnica de “Western blotting” .....                                  | 40 |
| 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                                                                 | 42 |
| 5 RESULTADOS .....                                                                                         | 42 |
| 5.1 Avaliação histológica da região periapical .....                                                       | 42 |
| 5.2 Avaliação da massa corpórea e ingestão alimentar.....                                                  | 43 |
| 5.3 Avaliação da glicemia, insulinemia e HOMA-IR.....                                                      | 44 |
| 5.4 Avaliação das concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias .....                               | 45 |
| 5.5 Avaliação das concentrações plasmáticas de colesterol e triglicerídeos .....                           | 46 |
| 5.6 Avaliação da via de sinalização insulínica (pp185 e Akt) em MS e EDL .....                             | 47 |
| 5.7 Avaliação da via inflamatória (IKK $\alpha/\beta$ e JNK) em MS e EDL.....                              | 49 |

|                   |    |
|-------------------|----|
| 6 DISCUSSÃO ..... | 52 |
| 7 CONCLUSÃO ..... | 60 |
| REFERÊNCIAS ..... | 61 |
| ANEXOS .....      | 76 |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Melatonina e suas funções

A melatonina (MEL) ou N-acetil-5-metoxitriptamina é uma indolamina com característica anfifílica amplamente distribuída na natureza (RIOS *et al.*, 2010), incluindo animais vertebrados e vários táxons filogeneticamente distantes, como bactérias, algas, plantas, fungos e animais invertebrados (MIGLIORI *et al.*, 2012). A molécula foi isolada pela primeira vez em 1958, por Aaron B. Lerner (LERNER *et al.*, 1958); posteriormente, um grande número de pesquisadores focaram seus estudos nessa molécula.

Em todos os animais, a MEL é sintetizada principalmente na glândula pineal durante o período escuro do ciclo circadiano (FARIA *et al.*, 2013), sendo conhecida como o “hormônio das trevas” (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2006). Está envolvida com o tempo e em processos relacionados ao tempo, como codificação de informações de relógio e calendário no cérebro (ERREN; REITER, 2015). No entanto, em seres humanos, sua síntese também ocorre em outros tecidos, principalmente para utilização local, e são independentes do ciclo claro/escuro. Esses tecidos extrapineais incluem a retina (TOSINI; MENAKER, 1998), intestino (BUBENIK, 2002), pele (SLOMINSKI *et al.*, 2005) e células da medula óssea (CONTI *et al.*, 2000). Entretanto, as concentrações de MEL encontradas no plasma circulante e no líquido cefalorraquidiano derivam quase exclusivamente da glândula pineal (CAROCCI; CATALANO; SINICROPI, 2014; LEWY, 2003; PANDI-PERUMAL *et al.*, 2008).

A MEL é derivada do aminoácido triptofano que sob a ação da enzima triptofano hidroxilase (TPOH) é convertida em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Este sofre descarboxilação pela enzima descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos, formando serotonina (5-HT). A serotonina é acetilada sob a ação da arilalquilamina-N-acetiltransferase (AA-NAT), sendo convertida em N-acetilserotonina (NAS), que por sua vez, é oximetilada pela hidroxí-indol-O-metil-transferase (HIOMT) dando origem finalmente a MEL (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2006).

A síntese de MEL depende de uma via neural que se inicia em neurônios das células ganglionares da retina que expressam melanopsina e são intrinsecamente fotossensíveis (DACEY *et al.*, 2005; PANDA *et al.*, 2005). Esses neurônios transmitem

as informações da luminosidade ambiental por meio de projeções do trato retino-hipotalâmico para o núcleo supraquiasmático – NSQ (MOORE; LENN, 1972). O NSQ projeta-se para os núcleos paraventriculares hipotalâmicos e, desses, para a coluna intermediolateral dos segmentos torácicos superiores da medula espinhal, onde estão localizados os neurônios pré-ganglionares simpáticos, que por sua vez, projetam axônios aos gânglios cervicais superiores que enviam projeções simpáticas pós-ganglionares por meio dos nervos *conarii* para a glândula pineal, podendo ocasionar a liberação de noradrenalina para modular a síntese de MEL (KAPPERS, 1960; REITER, 1991).

Além da regulação pela noradrenalina, outros fatores também podem modular a síntese de MEL, incluindo o peptídeo vasoativo intestinal (VIP), peptídeo de ativação cíclica do adenilato hipofisário (PACAP), neuropeptídeo Y (NPY) (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003), glutamato (KIM *et al.*, 2008), angiotensina (BALTATU *et al.*, 2002), leptina (PELICIARI-GARCIA *et al.*, 2013) e insulina (GARCIA *et al.*, 2008).

Por meio desta via neural, a produção de MEL expressa um ritmo circadiano sincronizado com o ciclo claro/escuro. O NSQ abrange todos os relógios periféricos e, dessa forma, todos os processos fisiológicos e comportamentais. Essa regulação é efetuada por meio de conexões neurais diretas ou indiretas e/ou mediadores humorais/hormonais e a MEL é um desses mediadores, sendo um importante sincronizador interno (CIPOLLA-NETO *et al.*, 2014) ou "zeitgeber interno" (DAWSON; ARMSTRONG, 1996).

Uma vez sintetizada pelos pinealócitos, a MEL é imediatamente secretada no sangue e no líquido cefalorraquidiano (SKINNER; MALPAUX, 1999). Liga-se principalmente à albumina no plasma (CARDINALI; LYNCH; WURTMAN, 1972) e pode ser aferida na saliva ou na urina (NOWAK *et al.* 1987). Em resumo, a informação fótica é traduzida pela pineal em um sinal endócrino que é recebido por todas as células do corpo, contribuindo para a sincronização de várias atividades fisiológicas que também ocorrem em um padrão rítmico dependente do ciclo luz/escuro (ERREN; REITER, 2015).

A luminosidade pode inibir a produção de MEL via pineal (CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2012), sendo que a supressão é mais sensível à luz fluorescente azul (BRAINARD *et al.*, 1984). Desta forma, trabalhadores noturnos expostos à luz durante suas jornadas de trabalho apresentam diminuição da secreção de MEL pela glândula pineal (DIJK *et al.*, 2012; HARDELAND *et al.*, 2011; MARIE HANSEN; HELENE

GARDE; HANSEN, 2006) e desenvolvem uma dessincronização crônica do ritmo circadiano (FOLKARD, 2008; HAUS; SMOLENSKY, 2006).

Outros fatores determinantes na diminuição da secreção de MEL são o envelhecimento, tanto sobre a secreção de MEL via pineal (PANG *et al.*, 1990; REITER *et al.*, 1981), quanto sobre a secreção via tecidos extrapineais (SANCHEZ-HIDALGO *et al.*, 2009), bloqueadores  $\beta$ 1-adrenérgicos (ARENDT *et al.*, 1985), anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (MURPHY; MYERS; BADIA, 1996) e a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (MARKUS *et al.*, 2007).

A MEL exerce suas ações fisiológicas via receptores de membrana MT1 e MT2 acoplados à proteína G (DUBOCOVICH, 1995; REPPERT *et al.*, 1994), receptores nucleares da família do ácido retinoico, em particular, ROR $\alpha$ 1, ROR $\alpha$ 2, RZR $\alpha$  e RZR $\beta$  (WIESENBERG *et al.*, 1995), como também apresenta efeitos diretos (mediados por não receptores) em proteínas intracelulares como calmodulina ou tubulina (BENÍTEZ-KING, 2006; CARDINALI; FREIRE, 1975).

Os receptores de membrana estão presentes em muitos tecidos, incluindo, por exemplo, vasculatura, células imunes, órgãos vegetativos (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005) e NSQ (DUBOCOVICH; BENLOUCIF; MASANA, 1995; REPPERT *et al.*, 1988). O receptor MT1 diminui as taxas de disparo neuronal, enquanto o receptor MT2 regula as mudanças de fase dos ritmos circadianos (DUBOCOVICH *et al.*, 2003). Um terceiro receptor de membrana é o receptor MT3, identificado como a enzima quinona redutase 2 (QR2) (RIOS *et al.*, 2010). A ampla distribuição desses receptores indica a capacidade de resposta da MEL em numerosos órgãos periféricos (POIREL *et al.*, 2003). Em geral, a ativação desses receptores inibe a adenilato ciclase (RIOS *et al.*, 2010), diminui a concentração de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (CAROCCI; CATALANO; SINICROPI, 2014), seguido por diminuição da atividade da proteína quinase A (PKA) e fosforilação da proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc (CREB) (DUBOCOVICH *et al.*, 2003; JIN *et al.*, 2003).

As funções da MEL podem ser divididas em cronobióticas e não-cronobióticas. Os efeitos cronobióticos compreendem a regulação das funções fisiológicas e neuroendócrinas, como a sincronização dos ritmos reprodutivos sazonais (TAMARKIN *et al.*, 1976), a regulação dos ciclos circadianos (ALONSO-VALE *et al.*, 2008), do ciclo sono/vigília (LYSENG-WILLIAMSON, 2012), da temperatura (AOKI *et al.*, 2008) e do ritmo diário dos hormônios (IKEGAMI *et al.*, 2019) e citocinas (CECON; MARKUS,

2011). Os efeitos não-cronobióticos estão altamente relacionados à resposta de defesa imunológica (CECON; MARKUS, 2011), a efeitos anti-inflamatórios (GENOVESE *et al.*, 2005), antidepressivos (ERGÜN *et al.*, 2006), anticonvulsivantes (YAHYAVI-FIROUZ-ABADI *et al.*, 2006) e analgésicos (MANTOVANI *et al.*, 2006). Além disso, os efeitos não-cronobióticos também apresentam propriedades antioxidantes e de remoção de radicais livres, mostrando um papel protetor em várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como a doença de Alzheimer (SRINIVASAN *et al.*, 2005) e a doença de Parkinson (MILLER; SELHUB; JOSEPH, 1996).

Outros papéis atribuídos à MEL envolvem proteção contra o câncer (BONDY; CAMPBELL, 2018), ação na fisiologia óssea (MARANI, 2018; PALIN *et al.*, 2018), no metabolismo energético, na secreção e ação da insulina, na expressão gênica do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) (KORKMAZ *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 1998) e na regulação da glicemia (KARAMITRI *et al.*, 2013). Devido ao seu potencial terapêutico em várias condições clínicas, há vários estudos que demonstram a resposta benéfica à administração exógena de MEL (CAROCCI; CATALANO; SINICROPI, 2014; CECON; MARKUS, 2011).

Sob condições normais, a resposta imunológica inata envolve uma fase pró-inflamatória seguida de uma fase anti-inflamatória. O equilíbrio entre elas culmina na defesa contra patógenos, delimitação do dano tecidual, recuperação e cicatrização tecidual (LICASTRO *et al.*, 2005). Diversos mecanismos fisiológicos, incluindo as ações da MEL, contribuem para interromper uma resposta de defesa desnecessária (NELSON; DRAZEN, 2000).

Quando um organismo é lesado, é necessária uma resposta imunológica rápida e eficiente. As citocinas inflamatórias inicialmente liberadas, como o fator de necrose tumoral (TNF)  $\alpha$ , bloqueiam a produção noturna de MEL por meio da via NF- $\kappa$ B. O estudo de Da Silveira Cruz-Machado *et al.* (2010) verificou que a ativação dos receptores TLR4/CD14 pelos lipopolissacarídeos (LPS) induz à translocação nuclear dos dímeros p50/p50 e p50/pRELA NF- $\kappa$ B, que leva à expressão de TNF- $\alpha$  em pinealócitos, regulação positiva de receptor 1 de TNF (TNFR1) nestas células e a inibição da via biossintética da MEL. Esta inibição ocorre por meio da inibição da transcrição gênica de AA-NAT (uma enzima chave na síntese de MEL) pelo TNF- $\alpha$  (FERNANDES *et al.*, 2006). O incremento da MEL, durante o período noturno, prejudica a rolagem e a adesão dos leucócitos às camadas endoteliais, prejudicando

a migração celular e estimulando a produção noturna de interleucina (IL) 2 pelos linfócitos T auxiliares, exercendo um efeito imunoestimulador. Por outro lado, a liberação de TNF- $\alpha$  a partir de macrófagos ativados suprime o aumento noturno da MEL, permitindo uma migração celular completa e inibindo a produção de IL-2. Em sequência, as células mononucleares e polimorfonucleares ativadas produzem MEL de maneira parácrina no local da lesão, que elimina os radicais livres e colabora para resolver a resposta inflamatória. A diminuição sequencial da produção de TNF- $\alpha$  é seguida pela recuperação do aumento noturno da MEL e produção de IL-2 (MARKUS *et al.* 2007).

A MEL pode se ligar a receptores de membrana acoplados à proteína G de células imunocompetentes (POON *et al.* 1994; MAESTRONI, 1995). Os linfócitos CD4<sup>+</sup> são células mais responsivas à MEL do que os linfócitos CD8<sup>+</sup>, devido a presença de maior número de sítios de ligação para este hormônio. A MEL aumenta a produção de IL-2 e interferon (IFN) -  $\gamma$  nessas células. Em contrapartida, a IL-2 inibe a produção de MEL pela glândula pineal, indicando um sistema de retroalimentação negativo (MAESTRONI, 1998). Salienta-se que a susceptibilidade à MEL depende do ciclo claro-escuro e da estação do ano.

Considerando os efeitos da MEL sobre os processos inflamatórios, Cutando *et al.* (2015) demonstraram que a aplicação tópica de MEL em pacientes com doença periodontal (DP) promoveu melhora na saúde periodontal. Ademais, Dos Santos *et al.* (2018) demonstraram que a MEL promoveu redução na concentração plasmática de TNF- $\alpha$ , melhora na sensibilidade à insulina e no perfil lipídico em ratos pinealectomizados com DP.

## 1.2 Periodontite apical (PEA)

A periodontite apical (PEA), patologia semelhante à DP, se caracteriza como uma lesão inflamatória aguda (sintomática) ou crônica (assintomática), localizada junto ao ápice dentário, causada pela infecção microbiana dos canais radiculares (STASHENKO *et al.*, 1994). Esta condição está geralmente associada à restauração de dentes com lesões profundas de cárie ou dentes fraturados. Ademais, a PEA pode ocorrer como consequência de vários insultos à polpa dentária, incluindo infecção, traumas físicos, iatrogênicos e após terapia endodôntica mal sucedida (STASHENKO;

TELES; D'SOUZA, 1998). No estudo de Kakehashi *et al.* (1965), que avaliou animais comuns e germ-free, a PEA ocorreu somente em dentes que apresentavam microorganismos. Este trabalho evidenciou que em animais germ-free a exposição pulpar ao meio bucal promoveu apenas uma resposta inflamatória mínima. Por outro lado, em animais comuns (portadores de uma microbiota), observou-se uma infecção com necrose pulpar e abscesso apical.

A regulação da inflamação da PEA é extremamente complexa, na qual participam diferentes tipos celulares, tais como leucócitos (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e linfócitos B e T, especialmente T-helper [Th] e T-supressores), citocinas, neuropeptídeos e prostaglandinas (PG) (CYMERMAN *et al.*, 1984; METZGER, 2000; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Inicialmente, ocorre contaminação predominantemente por microorganismos aeróbios facultativos e, após mudança microbiana devido ao ambiente pulpar, predominam os microorganismos anaeróbios gram-negativos (SUNDQVIST, 1992). A parede celular desses microorganismos possui endotoxina denominada LPS (PALSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2004). A resposta do sistema imune aos LPS inicia-se por meio de lesão inflamatória pulpar e consequente PEA com concomitante reabsorção óssea (STASHENKO *et al.*, 1994).

A princípio, as respostas à microbiota oral incluem o influxo de leucócitos polimorfonucleares (PMN) (WARFVINGE; DAHLEN; BERGENHOLTZ, 1985) e monócitos (BERGENHOLTZ; NAGAOKA; JONTELL, 1991). O infiltrado celular torna-se progressivamente mais intenso e assume caráter "misto", composto por macrófagos, linfócitos T citotóxicos e T auxiliares (T-helper) (HAHN; FALKLER; SIEGEL, 1989; KAWASHIMA *et al.*, 1996; KOPP; SCHWARTING, 1989; METZGER, 2000). As células T-helper (Th) 1 produzem predominantemente IL-2 e IFN- $\gamma$ , os quais possuem papel importante no recrutamento e ativação de macrófagos, enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-6 que estimulam diferenciação, proliferação e ativação de anticorpos (JONTELL *et al.* 1998). Os neutrófilos e os monócitos/macrófagos são células sanguíneas recrutadas para os locais de infecção, um processo mediado pela ligação a moléculas de adesão epitelial que são induzidas pelas citocinas TNF e IL-1. Quando estão no local da infecção, os neutrófilos e macrófagos reconhecem os patógenos por meio de vários receptores, ingerem-nos para destruição intracelular, secretam citocinas e respondem de outras maneiras para eliminar os patógenos e reparar os tecidos infectados (ABBAS; LICHTMAN, p. 42,

2009). Stashenko e colaboradores (1994) demonstraram que a PEA em ratos expandiu-se rapidamente nos primeiros 7 a 20 dias após a lesão (fase aguda) e desacelerou a partir deste período (fase crônica). Dessa forma, os ratos deste projeto de pesquisa serão considerados como portadores de PEA em fase crônica.

Há algum tempo tenta-se elucidar os efeitos de inflamações orais sobre a saúde sistêmica. Walton e Langeland (1978) relatam estar bem elucidado na literatura que uma ampla gama de materiais e substâncias, quando inoculados em tecido pulpar, pode 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 patologias orais de caráter inflamatório ocorrem simultaneamente com outros danos sistêmicos, tais como osteoporose (DODD; ROWE, 2013), doenças cardiovasculares (CAPLAN *et al.*, 2006; DESVARIEUX *et al.*, 2004; SEYMOUR *et al.*, 2007), doenças respiratórias (PAJU; SCANNAPIECO, 2007) e resistência insulínica (RI) (ASTOLPHI *et al.*, 2013), que está relacionada com o *Diabetes Mellitus* tipo II (DM2).

### **1.3 Sinalização insulínica e mecanismos relacionados à resistência insulínica na PEA**

Em tecidos sensíveis à insulina, esse hormônio liga-se ao seu receptor e aumenta a atividade do receptor da insulina de tirosinaquinase, 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 de GLUT4 para o sarcolema e possibilitando a entrada de glicose. Portanto, a manutenção das respostas adequadas da via IRS-PI3K-Akt é crucial para o normal metabolismo de glicose mediada pela insulina em tecidos sensíveis à mesma (WEI *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa conduziu alguns estudos com objetivo de compreender mecanismos relacionados à RI na PEA. Em uma de nossas publicações (PEREIRA *et al.*, 2017) foi relatado que ratos com PEA apresentam um aumento do conteúdo de macrófagos e maior sinalização inflamatória no tecido

muscular, concomitante ao aumento das concentrações séricas de LPS. Dessa forma, além da inflamação de baixo grau caracterizada por um aumento de citocinas inflamatórias, os LPS presentes nas bactérias da cavidade oral podem atingir a circulação sistêmica e também atuarem como um possível mediador de alterações sistêmicas (GEERTS *et al.*, 2002).

Os LPS possuem a capacidade de ativar receptores do tipo *Toll* (TLR), receptores de superfície celular que atuam na ativação da imunidade inata e indução de respostas inflamatórias. Esta substância é um ligante específico para TLR2 e TLR4, apresentando maior especificidade para o TLR4, que, particularmente, está expresso em vários tipos celulares, mas principalmente em células do sistema imune (MEDZHITOV, 2001; TAKEUCHI *et al.*, 2002). Quando liberado por bactérias gram-negativas, os LPS associam-se a uma proteína plasmática solúvel chamada proteína ligante de LPS (LBP ou *LPS-binding protein*) (KRASITY *et al.*, 2015), que auxilia a ligação dos LPS ao co-receptor CD14, formando o complexo LPS-CD14. Este complexo, por sua vez, é reconhecido pelo complexo TLR4-MD-2, presente na superfície celular, que é capaz de promover o recrutamento intracelular de moléculas adaptadoras, tais como o fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88). Esta molécula pode ativar as serinas quinases JNK e IKK $\alpha/\beta$ , que promovem ativação dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e proteína ativadora 1 (AP-1) (OHNISHI; MUROI; TANAMOTO, 2007; PALSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2004).

O NF- $\kappa$ B regula a expressão de diversos genes envolvidos em diferentes processos celulares, como respostas inflamatórias e imunes, crescimento e desenvolvimento celular. Na ausência de um estímulo ativador de NF- $\kappa$ B, esta proteína está presente no citoplasma na forma inativa associada a uma proteína inibidora, a I $\kappa$ B (NAPETSCHNIG; WU, 2013). A ativação do NF- $\kappa$ B pode ocorrer, não somente por exposição das células à LPS, mas também por meio da ação de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1), ativação dos linfócitos T e B, radiação UV e expressão de produtos gênicos virais (BALDWIN JR, 1996). Após o estímulo, o complexo I $\kappa$ B quinase (IKK) é fosforilado e ativado. O complexo IKK é composto por duas subunidades catalíticas, IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ , além do modulador essencial do NF- $\kappa$ B (NEMO) ou IKK- $\gamma$  (LI; VERMA, 2002). Após ativação, IKK recruta e fosforila o I $\kappa$ B que é reconhecido pelo maquinário ubiquitina ligase, o que leva à sua poliubiquitinação e consequente degradação. Desta maneira, os dímeros de NF- $\kappa$ B translocam-se para o

núcleo, ligando-se em sítios específicos do DNA e promovendo a transcrição de um grande número de citocinas (LI; VERMA, 2002; NAPETSCHNIG; WU, 2013).

Estudos mostraram que infecções resultam em um estado de RI e que os LPS têm efeitos significativos sobre a sensibilidade à insulina (AGWUNOBI *et al.*, 2000). É cada vez mais reconhecido que uma inflamação sistêmica de baixo grau precede e prediz o desenvolvimento de diabetes e doenças aterotrombóticas (DUNCAN *et al.*, 2003).

Estudos anteriores em nosso laboratório mostraram que a PEA, em ratos, pode: 1) causar aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ ; 2) reduzir o grau de fosforilação em tirosina do receptor insulínico em tecido adiposo branco (TAB-P), fígado e muscular; 3) reduzir o grau de fosforilação em serina da Akt em tecido muscular esquelético gastrocnêmio (MG); 4) diminuir o conteúdo de GLUT4 em MG; 5) promover RI nestes animais (ASTOLPHI *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2017). Adicionalmente, a associação de doenças periodontais e pulpares com diabetes aumenta os níveis de triglicerídeos (TG) em ratos diabéticos (CINTRA *et al.*, 2013).

A insulina é um hormônio anabólico essencial para a manutenção da homeostase glicêmica, do crescimento e da diferenciação celular. Ademais, esse hormônio atua no tecido hepático (via gliconeogênese e glicogenólise), muscular (aumenta a captação de glicose, síntese proteica e inibe a proteólise) e adiposo (aumenta a captação de glicose, estimula a lipogênese e reduz a lipólise) (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). O quadro de RI envolve o aumento compensatório da produção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas. Porém, com a progressão desta condição, a produção de insulina diminui, devido ao aumento na demanda secretória, e ocorre falência das células  $\beta$  pancreáticas. Dessa forma, a secreção de insulina torna-se insuficiente para compensar a RI (PRADHAN; GOEL, 2011).

A MEL exerce efeitos regulatórios sobre a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas e modula positivamente o metabolismo das lipoproteínas plasmáticas (AGIL *et al.*, 2011; HUSSAIN, 2007; MIZRAK *et al.*, 2004; SENER *et al.*, 2004). Em pacientes diabéticos, a MEL contribui para a redução da concentração plasmática de colesterol total (CT), lipoproteínas de baixa densidade (C-LDL) e TG, promovendo o aumento das lipoproteínas de alta densidade (C-HDL) (ALÂ *et al.*, 2006; KADHIM; ALJAWAD; HASHIM, 2014). Adicionalmente, a MEL mostrou-se eficiente no controle tanto da reabsorção óssea alveolar como da concentração plasmática de TNF- $\alpha$  em

ratos com DP e pinealectomizados, demonstrando sua importância local e sistêmica (MARANI, 2018). Ademais, Saritekin *et al.* (2019) demonstraram, por meio de análises histológica e radiográfica, que a administração de MEL (via intraperitoneal, na dose de 10 mg/kg, durante 21 dias) diminuiu o processo inflamatório e a destruição óssea em lesões periapicais induzidas experimentalmente em ratos. Os autores deste estudo concluíram que a MEL apresenta efeitos antirreabsortivos no osso, associados a lesões periapicais induzidas experimentalmente em ratos por meio de sua atividade anti-inflamatória.

Considerando a relação entre processos inflamatórios orais e a RI e os efeitos da MEL nessas variáveis, se faz relevante avaliar a influência de sua administração sobre um processo inflamatório localizado como a PEA.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar em ratos com periodontite apical: os efeitos da suplementação de melatonina sobre a sensibilidade à insulina; vias de sinalização insulínica e inflamatória; concentração plasmática de citocinas inflamatórias e perfil lipídico.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar em ratos com periodontite apical e suplementação de melatonina:

- 1) glicemia;
- 2) insulinemia;
- 3) resistência à insulina (HOMA-IR);
- 4) grau de fosforilação em tirosina da pp185 e grau de fosforilação em serina da Akt (antes e após o estímulo insulínico) em músculo sóleo (MS) e extensor digital longo (EDL);
- 5) grau de fosforilação de JNK e IKK $\alpha/\beta$  em MS e EDL;
- 6) concentração plasmática de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10);
- 7) perfil lipídico (colesterolemia e triacilgliceridemia).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Este estudo seguiu os Princípios Éticos e Diretrizes para Experimentação Animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, Brasil (protocolo número 00815-2018). Os ratos Wistar foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 07:00) a  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  com comida (Presence®, Paulínia, São Paulo, SP, Brasil) e água disponíveis *ad libitum*.

Setenta e dois ratos Wistar albinos, machos, com 60 dias, foram distribuídos em quatro grupos: a) ratos controle (CN); b) ratos controle suplementados com MEL (CNMEL); c) ratos com PEA induzida em primeiros e segundos molares (superiores e inferiores) do lado direito (PEA); d) ratos com PEA induzida em primeiros e segundos molares (superiores e inferiores) do lado direito, suplementados com MEL (PEAMEL).

#### 3.2 Indução da periodontite apical

Aos 60 dias de vida, os animais dos grupos PEA foram submetidos à indução das PEA. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (80 mg/kg, intramuscular; Dopalen, Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínia, SP, Brasil) e xilazina (10 mg/kg, intramuscular; Anasedan, Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínia, SP, Brasil) e empregando-se uma broca cirúrgica com 0,1 mm de diâmetro (Broca LN Long Neck, Dentsply Ind e Com Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil), as polpas dentárias dos primeiros e segundos molares (superiores e inferiores) do lado direito foram expostas ao ambiente bucal através da superfície oclusal (Fig. 1). Durante sessenta dias, a ingestão de ração e o peso corporal dos ratos foram avaliados diariamente.

**Figura 1 - Indução da periodontite apical em rato com o auxílio de uma broca em baixa rotação.**



Fonte: do autor.

### **3.3 Administração de melatonina**

Os animais dos grupos CNMEL e PEAMEL receberam MEL (Melatonin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) logo após a indução da PEA por via oral solubilizada na água de beber no período escuro, iniciando às 19 h e encerrando às 7 h, na dosagem de 5 mg/kg de peso corpóreo baseado em estudos anteriores (AGIL *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; SARTORI *et al.*, 2009) durante 60 dias.

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

### 3.4 Eutanásia

Após 60 dias de tratamento com MEL, 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, SP, 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, CNMEL, PEA e PEAMEL (n = 10 animais por grupo) foi submetido a 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, Franklin Lakes, NJ, EUA) e centrifugadas a  $3000 \times g$  por 15 minutos a 4° C. O plasma obtido foi armazenado em alíquotas a -80° C para quantificação das concentrações plasmáticas das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10, insulinemia, glicemia, colesterolemia e triacilgliceridemia. Após este procedimento, os animais foram eutanasiados por dose excessiva do anestésico tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil; 3%, 150 mg/100 g p. c., i. p.).

Foram coletados de outro grupo de ratos CN, CNMEL, PEA e PEAMEL (n = 8 animais por grupo), amostras de MS e EDL para analisar a via inflamatória e a via de sinalização insulínica por meio da técnica de Western Blotting. Para quantificar o grau de fosforilação em tirosina da pp185 e grau de fosforilação em serina da Akt (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 a injeção de 1,5 U.I de insulina regular (Humulin, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, EUA) (i. v., veia porta) em tempos variáveis (75 s para EDL, 90 s para o MS). Salientamos que para analisar o grau de fosforilação de JNK e IKK foram utilizadas amostras de tecidos (MS e EDL) sem a estimulação da insulina. Após os experimentos, todos os animais foram eutanasiados por dose excessiva do anestésico tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil; 3%, 150 mg/kg p. c., i. p.).

### **3.5 Análise histológica da região apical**

Após a eutanásia, foi removida toda a pele correspondente à face direita do animal e com dois cortes com tesoura, situados no ângulo da boca, foi realizada a separação da mandíbula e maxila. Para remoção da hemimaxila direita foi empregada uma lâmina intercambiável nº 15, montada em cabo de bisturi e foi realizada uma incisão em profundidade no palato do animal ao nível de plano sagital mediano acompanhando a sutura intermaxilar separando a maxila direita da esquerda. Separadas as hemimaxilas e, empregando-se novamente uma tesoura, foi realizado outro corte de modo a tangenciar a face distal dos molares superiores direitos, possibilitando a obtenção da hemimaxila direita, contendo os dentes objeto do estudo. Após remoção, as peças foram colocadas em frascos contendo formalina 4%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 24 horas e depois lavadas em água corrente por um período de 12 horas para a remoção de toda solução de fixação. Em seguida, as peças foram desmineralizadas em solução de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a 10% por 90 dias. Posteriormente, as hemimaxilas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Após inclusão, as peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 5 µm de espessura, no eixo distal-mesial dos segundos molares superiores realizados por um micrótomo (RM2155, Leica Microsystems, BD, Wetzlar, Alemanha), corados com hematoxilina e eosina (H&E) e analisados por microscopia óptica (DM 4000 B, Leica).

### **3.6 Avaliação da glicemia**

A glicemia foi analisada pelo método enzimático glicose-oxidase (Analisa Diagnóstica, São Paulo, Brasil). Nesse método, a glicose é oxidada pela enzima glicose oxidase (GOD) gerando ácido glucônico e água oxigenada. O peróxido de hidrogênio, em presença de peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-amino fenazona (4-AF), dando origem a um cromógeno com máximo de absorção em 505 nm de comprimento de onda.

Devem ser consideradas as seguintes reações resumidas: glicose + O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O → ácido glucônico + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-AF + fenol → 4 (p-benzoquinona monoimino) fenazona + 4 H<sub>2</sub>O.

### **3.7 Avaliação da insulinemia**

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

### **3.8 Avaliação do índice HOMA-IR**

A resistência 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 = glicemia de jejum (mmol/L) x insulinemia de jejum (μIU/mL)/22,5 (BONORA *et al.*, 2000).

### **3.9 Avaliação das concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias**

As concentrações plasmáticas das citocinas TNF-α, IL-10, IL-6 e IL-1β foram determinadas pelo método ELISA com a utilização de kits de acordo com as instruções dos fabricantes (TNF-α e IL-10: Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, EUA; IL-6: BD Biosciences, San Diego, EUA; IL-1β: Immuno-Biological Laboratories, Inc., Minneapolis, MN, EUA).

### **3.10 Avaliação do perfil lipídico**

#### **3.10.1 Avaliação da concentração plasmática de triglicerídeos**

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

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

#### **3.10.2 Avaliação da concentração plasmática de colesterol total**

Este é um método enzimático específico para quantificação de colesterol total (CT) (Quibasa Química Básica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil). Neste método, os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e pelo peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando um composto róseo-avermelhado (antipirilquinonimina) que tem absorvidade máxima de 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

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

### **Cálculos**

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

### **3.10.3 Avaliação da concentração plasmática de colesterol HDL**

Este é um método enzimático específico para quantificação de colesterol HDL (C-HDL) (Quibasa Química Básica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil). O conjunto colesterol HDL é um sistema que se destina à separação do colesterol ligado à fração HDL no plasma sanguíneo. A mistura ácido fosfotúngstico/cloreto de magnésio precipita os quilomícrons, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL) sem alterar a solubilidade das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Após centrifugação, recolhe-se o líquido sobrenadante que contém a fração HDL cujo conteúdo em colesterol é determinado enzimaticamente. Para a dosagem do C-HDL foram utilizados 100 µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente de cor. Essa solução foi homogeneizada e colocada em banho-maria a 37° C durante 10 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 500 nm; acertando o zero com o branco.

### **Cálculos**

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

### **3.10.4 Avaliação da concentração plasmática de colesterol LDL e VLDL**

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

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

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

### **3.11 Avaliação da via inflamatória (IKK e JNK) e da sinalização insulínica (pp185 e Akt) em MS e EDL**

#### **3.11.1 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, EUA), 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 %).

- **“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 poliacrilamida. Por meio deste método, foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades proteicas sejam perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações proteicas. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli (1970) e modificado por Garfin (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: o gel de “stacking” (3,39% T, 2,7% C – acrilamida 3,3%; bisacrilamida 0,09%; Tris 25 mM, pH 8,9; EDTA 2,0 mM; SDS 0,1%; TEMED 0.111%; persulfato de amônio 0,27%) e o gel de resolução (6,16% T, 2,7% C - acrilamida 8%; bisacrilamida 0,16%; Tris 388 mM, pH 6,7; EDTA 2,1 mM; SDS 0,1%; TEMED 0.115%; persulfato de amônio 0,17%; glicerol 10%).

Na montagem, o gel de resolução 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, EUA).

• **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, Alemanha). 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, lavada com SB por três sessões de 10 min. Em seguida, as membranas foram incubadas em solução (SB + 3% de leite desnatado) contendo os anticorpos anti JNK, anti p-JNK, anti IKK $\alpha/\beta$ , anti p-IKK- $\alpha/\beta$ , anti-fosfo-Akt (Ser473) e antifosfotirosina. Todos os anticorpos foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, EUA. 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, Alemanha). Novamente, foram realizadas 3 lavagens da membrana de nitrocelulose com SB, com duração de 10 min cada lavagem. Após esses 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, Alemanha), 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 o programa Scion Image (Scion Image - Release Beta 3b, National Institutes of Health, Frederick, MD, EUA).

## **4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

1) Para a análise da massa corpórea, ingestão alimentar, glicemia, insulinemia, HOMA-IR, citocinas inflamatórias e perfil lipídico: a normalidade dos dados foi verificada estatisticamente. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de dois fatores, seguida pelo teste de Bonferroni. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$  usando o programa estatístico Graph Pad Prism versão 7.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EUA). Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

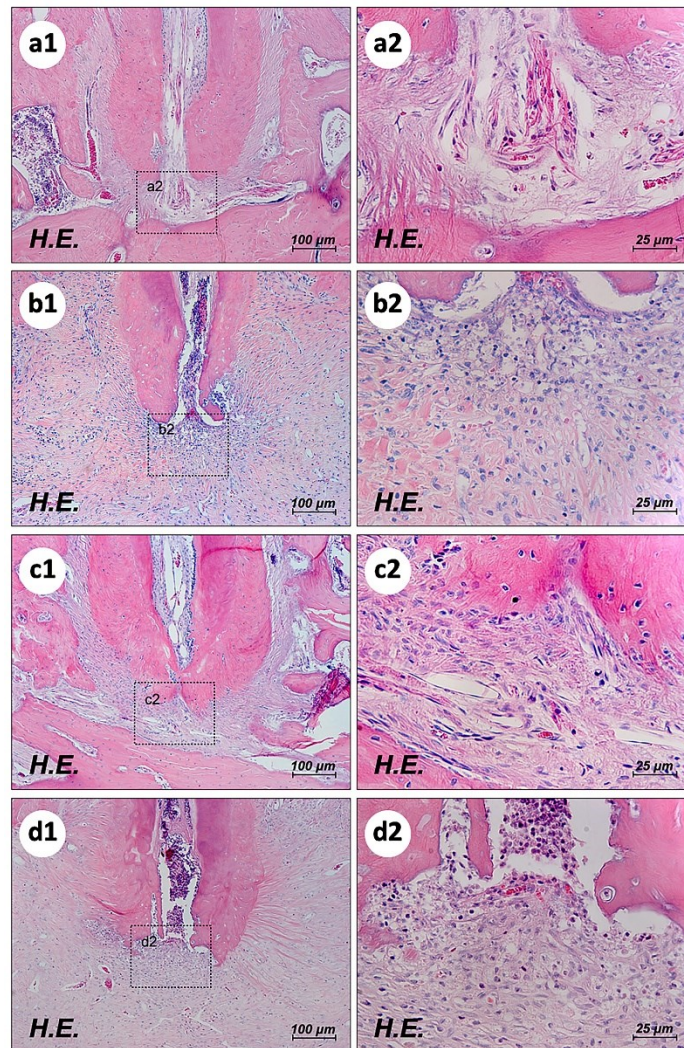
2) Para a análise das proteínas: a normalidade dos dados foi verificada estatisticamente. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de três fatores, seguida pelo teste de Bonferroni. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$  usando o programa estatístico Graph Pad Prism versão 7.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EUA). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Avaliação histológica da região periapical**

As análises histológicas mostraram que nos grupos CN e CNMEL, os ápices dentários apresentaram características compatíveis com aspecto normal. No entanto, nos grupos PEA e PEAMEL foram observadas infiltrações de células inflamatórias na área ao redor do ápice dentário e reabsorção dentária, 60 dias após a exposição pulpar (Fig. 2).

**Figura 2 -** Imagens representativas da análise histológica da região periapical após 60 dias de exposição pulpar. A coloração de H&E no grupo CN (a1, a2) mostrou região periapical livre de infiltrado inflamatório; o grupo PEA (b1, b2) com infiltrado inflamatório moderado ao redor do ápice, ruptura do ligamento periodontal e área de reabsorção óssea; o grupo CNMEL (c1, c2) apresentou região periapical livre de infiltrado inflamatório; o grupo PEAMEL (d1, d2) com infiltrado inflamatório moderado e área de reabsorção óssea periapical. (a1-d1, 100x; a2-d2, aumento de 400x).

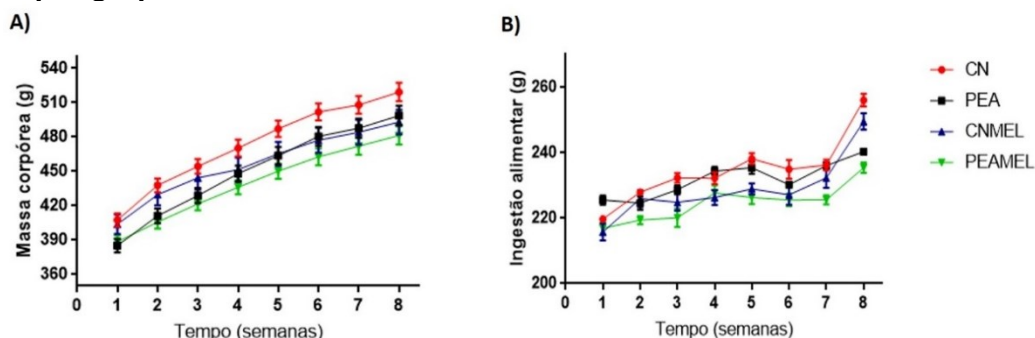


Fonte: do autor.

## 5.2 Avaliação da massa corpórea e ingestão alimentar

A massa corpórea e a ingestão alimentar dos grupos CN, PEA, CNMEL e PEAMEL foram avaliadas semanalmente, a partir da indução das PEA e início do tratamento com MEL na água de beber, até o final da manutenção dos animais (Fig. 3A e B). Os resultados demonstram que não houve diferença estatística significativa na massa corpórea e ingestão alimentar entre os grupos.

**Figura 3 - A. Massa corpórea semanal. B. Média da ingestão alimentar semanal. Grupos de ratos controle (CN), periodontite apical (PEA), controle suplementados com melatonina (CNMEL) e PEA suplementados com melatonina (PEAMEL). Parâmetros avaliados desde a indução das PEA e início do tratamento com melatonina, até o final da manutenção dos animais. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM de 18 animais por grupo.**



Fonte: do autor.

### 5.3 Avaliação da glicemia, insulinemia e HOMA-IR

O grupo CNMEL apresentou diminuição significativa na glicemia em comparação aos grupos CN e PEA ( $p = 0,019$  e  $p = 0,003$ , respectivamente). Entretanto não houve alterações neste parâmetro entre os grupos CN, PEA e PEAMEL e entre CNMEL e PEAMEL. Os valores de insulinemia foram maiores no grupo PEA quando comparados aos grupos CN e CNMEL ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,0008$ , respectivamente). Não houve diferenças estatísticas nas concentrações plasmáticas de insulina tanto entre os grupos CN, CNMEL e PEAMEL como entre os grupos PEA e PEAMEL. O HOMA-IR foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) no grupo PEA do que nos demais grupos. Não houve diferenças estatísticas do HOMA-IR entre os grupos CN, CNMEL e PEAMEL (Tabela 1).

**Tabela 1 - Glicemia, insulinemia e índice HOMA-IR.**

| Parâmetros                                 | CN                           | PEA                          | CNMEL                        | PEAMEL                        |
|--------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <b>Glicemia (mmol/l)</b>                   | 8.14 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup> | 8.43 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup> | 6.70 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup> | 7.19 $\pm$ 0.19 <sup>ab</sup> |
| <b>Insulinemia (<math>\mu</math>UI/ml)</b> | 6.87 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup> | 9.48 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup> | 7.26 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup> | 8.04 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup> |
| <b>HOMA-IR</b>                             | 2.49 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup> | 3.57 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup> | 2.17 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup> | 2.57 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>  |

Valores são apresentados como média  $\pm$  EPM\* ( $n = 10$  animais por grupo).

\* Mesmas letras sobrescritas indicam que não houve diferença estatística entre os grupos.

Legendas: CN – ratos controle; PEA – ratos com periodontite apical; CNMEL – ratos controle suplementados com melatonina; PEAMEL – ratos com periodontite apical suplementados com melatonina; HOMA-IR – modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina.

## 5.4 Avaliação das concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias

A concentração plasmática de TNF- $\alpha$  foi maior ( $p < 0,05$ ) no grupo PEA quando comparada aos demais grupos. Entretanto, não houve diferença neste parâmetro entre os grupos CN, CNMEL e PEAMEL (Tabela 2).

Houve um aumento significativo na concentração de IL-6 no grupo PEA em comparação aos grupos CN e CNMEL ( $p = 0,007$  e  $p = 0,036$ , respectivamente). No entanto, não houve diferença na concentração de IL-6 entre os grupos CN, CNMEL e PEAMEL e entre PEA e PEAMEL (Tabela 2).

A concentração de IL-1 $\beta$  foi maior ( $p < 0,05$ ) no grupo PEA em comparação aos demais grupos. Além disso, a concentração plasmática desta citocina no grupo CNMEL foi significativamente menor do que nos grupos CN e PEA ( $p = 0,015$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente). Não houve diferença na concentração de IL-1 $\beta$  entre os grupos CN e PEAMEL, bem como entre CNMEL e PEAMEL (Tabela 2).

Foi observada diminuição significativa de IL-10 no grupo PEA em comparação aos grupos CNMEL e PEAMEL ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,033$ , respectivamente) e aumento significativo no grupo CNMEL quando comparado aos grupos CN e PEA ( $p = 0,018$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente). Não houve diferença na concentração de IL-10 entre os grupos CN e PEA, bem como entre os grupos CN e PEAMEL e entre os grupos CNMEL e PEAMEL (Tabela 2).

**Tabela 2 - Concentrações plasmática de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10.**

| Parâmetros<br>(pg/mL)          | CN                             | PEA                           | CNMEL                         | PEAMEL                         |
|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | 8.56 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>   | 13.42 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup> | 9.21 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>  | 8.62 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>   |
| <b>IL-6</b>                    | 2.46 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>   | 2.60 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>  | 2.49 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>  | 2.54 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>  |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | 10.72 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>  | 14.06 $\pm$ 0.75 <sup>b</sup> | 7.59 $\pm$ 0.27 <sup>c</sup>  | 10.15 $\pm$ 0.85 <sup>ac</sup> |
| <b>IL-10</b>                   | 40.41 $\pm$ 1.22 <sup>ab</sup> | 34.22 $\pm$ 2.31 <sup>a</sup> | 48.62 $\pm$ 1.81 <sup>c</sup> | 41.87 $\pm$ 1.83 <sup>bc</sup> |

Valores são apresentados como média  $\pm$  EPM\* ( $n = 10$  animais por grupo).

\* Mesmas letras sobrescritas indicam que não houve diferença estatística entre os grupos.

Legendas: CN – ratos controle; PEA – ratos com periodontite apical; CNMEL – ratos controle suplementados com melatonina; PEAMEL – ratos com periodontite apical suplementados com melatonina; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; IL-6: interleucina 6; IL-1 $\beta$ : interleucina 1 $\beta$ ; IL-10: interleucina 10.

## 5.5 Avaliação das concentrações plasmáticas de colesterol e triglicerídeos

Não houve diferença nas concentrações de colesterol total e C-HDL entre os grupos (Tabela 3).

A concentração de C-LDL foi maior no grupo PEA quando comparado ao grupo CN ( $p = 0,031$ , tabela 3).

A concentração de C-VLDL foi maior no grupo PEA quando comparado aos grupos CNMEL e PEAMEL ( $p = 0,002$  e  $p = 0,005$ , respectivamente, tabela 3).

O grupo PEA apresentou aumento significativo na concentração de TG quando comparado aos grupos CN, CNMEL e PEAMEL ( $p = 0,0079$ ,  $p = 0,0002$  e  $p = 0,0004$ , respectivamente, tabela 3).

Não foram encontradas diferenças nas concentrações de C-LDL, C-VLDL e TG entre os grupos CN, CNMEL e PEAMEL (Tabela 3).

**Tabela 3 - Concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, colesterol-VLDL e triglicerídeos.**

| <b>Parâmetros<br/>(mg/dL)</b> | <b>CN</b>                  | <b>PEA</b>                 | <b>CNMEL</b>               | <b>PEAMEL</b>              |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Colesterol total</b>       | 130,80 ± 2,30 <sup>a</sup> | 133,40 ± 1,56 <sup>a</sup> | 131,60 ± 1,02 <sup>a</sup> | 127,60 ± 1,46 <sup>a</sup> |
| <b>C-HDL</b>                  | 59,53 ± 1,30 <sup>a</sup>  | 56,17 ± 0,48 <sup>a</sup>  | 55,75 ± 1,30 <sup>a</sup>  | 55,81 ± 0,78 <sup>a</sup>  |
| <b>C-LDL</b>                  | 53,41 ± 1,70 <sup>a</sup>  | 61,98 ± 1,84 <sup>bc</sup> | 55,52 ± 2,90 <sup>ac</sup> | 56,21 ± 1,40 <sup>ac</sup> |
| <b>C-VLDL</b>                 | 16,57 ± 0,26 <sup>ac</sup> | 17,62 ± 0,41 <sup>bc</sup> | 16,07 ± 0,18 <sup>a</sup>  | 16,20 ± 0,19 <sup>a</sup>  |
| <b>Triglicerídeos</b>         | 82,53 ± 0,86 <sup>a</sup>  | 88,25 ± 1,70 <sup>b</sup>  | 80,44 ± 0,91 <sup>a</sup>  | 80,86 ± 0,95 <sup>a</sup>  |

Valores são apresentados como média ± EPM\* ( $n = 10$  animais por grupo).

\* Mesmas letras sobrescritas indicam que não houve diferença estatística entre os grupos.

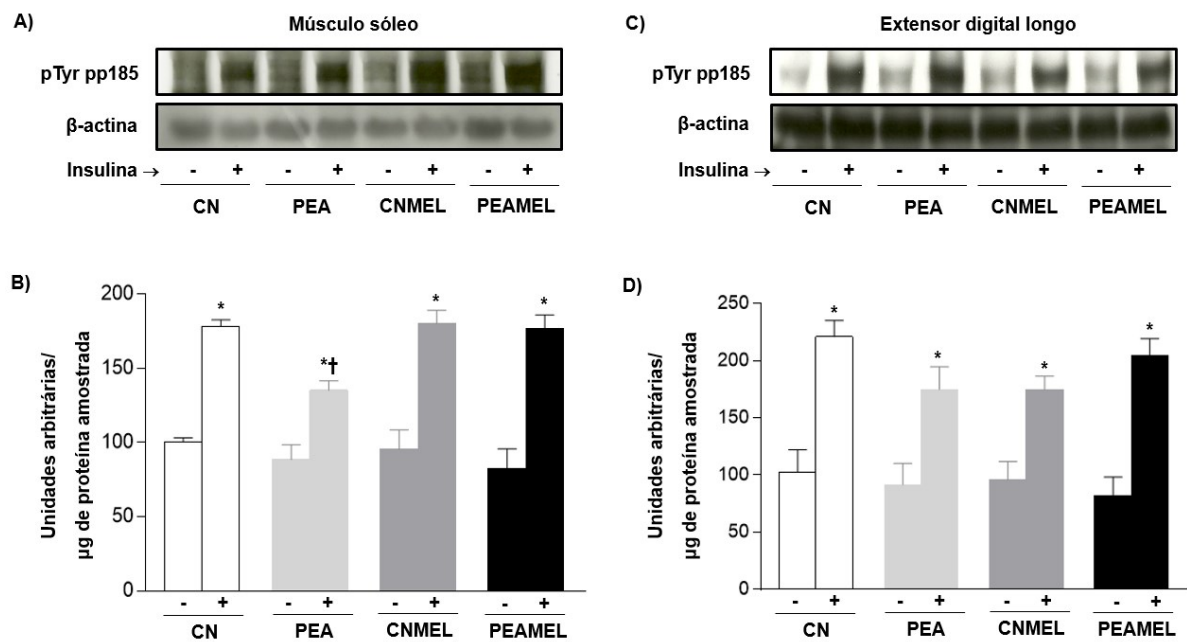
Legendas: CN – ratos controle; PEA – ratos com periodontite apical; CNMEL – ratos controle suplementados com melatonina; PEAMEL – ratos com periodontite apical suplementados com melatonina.

## **5.6 Avaliação da via de sinalização insulínica (pp185 e Akt) em MS e EDL**

O grau de fosforilação de pp185 em tirosina e de Akt em serina aumentou ( $p < 0,05$ ) após a estimulação com insulina em relação aos níveis basais em todos os grupos em MS e EDL.

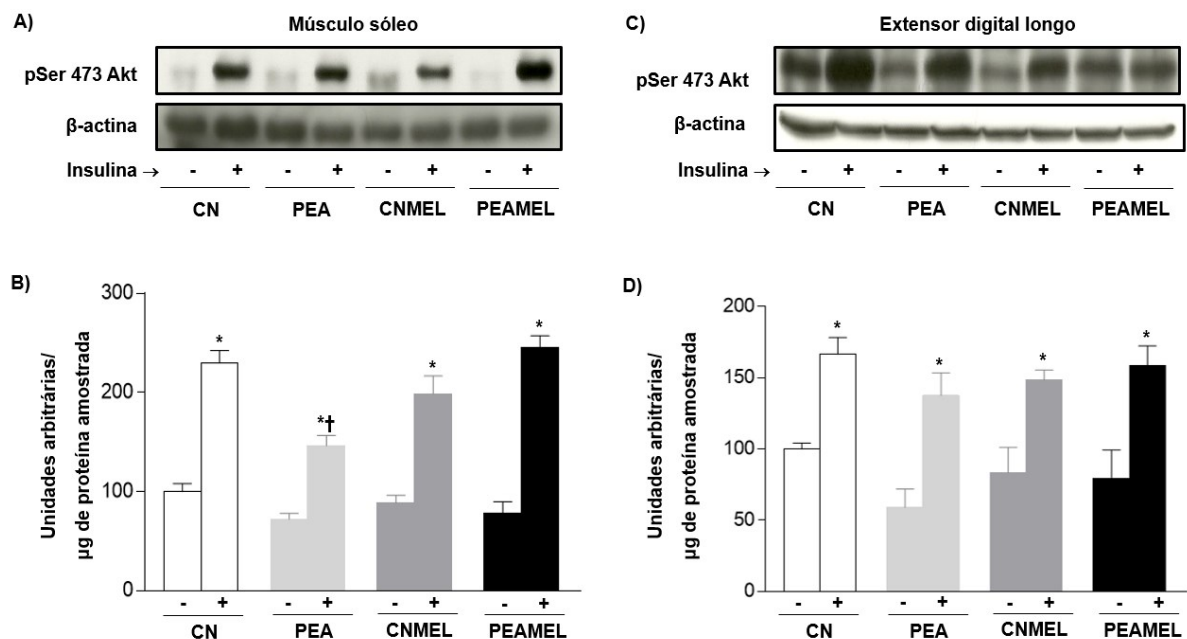
Após o estímulo insulínico, a fosforilação de pp185 em tirosina (Fig. 4A e B) e de Akt em serina (Fig. 5A e B) foi menor ( $p < 0,05$ ) no grupo PEA em comparação ao grupo CN, CNMEL e PEAMEL em MS. Entretanto, quando avaliamos essas proteínas (pp185 em tirosina e Akt em serina) em EDL não observamos diferenças estatísticas entre os grupos (Fig. 4C, 4D e Fig. 5C, 5D).

**Figura 4 - Avaliação do grau de fosforilação de pp185 em tirosina (pTyr) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em tecido muscular esquelético sóleo (MS) (A e B) e extensor digital longo (EDL) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). Em A e C, auto-radiografia típica: quantidades iguais de proteína (185 µg) foram submetidas a SDS-PAGE. β-actina foi utilizada como controle. Em B e D, valores do grau de fosforilação em tirosina da proteína pp185, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=8. \* p < 0,05 insulina (-) vs. insulina (+); † p < 0,05 PEA (+) vs. CN (+), CNMEL (+) e PEAMEL (+).**



Fonte: do autor.

**Figura 5 - Avaliação do grau de fosforilação de Akt em serina (pSer 473) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em tecido muscular esquelético sóleo (MS) (A e B) e extensor digital longo (EDL) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). Em A e C, auto-radiografia típica: quantidades iguais de proteína (185 µg) foram submetidas a SDS-PAGE. β-actina foi utilizada como controle. Em B e D, valores do grau de fosforilação em serina da proteína Akt, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=8. \* p < 0,05 insulina (-) vs. insulina (+); † p < 0,05 PEA (+) vs. CN (+), CNMEL (+) e PEAMEL (+).**

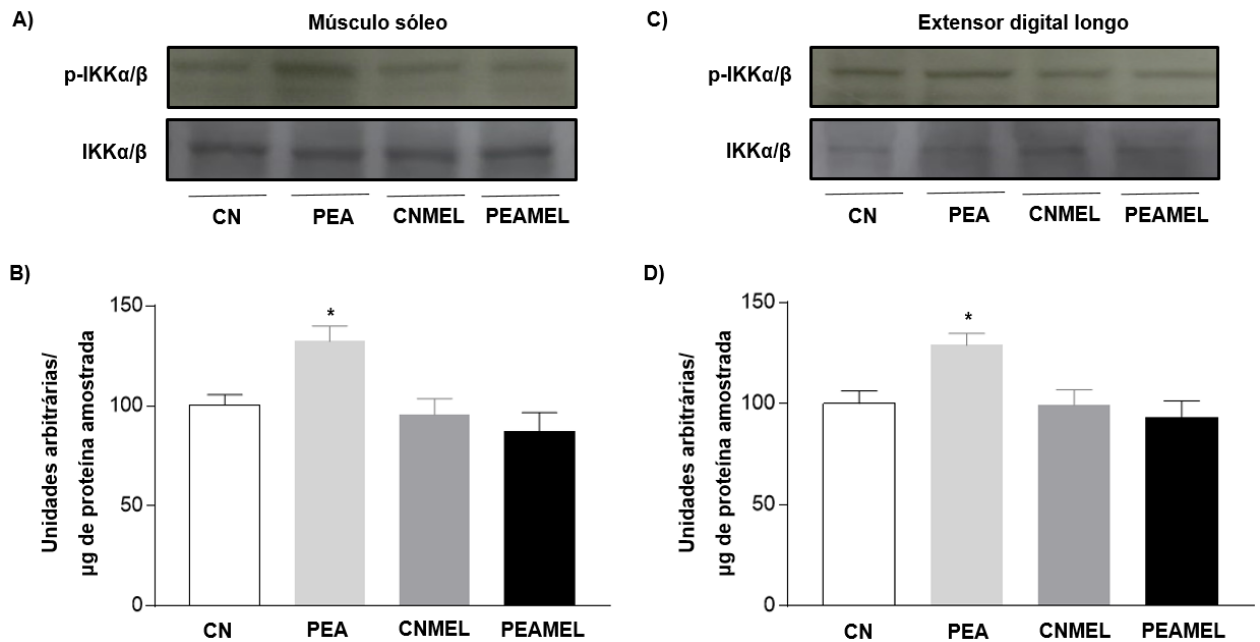


Fonte: do autor.

## 5.7 Avaliação da via inflamatória (IKKα/β e JNK) em MS e EDL

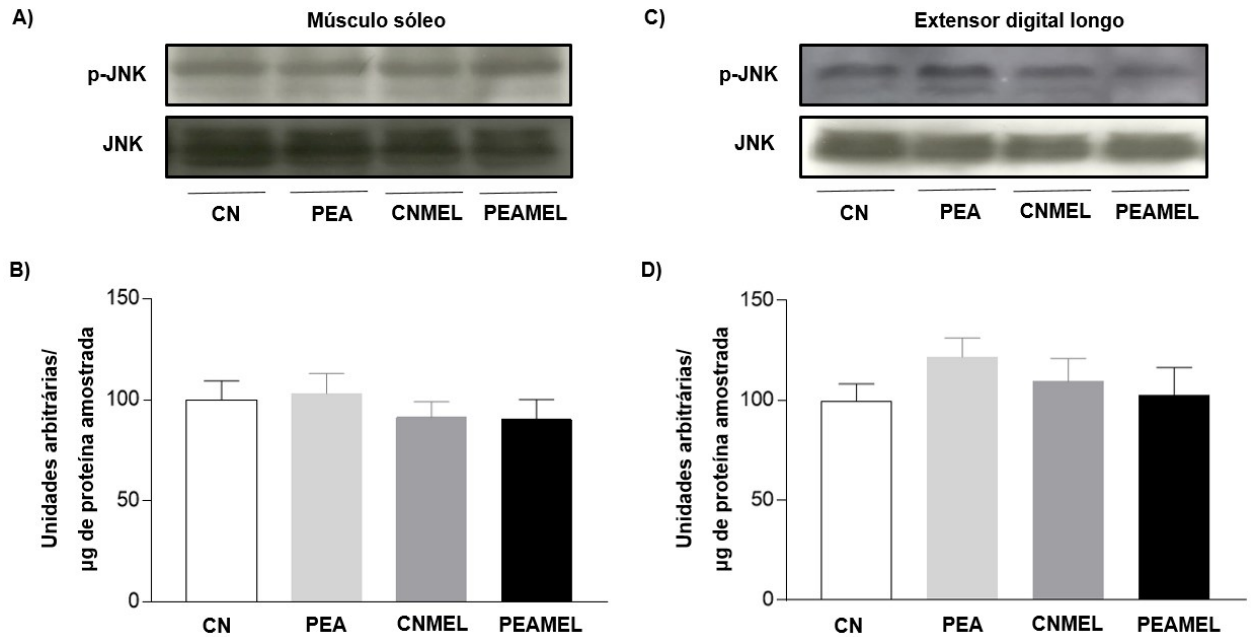
Observamos maior fosforilação de IKKα/β no grupo PEA em comparação aos grupos CN, CNMEL e PEAMEL no MS (p = 0,046, p = 0,015 e p = 0,002, respectivamente, fig. 6A e B) e EDL (p = 0,046, p = 0,038 e p = 0,008, respectivamente, fig. 6C e D). Não houve diferença na fosforilação de JNK entre os grupos em ambos os tecidos (Fig. 7).

**Figura 6 - Avaliação do grau de fosforilação da IKK $\alpha$ / $\beta$  em tecido muscular esquelético sóleo (MS) (A e B) e extensor digital longo (EDL) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). Em A e C, auto-radiografia típica: quantidades iguais de proteína (185  $\mu$ g) foram submetidas a SDS-PAGE. IKK $\alpha$ / $\beta$  foi utilizada como controle. Em B e D, valores do grau de fosforilação da proteína IKK $\alpha$ / $\beta$ , expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média  $\pm$  EPM, n=8. \*  $p < 0,05$  PEA vs. CN, CNMEL e PEAMEL.**



Fonte: do autor.

**Figura 7 - Avaliação do grau de fosforilação da JNK em tecido muscular esquelético sóleo (MS) (A e B) e extensor digital longo (EDL) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). Em A e C, auto-radiografia típica: quantidades iguais de proteína (185 µg) foram submetidas a SDS-PAGE. JNK foi utilizada como controle. Em B e D, valores do grau de fosforilação da proteína JNK, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média  $\pm$  EPM, n=8.**



Fonte: do autor.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a PEA em ratos promoveu: RI; dislipidemia; aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ); aumento do grau de fosforilação de IKK $\alpha$ / $\beta$  em MS e EDL. Além disso, ocasionou diminuição da concentração de IL-10 (anti-inflamatória) e prejudicou a transdução do sinal insulínico (grau de fosforilação da pp185 em tirosina e Akt em serina) em MS. A suplementação com MEL em ratos com PEA alterou: RI; concentrações de VLDL, TG, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10; sinal insulínico em MS; grau de fosforilação de IKK $\alpha$ / $\beta$  em MS e EDL.

A MEL 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). A literatura demonstra que a MEL regula a expressão do gene da pró-opiomelanocortina (POMC) hipotalâmico (RASMUSSEN *et al.* 2003), podendo exercer um efeito anorexigênico direto. No estudo de Buonfiglio *et al.* (2018) verificou-se que ratos pinealectomizados apresentam resistência central à leptina (hormônio responsável por promover uma resposta anorexigênica nos neurônios hipotalâmicos), alterações nos mecanismos termorregulatórios, diminuição da atividade do tecido adiposo marrom, aumento tanto da ingestão alimentar como do peso corporal. Em contrapartida, o tratamento com MEL nesses animais, após 13 semanas, reduziu a ingestão alimentar e o peso corporal devido a ação desse hormônio no hipotálamo, modulando a expressão de neuropeptídeos orexigênicos (*Agouti related peptide* - *AgRP* e *Orexin*). Nos estudos com modelos de obesidade (PRUNET-MARCASSUS *et al.*, 2003) e envelhecimento (MENDES *et al.*, 2013) observou-se que após 3 e 16 semanas, respectivamente, o tratamento com MEL promoveu redução da massa corporal e ingestão alimentar nesses animais. Entretanto, os resultados do presente estudo demonstraram que a MEL não promove alterações tanto na massa corporal como na ingestão alimentar entre os grupos. Zanuto *et al.* (2013) também demonstraram que em ratos idosos e obesos suplementados com MEL na água de beber, por 8 semanas, não houve alteração nestes parâmetros.

Pesquisas têm sido realizadas para melhorar a compreensão da relação entre doenças orais e alterações sistêmicas. Os estudos de Astolphi *et al.* (2013) e Pereira

*et al.* (2017) verificaram que ratos com PEA apresentam RI. Embora, no presente estudo, não tenha sido verificada diferença estatística na glicemia e na insulinemia no grupo PEAMEL comparado ao grupo PEA, observou-se que o grupo PEA apresentou um aumento na RI em relação ao grupo PEAMEL, demonstrando que a MEL foi capaz de reverter a RI em ratos com PEA. Resultados semelhantes, em relação a RI, foram encontrados em outro tipo de doença bucal, como a DP, pelos pesquisadores Dos Santos *et al.* (2018) em ratos com DP e/ou pinealectomizados tratados com MEL. De acordo com Prunet-Marcassus *et al.* (2003) a MEL não promoveu alteração na insulinemia e glicemia em ratos pinealectomizados alimentados com dieta hiperlipídica (DH). Salientamos que o grupo PEA também apresentou maior RI e insulinemia em relação aos grupos CN e CNMEL. Em relação a glicemia o grupo CNMEL apresentou um menor valor somente em relação aos grupos CN e PEA. Por outro lado, a insulinemia no CNMEL não diferiu do CN e PEAMEL.

A MEL tem sido descrita como potente agente antidiabético (AGIL *et al.*, 2012; SHE; LAUDON; YIN, 2014; ZEPHY; AHMAD, 2015). Estudos em animais (NAGORNY *et al.*, 2011; PICINATO *et al.*, 2008) e humanos (BOUATIA-NAJI *et al.*, 2009) observaram que a MEL afeta diretamente a produção e secreção de insulina. Nesse contexto, a literatura demonstra que a administração oral de MEL reduz a insulinemia e os valores do índice HOMA-IR em camundongos resistentes à insulina, alimentados com DH (SARTORI *et al.*, 2009) e em mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SHABANI *et al.*, 2019). Estes estudos demonstram que a MEL pode conferir um potencial agente terapêutico na prevenção da RI.

Estudos indicam uma associação entre DP e hiperlipidemia (ABRAHAM; ARYA PREMATH; KASSIM, 2019; CINTRA *et al.*, 2013; VIRTO *et al.*, 2018). NGUYEN *et al.* (2007) demonstraram que os ácidos graxos livres (AGL) podem ativar células pró-inflamatórias (CD11c+) por meio das vias de sinalização TLR2/4 e JNK, ocasionando assim inflamação e subsequente RI. Atualmente, o tratamento periodontal tem sido apontado como meio de obter um efeito benéfico sobre o metabolismo lipídico (BABAEI *et al.*, 2018; FU *et al.*, 2016). Além disso, a MEL também mostrou ser um adjuvante terapêutico no tratamento periodontal associado à obesidade, uma vez que foi capaz de diminuir as concentrações plasmáticas de TG, AGL e C-LDL e aumentar as concentrações de C-HDL (VIRTO *et al.*, 2018).

Nossos resultados mostraram que ratos com PEA apresentaram maior concentração de C-LDL em comparação ao grupo CN. Com relação à concentração

de C-VLDL, observou-se aumento neste parâmetro no grupo PEA quando comparado aos grupos CNMEL e PEAMEL. Além disso, houve maior concentração de TG no grupo PEA comparado aos demais grupos. O tratamento com MEL foi capaz de diminuir as concentrações de C-VLDL e TG. Ademais, não houve diferença no CT e C-HDL entre os grupos.

Kantar *et al.* (2015) demonstraram que 20 mg/kg de MEL administrada diariamente por 8 semanas não reduziu de forma significativa a concentração de TG, C-VLDL, C-HDL e CT em ratos com síndrome metabólica. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças estatísticas referentes ao C-HDL e C-LDL em pacientes com esteato-hepatite não-alcoólica (CICHOZ-LACH *et al.*, 2010) ou com síndrome metabólica (GOYAL *et al.*, 2014) tratados com MEL. Em contrapartida, no estudo de Agil *et al.* (2011) verificou-se que a suplementação de MEL, em ratos, foi capaz de reduzir TG e C-LDL e aumentar C-HDL, mas não teve efeito sobre o CT.

Em uma meta-análise, a MEL mostrou ter efeito benéfico sobre TG e CT, mas não em relação a C-HDL e C-LDL dos participantes (MOHAMMADI-SARTANG; GHORBANI; MAZLOOM, 2018). Neste estudo, observou-se diminuição na concentração de TG apenas em doses de MEL  $\geq 8$  mg/dia ou quando os tratamentos duraram 8 ou mais semanas (MOHAMMADI-SARTANG; GHORBANI; MAZLOOM, 2018). Além disso, as concentrações totais de colesterol também foram significativamente reduzidas apenas em doses de MEL  $\geq 8$  mg/dia e quando as concentrações basais foram iguais ou superiores a 200 mg/dL (MOHAMMADI-SARTANG; GHORBANI; MAZLOOM, 2018). Diante desse contexto, podemos sugerir que o fato de a MEL não promover alteração nas concentrações de CT, C-HDL e C-LDL em nosso modelo experimental, pode ser devido à dose inferior utilizada ou tempo de tratamento.

Outro efeito benéfico da MEL é sua atuação na cavidade oral (CUTANDO *et al.*, 2003), uma vez que, esse hormônio é capaz de melhorar as condições periodontais, tais como a profundidade da bolsa periodontal e o nível de inserção clínica em indivíduos insones (EL-SHARKAWY *et al.*, 2019) e diabéticos (BAZYAR *et al.*, 2019) com DP. Ademais, diminuiu as concentrações teciduais (gengiva) de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 em animais obesos com DP (VIRTO *et al.*, 2018). Do mesmo modo, a MEL reduziu as concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em um modelo experimental de ratos com DP (KARA *et al.*, 2013) e pulpite aguda (LI *et al.*, 2015).

Além disso, a MEL reduziu as concentrações gengivais de IL-1 $\beta$ , IL-6 e PGE2 de pacientes com diabetes e DP (MONTERO *et al.*, 2017).

O dano tecidual causado pela periodontite está associado a altas concentrações de citocinas inflamatórias (KARA *et al.*, 2013), tais como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (AKUTAGAWA *et al.*, 2019; DE MOLON *et al.*, 2018) e menor concentração da citocina anti-inflamatória, a IL-10 (BI *et al.*, 2019). No presente estudo, ratos com PEA apresentaram aumento das concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em relação a todos os grupos. Além disso, a concentração de IL-1 $\beta$  foi maior no grupo CN em relação ao grupo CNMEL. Em relação a concentração de IL-6, o grupo PEA apresentou maior valor comparado aos grupos CN e CNMEL. Ademais, o grupo PEA apresentou diminuição da concentração de IL-10 em relação aos grupos CNMEL e PEAMEL. A concentração dessa citocina também foi menor no grupo CN quando comparado ao grupo CNMEL. Nas comparações das citocinas mencionadas acima entre os grupos PEA e PEAMEL, o tratamento com MEL reverteu as alterações induzidas pela PEA, exceto na análise da IL-6 que não foram encontradas diferenças entre esses dois grupos.

Nossos resultados se assemelham aos estudos de Carrillo-Vico *et al.* (2005). Estes autores verificaram em um modelo experimental de choque séptico em camundongos, que a MEL aumentou a concentração plasmática de IL-10, tanto local como sistemicamente, diminuiu a de TNF- $\alpha$ , enquanto não foram observadas diferenças significantes de IL-6. Por outro lado, a administração de cápsulas orais contendo 6 mg de MEL por 8 semanas reduziu os níveis de IL-6 e proteína C reativa em pacientes diabéticos com DP, mas não alterou significativamente as concentrações séricas de TNF- $\alpha$  (BAZYAR *et al.*, 2019). Assim como não foram observadas diminuição da concentração de IL-1 $\beta$  em ratos diabéticos com DP tratados com 10 mg/kg de MEL administrada intraperitonealmente por 4 semanas (BALCI YUCE *et al.*, 2016). A dose, duração e via de administração do hormônio são possíveis fatores que levaram à diversidade dos resultados.

Conforme descrito anteriormente, citocinas inflamatórias estão associadas ao desenvolvimento da RI (BLASCO-BAQUE *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2016). Vários mecanismos potenciais podem explicar os efeitos deletérios do TNF- $\alpha$  sobre a sinalização insulínica: 1) supressão da atividade do receptor de insulina-tirosina quinase; 2) diminuição da fosforilação do IRS-1 em tirosina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1994; PERALDI; XU; SPIEGELMAN, 1997); 3) aumento da fosforilação do IRS-1 em

serina (AGUIRRE *et al.*, 2000); 4) redução da fosforilação da Akt em serina/treonina; 5) prejuízo na translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (NIETO-VAZQUEZ *et al.*, 2007); 6) ativação da via do NF- $\kappa$ B (HAYDEN; GHOSH, 2014; SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006).

Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que ratos com PEA apresentaram: 1) maior concentração plasmática de TNF- $\alpha$ ; 2) menor fosforilação de IRS1/IRS2 (coletivamente chamados de pp185) em TAB-P (ASTOLPHI *et al.*, 2013) e tecido muscular (ASTOLPHI *et al.*, 2015). De forma similar, observamos no presente estudo, elevadas concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias, RI e prejuízo na via de sinalização insulínica, evidenciado pela diminuição da fosforilação de pp185 e Akt em tecido muscular, em ratos com PEA.

Anhê *et al.* (2004) demonstraram pela primeira vez que o receptor de insulina pode ser coativado pela MEL. A MEL aumentou a ativação do receptor de insulina-tirosina quinase, seguida por fosforilação do IRS-1 em tirosina e Akt em serina no hipotálamo de ratos. Adicionalmente, foi determinada uma comunicação hipotálamo-fígado desencadeada pela fosforilação hipotalâmica de Akt induzida pela MEL, levando à supressão da gliconeogênese hepática, provavelmente por meio de receptores muscarínicos periféricos (FARIA *et al.*, 2013). Essa comunicação via central-periférica esclarece o papel que a MEL possui no controle do metabolismo da glicose.

Os efeitos benéficos da MEL sobre a sinalização insulínica em células musculares esqueléticas foram demonstrados *in vivo* (TEODORO *et al.*, 2014) e *in vitro* (QUAN *et al.*, 2015). O mecanismo intracelular pelo qual a MEL pode melhorar a RI nessas células foi identificado pela primeira vez por Teodoro *et al.* (2014). Estes autores 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. De modo similar, Quan *et al.* (2015) observaram que o pré-tratamento com MEL restaurou a via de sinalização da insulina reduzida por tunicamicina por meio do aumento da fosforilação de IRS-1 (em tirosina) e Akt (em serina) em células musculares esqueléticas cultivadas.

No presente estudo, avaliamos a via de sinalização insulínica nos tecidos MS e EDL. Observamos que os animais com PEA apresentaram prejuízo nessa via apenas no MS e o tratamento com MEL reverteu essa alteração. Similarmente, estudos verificaram que o tratamento com MEL restaurou a atividade das proteínas envolvidas na via de sinalização insulínica em hipocampo (ratos diabéticos) (KAMSRIJAI *et al.*, 2020), hipotálamo, fígado, músculo esquelético e TAB-P em ratos idosos e obesos (ZANUTO *et al.*, 2013). Ademais, a MEL mostrou ser eficiente na melhora da RI e da esteatose hepática em camundongos alimentados com DH (HEO *et al.*, 2018).

Por outro lado, Dos Santos *et al.* (2018) não observaram aumento na fosforilação de Akt em serina, após o estímulo insulínico, no músculo, fígado e TAB-P de ratos pinealectomizados com DP suplementados com MEL. Da mesma forma, não foram observados aumento na fosforilação de Akt no MS de animais alimentados com DH (SARTORI *et al.*, 2009) e em fígado de ratos idosos (MENDES *et al.*, 2013) após administração de MEL.

O músculo esquelético é responsável pela maior parte da utilização de glicose estimulada pela insulina (DEFRONZO *et al.*, 1985). Vale ressaltar que alguns músculos tornam-se mais sensíveis à insulina do que outros devido ao tipo de fibra muscular predominante e a quantidade de GLUT4 presente nelas. O músculo esquelético é composto por dois tipos principais de fibras: 1) as fibras do tipo I (também chamadas de contração lenta) apresentam baixa resposta contrátil, mas alta resistência à fadiga. Essas fibras são oxidativas, possuem um grande número de mitocôndrias e usam ácidos graxos para a produção de energia; 2) as fibras do tipo II (também chamadas de contração rápida) possuem uma resposta contrátil rápida, mas uma baixa resistência à fadiga. Essas fibras são glicolíticas, pois possuem menor número de mitocôndrias e usam a glicose para produção de energia (TORRE-VILLALVAZO *et al.*, 2019). As fibras de contração lenta são mais sensíveis à insulina e mais responsivas à insulina em comparação com as fibras de contração rápida (JAMES; JENKINS; KRAEGEN, 1985). Ademais, foi demonstrado que a quantidade de GLUT4 é maior nas fibras de contração lenta (GASTER *et al.*, 2000). O MS é considerado um músculo predominantemente oxidativo e mais sensível à insulina. Por outro lado, o EDL é considerado um músculo menos oxidativo (MESSA *et al.*, 2019). Esses dados podem explicar o motivo pelo qual houve prejuízo na via insulínica apenas no MS em nosso trabalho.

Conforme descrito anteriormente, a via de sinalização insulínica também pode ser prejudicada pela ativação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , pois elas podem ativar as vias inflamatórias, como JNK e a IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006). Nesse sentido, com o intuito de averiguar os mecanismos envolvidos na RI em ratos com PEA, foi realizada análise da via inflamatória e os resultados demonstraram que altas concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias, e consequente ativação da proteína IKK $\alpha$ / $\beta$  nos tecidos musculares nestes animais, podem causar essa alteração. Nossos resultados corroboram com o estudo de Pereira *et al.* (2017), que observou aumento no grau de fosforilação de IKK $\alpha$ / $\beta$  em tecido muscular de ratos com PEA.

Outro estudo do nosso laboratório, verificou que ratos adultos, proles de ratas com PEA apresentaram RI, aumento da concentração plasmática de TNF- $\alpha$ , alterações nas vias inflamatórias (aumento na fosforilação de IKK $\alpha$ / $\beta$ ) e na sinalização insulínica (diminuição na fosforilação em tirosina da pp185 e aumento na fosforilação em serina do IRS-1) em tecido muscular e TAB-P (TSOSURA *et al.*, 2019).

Sabe-se que a MEL tem ação anti-inflamatória e seus efeitos inibitórios sobre o NF- $\kappa$ B foram previamente encontrados em diversas células e tecidos. No tecido muscular de ratos, a MEL demonstrou ter efeitos protetores contra os danos causados pelo exercício agudo, pois: preveniu o estresse oxidativo; inibiu a cascata de IKK/NF- $\kappa$ B; bloqueou a produção muscular esquelética de mediadores nocivos envolvidos no processo inflamatório (ALONSO; COLLADO; GONZÁLEZ-GALLEGO, 2006). No estudo de Chuffa *et al.* (2015), a MEL foi capaz de regular negativamente IKK- $\alpha$ , I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B, IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 em um modelo de ratas com câncer de ovário. Os efeitos anti-inflamatórios da MEL também foram encontrados em outras células e tecidos, tais como fígado (LIANG *et al.*, 2009) e mastócitos (MALDONADO *et al.*, 2016). Ademais, Ali *et al.* (2018) demonstraram in vivo e in vitro que a MEL, por meio do mecanismo antioxidante dependente do fator nuclear relacionado ao eritroide 2 (Nrf2), diminuiu as espécies reativas de oxigênio e a neuroinflamação, bloqueando a ativação da via MAPK p-P38/p-JNK, reduzindo a expressão de p-NF- $\kappa$ B/p-IKK $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e COX-2 e prevenindo a neurodegeneração em ratos. No presente estudo, a MEL foi efetiva em diminuir a ativação de IKK $\alpha$ / $\beta$  nos tecidos musculares de ratos com PEA.

Tang *et al.* (2001) mostraram que o IKK modula negativamente a atividade de JNK, provavelmente, por meio da indução de genes alvo de NF- $\kappa$ B que codificam proteínas, como o inibidor da apoptose ligado ao cromossomo X (XIAP), que interfere

na ativação da JNK mediada pelo TNF- $\alpha$ . Esses achados revelam que as vias de sinalização NF- $\kappa$ B e JNK estão funcionalmente interconectadas (SCHWABE; BRENNER, 2006). Estes dados podem ser a razão pela qual não foi encontrada nenhuma diferença no grau de fosforilação da JNK, pois a via de sinalização da IKK pode ter sobrepujado a via de sinalização da JNK.

Nossos resultados demonstraram que não houve diferença estatística significativa no grau de fosforilação da proteína JNK em tecido muscular entre os grupos. De forma semelhante, não foram observadas diferenças nesse parâmetro em tecido muscular em ratos adultos, proles de ratas com PEA (TSOSURA *et al.*, 2019) ou DP (MATTERA *et al.*, 2019).

O presente trabalho é o primeiro a estudar os efeitos sistêmicos da administração da MEL sobre a sensibilidade à insulina; vias de sinalização insulínica e inflamatória; concentração plasmática de citocinas inflamatórias e perfil lipídico em ratos com PEA. Observamos que a PEA promove RI, dislipidemia, aumento das concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) e da via inflamatória (aumento do grau de fosforilação de IKK $\alpha$ / $\beta$  em tecido muscular), diminuição na concentração plasmática da citocina anti-inflamatória IL-10 e no sinal insulínico em MS. O tratamento com MEL mostrou ser eficiente em melhorar a RI, dislipidemia, concentrações plasmáticas das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10, além das alterações nas vias de sinalização insulínica e inflamatória promovidas pela PEA. Como o trabalho foi realizado em ratos, sugerimos que o mesmo seja feito em humanos, no intuito de averiguar a importância da administração de MEL em pacientes com PEA.

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados do presente estudo demonstram que a MEL é um potente tratamento adjuvante para melhorar a RI, dislipidemia, alterações nas vias de sinalização insulínica e inflamatória promovidas pela PEA. Além disso, demonstram o impacto que a PEA (processo inflamatório localizado) tem sobre a saúde bucal e sistêmica de ratos adultos.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS; LICHTMAN. **Imunologia Básica**. 3ª Edição. Elsevier Brasil, 2009. 328 p.
- ABRAHAM, S.; ARYA PREMNATH, P. R.; KASSIM, R. M. Critical appraisal of bidirectional relationship between periodontitis and hyperlipidemia. **J Int Soc Prev Community Dent**, v. 9, n. 2, p. 112, 2019.
- AGIL, A. *et al.* Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. **J Pineal Res**, v. 50, n. 2, p. 207-212, 2011.
- AGIL, Ahmad *et al.* Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. **J Pineal Res**, v. 52, n. 2, p. 203-210, 2012.
- AGUIRRE, V. *et al.* The c-Jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. **J. Biol. Chem**, v. 275, n. 12, p. 9047-9054, 2000.
- AGWUNOBI, A. O. *et al.* Insulin resistance and substrate utilization in human endotoxemia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 10, p. 3770-3778, 2000.
- AKUTAGAWA, K. *et al.* Glycyrrhizic acid suppresses inflammation and reduces the increased glucose levels induced by the combination of *Porphyromonas gulae* and ligature placement in diabetic model mice. **Int Immunopharmacol**, v. 68, p. 30-38, 2019.
- ALÂ, H. M. H *et al.* The Effects of Melatonin On The Oxidative Stress, Protein Glycation, Microalbuminuria and Lipid Profile In Type II Diabetes Mellitus. **Iraq J Pharm Sci (P-ISSN: 1683-3597, E-ISSN: 2521-3512)**, v. 15, n. 1, p. 27-32, 2006.
- ALI, T. *et al.* Acute dose of melatonin via Nrf2 dependently prevents acute ethanol-induced neurotoxicity in the developing rodent brain. **J Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 119, 2018.
- ALONSO, M.; COLLADO, P. S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. **J Pineal Res**, v. 41, n. 1, p. 8-14, 2006.
- ALONSO-VALE, M. I. C. *et al.* Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. **J Pineal Res**, v. 45, n. 4, p. 422-429, 2008.
- ANHÊ, G. F. *et al.* In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. **J Neurochem**, v. 90, n. 3, p. 559-566, 2004.

AOKI, K. *et al.* Exogenous melatonin administration modifies cutaneous vasoconstrictor response to whole body skin cooling in humans. **J Pineal Res**, v. 44, n. 2, p. 141-148, 2008.

ARENDT, J. *et al.* Immunoassay of 6-hydroxymelatonin sulfate in human plasma and urine: abolition of the urinary 24-hour rhythm with atenolol. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 60, n. 6, p. 1166-1173, 1985.

ASTOLPHI, R. D. *et al.* Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. **J Endod**, v. 39, n. 5, p. 648-652, 2013.

ASTOLPHI, R. D. *et al.* Periapical Lesions Decrease Insulin Signaling in Rat Skeletal Muscle. **J Endod**, v. 41, n. 8, p. 1305-1310, 2015.

BABAEI, H. *et al.* Effects of chicory leaf extract on serum oxidative stress markers, lipid profile and periodontal status in patients with chronic periodontitis. **J Am Coll Nutr**, v. 37, n. 6, p. 479-486, 2018.

BALCI YUCE, H. *et al.* The effect of melatonin on bone loss, diabetic control, and apoptosis in rats with diabetes with ligature-induced periodontitis. **J Periodontol**, v. 87, n. 4, p. e35-e43, 2016.

BALDWIN JR, A. S. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. **Annu Rev Immunol**, v. 14, n. 1, p. 649-681, 1996.

BALTATU, O. *et al.* Locally synthesized angiotensin modulates pineal melatonin generation. **J Neurochem**, v. 80, n. 2, p. 328-334, 2002.

BAZYAR, H. *et al.* The effects of melatonin supplementation in adjunct with non-surgical periodontal therapy on periodontal status, serum melatonin and inflammatory markers in type 2 diabetes mellitus patients with chronic periodontitis: a double-blind, placebo-controlled trial. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 1, p. 67-76, 2019.

BENÍTEZ-KING, G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. **J Pineal Res**, v. 40, n. 1, p. 1-9, 2006.

BERGENHOLTZ, G.; NAGAOKA, S.; JONTELL, M. Class II antigen presenting cells in experimentally induced pulpitis. **Int Endod J**, v. 24, n. 1, p. 8-14, 1991.

BI, C. S. *et al.* The relationship between T-helper cell polarization and the RANKL/OPG ratio in gingival tissues from chronic periodontitis patients. **Clin Exp Dent Res**, v. 5, n. 4, p. 377-388, 2019.

BLASCO-BAQUE, V. *et al.* Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. **Gut**, v. 66, n. 5, p. 872-885, 2017.

BONDY, S. C.; CAMPBELL, A. Mechanisms Underlying Tumor Suppressive Properties of Melatonin. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 8, 2018.

BONORA, E. *et al.* 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.

BOUATIA-NAJI, N. *et al.* A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. **Nat Genet**, v. 41, n. 1, p. 89, 2009.

BRAINARD, G. C. *et al.* The influence of different light spectra on the suppression of pineal melatonin content in the Syrian hamster. **Brain Res**, v. 294, n. 2, p. 333-339, 1984.

BUBENIK, G. A. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. **Dig Dis Sci**, v. 47, n. 10, p. 2336-2348, 2002.

BUONFIGLIO, D. *et al.* Melatonin absence leads to long-term leptin resistance and overweight in rats. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 9, p. 122, 2018.

CAPLAN, D. J. *et al.* Lesions of endodontic origin and risk of coronary heart disease. **J Dent Res**, v. 85, n. 11, p. 996-1000, 2006.

CARDINALI, D. P.; FREIRE, F. Melatonin effects on brain. Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystalloid and tubular formations in the hypothalamus. **Mol Cell Endocrinol**, v. 2, n. 5, p. 317-330, 1975.

CARDINALI, D. P.; LYNCH, H. J.; WURTMAN, R. J. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. **Endocrinology**, v. 91, n. 5, p. 1213-1218, 1972.

CAROCCI, A.; CATALANO, A.; SINICROPI, M. S. Melatonergic drugs in development. **Clin Pharmacol**, v. 6, p. 127, 2014.

CARRILLO-VICO, A. *et al.* Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. **J Pineal Res**, v. 39, n. 4, p. 400-408, 2005.

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

CECON, E.; MARKUS, R. P. Relevance of the chronobiological and non-chronobiological actions of melatonin for enhancing therapeutic efficacy in neurodegenerative disorders. **Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov**, v. 5, n. 2, p. 91-99, 2011.

CHUFFA, L. G. A. *et al.* Melatonin attenuates the TLR4-mediated inflammatory response through MyD88-and TRIF-dependent signaling pathways in an in vivo model of ovarian cancer. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 34, 2015.

CICHOZ-LACH, H. *et al.* The effects of L-tryptophan and melatonin on selected biochemical parameters in patients with steatohepatitis. **J Physiol Pharmacol**, v. 61, n. 5, p. 577, 2010.

CINTRA, L. T. A. *et al.* Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. **Clin Oral Investig**, v. 17 n. 6, p. 1595-1599, 2013.

CIPOLLA-NETO, J. *et al.* Melatonin, energy metabolism and obesity: a review. **J Pineal Res**, v. 56, n. 4, p. 371-381, 2014.

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

CONTI, A. *et al.* Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. **J Pineal Res**, v. 28, n. 4, p. 193-202, 2000.

CUTANDO, A. *et al.* A. Effect of topical application of melatonin on serum levels of Creactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) in patients with type 1 or type 2 diabetes and periodontal disease. **J Clin Exp Dent**, v. 7, n. 5, e628-33, 2015.

CUTANDO, Antonio *et al.* Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. **J Pineal Res**, v. 35, n. 4, p. 239-244, 2003.

CYMERMAN, J. J., *et al.* Human T lymphocyte subpopulations in chronic periapical lesions. **J Endod**, n. 10, v. 1, p. 9-11, 1984.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. *et al.* TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. **J Pineal Res**, v. 49, n. 2, p. 183-192, 2010.

DACEY, D. M. *et al.* Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. **Nature**, v. 433, n. 7027, p. 749-754, 2005.

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

DE MOLON, R. S. *et al.* Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. **Microsc Res Tech**, v. 81, n. 12, p. 1412-1421, 2018.

DE OLIVEIRA, A. C. *et al.* 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.

DEFRONZO, R. A. *et al.* Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. **J Clin Invest**, v. 76, n. 1, p. 149-155, 1985.

DESVARIEUX, M. *et al.* Gender differences in the relationship between periodontal disease, tooth loss, and atherosclerosis. **Stroke**, v. 35, n. 9, p. 2029-2035, 2004.

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, 2012.

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

DOS SANTOS, R. M. *et al.* Melatonin promotes reduction in TNF levels and improves the lipid profile and insulin sensitivity in pinealectomized rats with periodontal disease. **Life Sci**, v. 213, p. 32-39, 2018.

DUBOCOVICH, M. L. *et al.* Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. **Front Biosci**, v. 8, n. 10, p. 1093-1108, 2003.

DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptors: are there multiple subtypes?. **Trends Pharmacol Sci**, v. 16, n. 2, p. 50-56, 1995.

DUBOCOVICH, M. L.; BENLOUCIF, S.; MASANA, M. I. Melatonin receptors in the mammalian suprachiasmatic nucleus. Behavioural **Brain Res**, v. 73, n. 1-2, p. 141-147, 1995.

DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 101-110, 2005.

DUNCAN, B. B. *et al.* Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. **Diabetes**, v. 52, n. 7, p. 1799-1805, 2003.

EL-SHARKAWY, H. *et al.* Is dietary melatonin supplementation a viable adjunctive therapy for chronic periodontitis?—A randomized controlled clinical trial. **J Periodontal Res**, v. 54, n. 2, p. 190-197, 2019.

ERGÜN, Y. *et al.* Co-administration of a nitric oxide synthase inhibitor and melatonin exerts an additive antidepressant-like effect in the mouse forced swim test. **Med Sci Monit**, v. 12, n. 9, p. 307-312, 2006.

ERREN, T. C.; REITER, R. J. Melatonin: a universal time messenger. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 36, n. 3, p. 187-192, 2015.

FARIA, J. A. *et al.* Melatonin acts through MT1/MT2 receptors to activate hypothalamic Akt and suppress hepatic gluconeogenesis in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 305, n. 2, p. E230-E242, 2013.

FERNANDES, P. A. *et al.* 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, 2006.

FOLKARD, S. Do permanent night workers show circadian adjustment?. A review based on the endogenous melatonin rhythm. **Chronobiol Int**, v. 25, n. 2, p. 215-224, 2008.

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

FU, Y. W. *et al.* Effects of periodontal therapy on serum lipid profile and proinflammatory cytokines in patients with hyperlipidemia: a randomized controlled trial. **Clin Oral Investig**, v. 20, n. 6, p. 1263-1269, 2016.

GARCIA, R. A. P. *et al.* Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. **Life Sci**, v. 82, n. 1, p. 108-114, 2008.

GARFIN, D. E. One-dimensional gel electrophoresis. **Methods Enzymol**, Academic Press, v. 182, p. 425-441, 1990.

GASTER, M. *et al.* Direct evidence of fiber type-dependent GLUT-4 expression in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 278, n. 5, p. E910-E916, 2000.

GEERTS, S. O. *et al.* Systemic release of endotoxins induced by gentle mastication: association with periodontitis severity. **J Periodontol**, v. 73, n. 1, p. 73-78, 2002.

GENOVESE, T. *et al.* Melatonin limits lung injury in bleomycin treated mice. **J Pineal Res**, v. 39, n. 2, p. 105-112, 2005.

GOYAL, A. *et al.* Melatonin supplementation to treat the metabolic syndrome: a randomized controlled trial. **Diabetol Metab Syndr**, v. 6, n. 1, p. 124, 2014.

HAHN, C. L.; FALKLER, W. A.; SIEGEL, M. A. A study of T and B cells in pulpal pathosis. **J Endod**, v. 15, n. 1, p. 20-26, 1989.

HARDELAND, R. *et al.* Melatonin — A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Prog Neurobiol**, v. 93, n. 3, p. 350-384, 2011.

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.

HAYDEN, M. S.; GHOSH S. Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF Family Cytokines. **Semin Immunol**, v. 26, n. 3, p. 253-266, 2014.

HEO, J. I. *et al.* Melatonin improves insulin resistance and hepatic steatosis through attenuation of alpha-2-HS-glycoprotein. **J Pineal Res**, v. 65, n. 2, p. e12493, 2018.

HOTAMISLIGIL, G. S. *et al.* Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, n. 11, p. 4854-4858, 1994.

HUANG, Y. *et al.* Periodontitis contributes to adipose tissue inflammation through the NF- $\kappa$ B, JNK and ERK pathways to promote insulin resistance in a rat model. **Microbes Infect**, v. 18, n. 12, p. 804-812, 2016.

HUSSAIN, S. A. R. Effect of melatonin on cholesterol absorption in rats. **J Pineal Res**, v. 42, n. 3, p. 267-71, 2007.

IKEGAMI, K. *et al.* Interconnection between circadian clocks and thyroid function. **Nat Rev Endocrinol**, v. 15, n. 10, p. 590-600, 2019.

JAMES, D. E.; JENKINS, A. B.; KRAEGEN, E. W. Heterogeneity of insulin action in individual muscles in vivo: euglycemic clamp studies in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 248, n. 5, p. E567-E574, 1985.

JIN, X. *et al.* Targeted disruption of the mouse Mel1b melatonin receptor. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 3, p. 1054-1060, 2003.

JONTELL, M. *et al.* Immune defense mechanisms of the dental pulp. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 9, n. 2, p. 179-200, 1998.

KADHIM, H. M.; ALJAWAD, F. H.; HASHIM, H. M. Effects of Atorvastatin and Melatonin on Glycemic Control and Lipid Profile in Type 2 Diabetic Patients. **Iraqi J Med Sci**, v. 12, n. 1, p. 72-77, 2014.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 20, n. 3, p. 340-349, 1965.

KAMSRIJAI, U. *et al.* Melatonin attenuates streptozotocin-induced Alzheimer-like features in hyperglycemic rats. **Neurochem Int**, v. 132, p. 104601, 2020.

KANTAR, Ş. *et al.* Beneficial effects of melatonin on serum nitric oxide, homocysteine, and ADMA levels in fructose-fed rats. **Pharm Biol**, v. 53, n. 7, p. 1035-1041, 2015.

KAPPERS, J. A. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. **Z Zellforsch Mikrosk Anat**, v. 52, n. 2, p. 163-215, 1960.

KARA, A. *et al.* Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. **Free Radic Biol Med**, v. 55, p. 21-26, 2013.

KARAMITRI, A. *et al.* Minireview: Toward the establishment of a link between melatonin and glucose homeostasis: association of melatonin MT2 receptor variants with type 2 diabetes. **Mol Endocrinol**, v. 27, n. 8, p. 1217-1233, 2013.

KAWASHIMA, N. *et al.* Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. **J Endod**, v. 22, n. 6, p. 311-316, 1996.

KIM, M. H. *et al.* Glutamate transporter-mediated glutamate secretion in the mammalian pineal gland. **J Neurosci**, v. 28, n. 43, p. 10852-10863, 2008.

KOPP, W.; SCHWARTING, R. Differentiation of T lymphocyte subpopulations, macrophages, and HLA-DR-restricted cells of apical granulation tissue. **J Endod**, v. 15, n. 2, p. 72-75, 1989.

KORKMAZ, A. *et al.* Glucose: a vital toxin and potential utility of melatonin in protecting against the diabetic state. **Mol Cell Endocrinol**, v. 349, n. 2, p. 128-137, 2012.

KRASITY, B. C. *et al.* Structural and functional features of a developmentally regulated lipopolysaccharide-binding protein. **mBio**, n. 6, v. 5, e01193-15, 2015.

KRUGER, N. J.; HAMMOND, J. B. W. Immunodetection of proteins on "Western" blots using <sup>125</sup>I-labeled protein A. In: WALKER, J. M. **Methods Mol Biol: New Protein Techniques**. Humana Press, p. 409-417, 1988.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LERNER, A. B. *et al.* Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. **J Am Chem Soc**, v. 80, n. 10, p. 2587, 1958.

LEWY, A. J. Clinical applications of melatonin in circadian disorders. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 5, n. 4, p. 399, 2003.

LI, J. G. *et al.* Melatonin attenuates inflammation of acute pulpitis subjected to dental pulp injury. **Am J Transl Res**, v. 7, n. 1, p. 66, 2015.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 10, p. 725, 2002.

LIANG, R. *et al.* Melatonin protects from hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and modification of cell proliferation. **J Pineal Res**, v. 46, n. 1, p. 8-14, 2009.

LICASTRO, F. *et al.* Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. **Immun Ageing**, v. 2, n. 1, p. 8, 2005.

LIMA, F. B. *et al.* Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 275, n. 6, E934-E941, 1998.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LYSENG-WILLIAMSON, K. A. Melatonin prolonged release. **Drugs Aging**, v. 29, n. 11, p. 911-923, 2012.

MAESTRONI, G. JM. The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. **J Photochem Photobiol B**, v. 43, n. 3, p. 186-192, 1998.

MAESTRONI, G. JM. T-Helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. **J Pineal Res**, v. 18, n. 2, p. 84-89, 1995.

MALDONADO, M. D. *et al.* Possible involvement of the inhibition of NF- $\kappa$ B factor in anti-inflammatory actions that melatonin exerts on mast cells. **J Cell Biochem**, v. 117, n. 8, p. 1926-1933, 2016.

MANTOVANI, M. *et al.* Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. **J Pineal Res**, v. 41, n. 4, p. 382-389, 2006.

MARANI, F. **Efeitos da suplementação com melatonina na remodelação óssea alveolar em ratos pinealectomizados com doença periodontal**. 2018. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

MARIE HANSEN, A.; HELENE GARDE, A.; HANSEN, J. Diurnal urinary 6-sulfatoxymelatonin levels among healthy Danish nurses during work and leisure time. **Chronobiol Int**, v. 23, n. 6, p. 1203-1215, 2006.

MARKUS, R. P. *et al.* The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 3-4, p. 126-133, 2007.

MATTERA, M. S. D. L. C. *et al.* Effect of maternal periodontitis on GLUT4 and inflammatory pathway in adult offspring. **J Periodontol**, v. 90, n. 8, p. 884-893, 2019.

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

MENDES, C. *et al.* Adaptations of the aging animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin. **J Pineal Res**, v. 55, n. 3, p. 229-239, 2013.

MESSA, G. A. M. *et al.* Morphological alterations of mouse skeletal muscles during early ageing are muscle specific. **Exp Gerontol**, v. 125, p. 110684, 2019.

METZGER, Z. Macrophages in periapical lesions. **Dent Traumatol**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2000.

MIGLIORI, M. L. *et al.* Daily variation in melatonin synthesis and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **J Pineal Res**, v. 53, n. 1, p. 38-46, 2012.

MILLER, J. W., SELHUB, J.; JOSEPH, J. A. Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: Protective effects of O-methylation and melatonin. **Free Radic Biol Med**, v. 21, n. 2, 241-249, 1996.

MIZRAK, B. *et al.* Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on rat hearts. **Acta Histochem**, v. 106, n. 1, p. 29-36, 2004.

MOHAMMADI-SARTANG, M.; GHORBANI, M.; MAZLOOM, Z. Effects of melatonin supplementation on blood lipid concentrations: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Clin Nutr**, v. 37, n. 6, p. 1943-1954, 2018.

MONTERO, J. *et al.* Changes in crevicular cytokines after application of melatonin in patients with periodontal disease. **J Clin Exp Dent**, v. 9, n. 9, p. e1081, 2017.

MOORE, R. Y.; LENN, N. J. A retinohypothalamic projection in the rat. **J Comp Neurol**, v. 146, n. 1, p. 1-14, 1972.

MURPHY, P. J.; MYERS, B. L.; BADIA, P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs alter body temperature and suppress melatonin in humans. **Physiol Behav**, v. 59, n. 1, p. 133-139, 1996.

NAGORNY, C. L. F. *et al.* Distribution of melatonin receptors in murine pancreatic islets. **J Pineal Res**, v. 50, n. 4, p. 412-417, 2011.

NAPETSCHNIG, J.; WU, H. Molecular basis of NF- $\kappa$ B signaling. **Annu Rev Biophys**, v. 42, p. 443-468, 2013.

NELSON, R. J.; DRAZEN, D. L. Melatonin mediates seasonal changes in immune function. **Ann NY Acad Sci**, v. 917, n. 1, p. 404-415, 2000.

NGUYEN, MT Audrey *et al.* A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. **Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 48, p. 35279-35292, 2007.

NIETO-VAZQUEZ, I. *et al.* Protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient myocytes show increased insulin sensitivity and protection against tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 2, p. 404-413, 2007.

NOWAK, R. *et al.* The correlation between sérum and salivary melatonin concentrations and urinary 6-hydroxymelatonin sulphate excretion rates: two non-invasive techniques for monitoring human circadian rhythmicity. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 27, n. 4, p. 445-452, 1987.

OHNISHI, T.; MUROI, M.; TANAMOTO, K. The lipopolysaccharide-recognition mechanism in cells expressing TLR4 and CD14 but lacking MD-2. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 1, p. 84-91, 2007.

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

PALIN, L. P. *et al.* Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats. **J Appl Oral Sci**, v. 26, 2018.

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

PANDA, S. *et al.* Illumination of the melanopsin signaling pathway. **Science**, v. 307, n. 5709, p. 600-604, 2005.

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

PANDI-PERUMAL, S. R. *et al.* The roles of melatonin and light in the pathophysiology and treatment of circadian rhythm sleep disorders. **Nat Rev Neurol**, v. 4, n. 8, p. 436, 2008.

PANG, S. F. *et al.* Fluctuation of blood melatonin concentrations with age: result of changes in pineal melatonin secretion, body growth, and aging. **J Pineal Res**, v. 8, n. 2, p. 179-192, 1990.

PELICIARI-GARCIA, R. A. *et al.* Leptin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. **Biomed Res Int**, v. 2013, 2013.

PERALDI, P.; XU, M.; SPIEGELMAN, B. M. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inhibition of insulin signaling. **J Clin Invest**, v. 100, n. 7, p. 1863-1869, 1997.

PEREIRA, R. F. *et al.* Periapical Lesions Increase Macrophage Infiltration and Inflammatory Signaling in Muscle Tissue of Rats. **J Endod**, v. 43, n. 6, p. 982-988, 2017.

PICINATO, M. C. *et al.* Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. **J Pineal Res**, v. 44, n. 1, p. 88-94, 2008.

POIREL, V. J. *et al.* MT1 melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 24, n. 1/2, p. 33-38, 2003.

POON, A. M. S. *et al.* Evidence for a direct action of melatonin on the immune system. **Neurosignals**, v. 3, n. 2, p. 107-117, 1994.

PRADHAN, S.; GOEL, K. Interrelationship between diabetes and periodontitis: a review. **JNMA J Nepal Med Assoc**, v. 51, n. 183, p. 144-153, 2011.

PRUNET-MARCASSUS, B. *et al.* Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5347-5352, 2003.

QUAN, X. *et al.* Melatonin inhibits tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in skeletal muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 463, n. 4, p. 1102-1107, 2015.

RASMUSSEN, D. D. *et al.* Suppression of hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) gene expression by daily melatonin supplementation in aging rats. **J Pineal Res**, v. 34, n. 2, p. 127-133, 2003.

REITER, R. J. *et al.* Age-associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats. **Endocrinology**, v. 109, n. 4, p. 1295-1297, 1981.

REITER, R. J. Neuroendocrine effects of light. **Int J Biometeorol**, v. 35, n. 3, p. 169-175, 1991.

REPPERT, S. M. *et al.* Putative melatonin receptors are located in a human biological clock. **Science**, v. 242, n. 4875, p. 78-81, 1988.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; EBISAWA, T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. **Neuron**, v. 13, n. 5, p. 1177-1185, 1994.

RIOS, E. R. V. *et al.* Melatonin: pharmacological aspects and clinical trends. **International J Neurosci**, v. 120, n. 9, p. 583-590, 2010.

SANCHEZ-HIDALGO, M. *et al.* Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. **Exp Gerontol**, v. 44, n. 5, p. 328-334, 2009.

SARITEKIN, E. *et al.* Anti-inflammatory and antiresorptive functions of melatonin on experimentally induced periapical lesions. **Int Endod J**, v. 52, n. 10, p. 1466-1478, 2019.

SARTORI, C. *et al.* Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 12, p. 5311-5317, 2009.

SCHWABE, R. F.; BRENNER, D. A. Mechanisms of liver injury. I. TNF- $\alpha$ -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 290, n. 4, p. G583-G589, 2006.

SENER, G. *et al.* Melatonin reduces cholesterol accumulation and prooxidant state induced by high cholesterol diet in the plasma, the liver and probably in the aorta of C57BL/6J mice. **J Pineal Res**, v. 36, n. 3, p. 212-216, 2004.

SEYMOUR, G. J. *et al.* Relationship between periodontal infections and systemic disease. **Clin Microbiol Infect**, v. 13, p. 3-10, 2007.

SHABANI, A. *et al.* Effects of melatonin administration on mental health parameters, metabolic and genetic profiles in women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J Affect Disord**, v. 250, p. 51-56, 2019.

SHE, M.; LAUDON, M.; YIN, W. Melatonin receptors in diabetes: a potential new therapeutical target?. **Eur J Pharmacol**, v. 744, p. 220-223, 2014.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1793-1801, 2006.

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. **Pharmacol Rev**, v. 55, n. 2, p. 325-395, 2003.

SKINNER, D. C.; MALPAUX, B. High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus. **Endocrinology**, v. 140, n. 10, p. 4399-4405, 1999.

SLOMINSKI, A. *et al.* On the role of melatonin in skin physiology and pathology. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 137-147, 2005.

SRINIVASAN, V. *et al.* Role of melatonin in neurodegenerative diseases. **Neurotox Res**, v. 7, n. 4, p. 293-318, 2005.

STASHENKO, P. *et al.* Pathogenesis of induced rat periapical lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 78, n. 4, p. 494-502, 1994.

STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 9, n. 4, p. 498-521, 1998.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **J Endod**, v. 18, n. 9, p. 427-430, 1992.

TAKEUCHI, O. *et al.* Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. **J Immunol**, v. 169, n. 1, p. 10-14, 2002.

TAMARKIN, L. *et al.* Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. **Endocrinology**, v. 99, n. 6, p. 1534-1541, 1976.

TANG, G. *et al.* Inhibition of JNK activation through NF- $\kappa$  B target genes. **Nature**, v. 414, n. 6861, p. 313-317, 2001.

TEODORO, B. G. *et al.* Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. **J Pineal Res**, v. 57, n. 2, p. 155-167, 2014.

TORRE-VILLALVAZO, I. *et al.* Protein intake and amino acid supplementation regulates exercise recovery and performance through the modulation of mTOR, AMPK, FGF21 and immunity. **Nutr res**, 2019.

TOSINI G; MENAKER, M. The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. **Brain Res**, v. 789, n. 2, p. 221-228, 1998.

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

VIRTO, L. *et al.* Melatonin as adjunctive therapy in the treatment of periodontitis associated with obesity. **J Clin Periodontol**, v. 45, n. 11, p. 1336-1346, 2018.

WALTON, R. E.; LANGE LAND, K. Migration of materials in the dental pulp of monkeys. **J Endod**, v. 4, n. 6, p. 167-177, 1978.

WARFVINGE, J.; DAHLEN, G.; BERGENHOLTZ, G. Dental pulp response to bacterial cell wall material. **J Dent Res**, v. 64, n. 8, p. 1046-1050, 1985.

WEI, Y. *et al.* Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 294, n. 3, p. R673-R680, 2008.

WIESENBERG, I. *et al.* Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR $\alpha$  by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. **Nucleic Acids Res.** v. 23, n. 3, p. 327-333, 1995.

YAHYAVI-FIROUZ-ABADI, N. *et al.* Involvement of nitric oxide pathway in the acute anticonvulsant effect of melatonin in mice. **Epilepsy Res**, v. 68, n. 2, p. 103-113, 2006.

ZANUTO, R. *et al.* Melatonin improves insulin sensitivity independently of weight loss in old obese rats. **J Pineal Res**, v. 55, n. 2, p. 156-165, 2013.

ZEPHY, D.; AHMAD, J. Type 2 diabetes mellitus: role of melatonin and oxidative stress. **Diabetes Metab Syndr**, v. 9, n. 2, p. 127-131, 2015.

**ANEXO A**

**Parecer de Aprovação da Comissão de Ética na Experimentação  
Animal da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba –  
UNESP**



**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 melatonina na via insulínica e inflamatória de ratos com periodontite apical"**, Processo FOA nº 00815-2018, 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 15 de Fevereiro de 2019.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 15 de Fevereiro de 2021.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 15 de Março de 2021.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effects of melatonin in the insulin signaling and inflammatory pathway of apical periodontitis rats"**, Protocol FOA nº 00815-2018, 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 February 15, 2019.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** February 15, 2021.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** March 15, 2021.

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

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

**ANEXO B**

**Artigo submetido à revista International Endodontic Journal**

Article type: Original Scientific Article

**Effects of melatonin on the insulin signaling and inflammatory pathways of rats with apical periodontitis**

BS Tavares<sup>1</sup>, TVS Tsosura<sup>1</sup>, MSLC Mattera<sup>1</sup>, JO Santelli<sup>1</sup>, RM dos Santos<sup>1</sup>, BE Belardi<sup>1</sup>, FY Chiba<sup>2</sup>, C Cantiga-Silva<sup>3</sup>, LTA Cintra<sup>3</sup>, DH Matsushita<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Multicenter Graduate Program in Physiological Sciences, SBFis, Department of Basic Sciences;

<sup>2</sup>Department of Children and Social Dentistry; and <sup>3</sup>Department of Preventive and Restorative Dentistry, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Brazil

**Running title:** Melatonin and oral inflammation.

**Keywords:** Inflammation, Melatonin, Insulin resistance, Apical periodontitis.

**Corresponding Author**

Doris Hissako Matsushita

São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, São Paulo, Brazil – R. José Bonifácio, 1193, ZIP CODE: 16015-050, Araçatuba-SP, Brazil.

Tel: (+55) 18 3636 2819

Fax: (+55) 18 3636 3233

E-mail: doris.hissako@unesp.br

## Abstract

**Aim:** To verify the effects of melatonin (MEL) supplementation on insulin sensitivity (ISe), plasma concentrations of inflammatory cytokines, insulin signaling (IS) and inflammatory pathways in the soleus (SM) and extensor digitorum longus (EDL) muscles of rats with apical periodontitis (AP).

**Methodology:** Seventy-two Wistar rats were distributed in 4 groups: a) control (C), b) control supplemented with MEL (M), c) AP (AP), and d) AP supplemented with MEL (AP + M). AP were induced by dental pulp exposure of the first and second right molars (upper and lower) to the oral environment. After AP induction, oral supplementation with 5 mg/kg MEL (diluted in drinking water) for 60 days was initiated. At the end of the treatment, the following were analyzed: 1) plasma concentrations of insulin and inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and IL-10) using ELISA kits; 2) glycemia using enzymatic assay; 3) insulin resistance (IR) using homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index; 4) phosphorylation status of pp185 tyrosine, Akt serine, IKK $\alpha/\beta$ , and JNK in SM and EDL using western blot. Analysis of variance of two or three factors was performed, followed by the Bonferroni test. P values < 0.05 were considered statistically significant.

**Results:** AP promoted IR, increased plasma concentrations of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ ), decreased the concentration of anti-inflammatory cytokine IL-10, impaired IS in SM, and increased IKK $\alpha/\beta$  phosphorylation status in SM and EDL. MEL supplementation in rats with AP improved ISe, decreased TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , increased IL-10 plasma concentrations, and changed the IS in SM and IKK $\alpha/\beta$  phosphorylation status in SM and EDL.

**Conclusions:** MEL is a potent adjuvant treatment for improving AP-associated changes in ISe, insulin signaling and inflammatory pathways. In addition, the impact of AP on general health was also demonstrated.

## Introduction

Oral inflammation has been associated with systemic alterations, such as osteoporosis (Dodd & Rowe 2013), cardiovascular disease (Caplan *et al.* 2006), respiratory disease (Paju & Scannapieco 2007), dyslipidemia (Cintra *et al.* 2013), and insulin resistance (IR) (Astolphi *et al.* 2013, Pereira *et al.* 2017), which is related to type II Diabetes Mellitus (DM2).

Insulin is an anabolic hormone essential for maintaining glycemic homeostasis, growth, and cell differentiation (Carvalho *et al.* 2002). This hormone binds to its receptor and increases the receptor's intrinsic tyrosine kinase activity, leading to phosphorylation of insulin receptor substrates (IRS-1 and IRS-2, known collectively as pp185 proteins). Tyrosine phosphorylation of IRS-1 stimulates phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). This leads to the activation of protein kinase B (PKB/Akt) and phosphorylation of its substrate, AS160, facilitating the translocation of GLUT4 to the plasma membrane, promoting cellular glucose uptake. Therefore, maintaining adequate responses of the IRS-PI3K-Akt pathway is crucial for normal insulin-mediated glucose metabolism in tissues sensitive to this hormone (Wei *et al.* 2008).

The IR condition involves a compensatory increase in the production of insulin by pancreatic  $\beta$  cells. However, with the progression of this condition, insulin production decreases because of the increase in the secretory demand and pancreatic  $\beta$  cell dysfunction. Thus, insulin secretion is insufficient to compensate for IR (Pradhan & Goel 2011).

Inflammatory cytokines are associated with the development of IR (Huang *et al.* 2016, Blasco-Baque *et al.* 2017). Indeed, tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  and interleukin (IL)  $1\beta$  can activate proteins of the inflammatory pathway, such as the c-Jun amino-terminal kinase (JNK) and the I $\kappa$ B kinase (IKK $\alpha/\beta$ ) complex (Shoelson *et al.* 2006), which promote phosphorylation of IRS-1 (Aguirre *et al.* 2000) and IRS-2 (Sharfi & Eldar-Finkelman 2008) at serine sites and reduce Akt phosphorylation at serine (Nakatani *et al.* 2004), attenuating insulin signaling (Aguirre *et al.* 2002).

It is known that melatonin (MEL), a hormone synthesized mainly in the pineal gland during the dark period of the circadian cycle (Faria *et al.* 2013), has anti-inflammatory effects (Genovese *et al.* 2005, Kadry *et al.* 2018). Additionally, Saritekin *et al.* (2019) demonstrated that the administration of

MEL decreases the inflammatory process and bone destruction in periapical lesions caused experimentally in rats.

MEL has also been shown to have regulatory effects on pancreatic  $\beta$  cell insulin secretion (Picinato *et al.* 2008). In addition, MEL improves tunicamycin-enhanced IR by restoring Akt phosphorylation, as well as by reducing phosphorylation of enzyme 1-requiring inositol (IRE-1), JNK, and IRS-1 serine in skeletal muscle cells (Quan *et al.* 2015).

Considering the relationship between oral inflammatory processes and IR and the effects of MEL on these variables, we hypothesized that supplementation with MEL can reverse the systemic alterations caused by apical periodontitis (AP). For this purpose, the plasma concentrations of glucose, insulin, inflammatory cytokines, IR and the insulin signaling and inflammatory pathways were analyzed in the soleus (SM) and extensor digitorum longus (EDL) muscles of rats with AP that received MEL supplementation.

## **Materials and methods**

### **Animals**

This study followed the Ethical Principles and Guidelines for Animal Experimentation and was approved by the Ethics Committee of São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Brazil (protocol number 00815-2018). Wistar rats were kept in a 12-hour light/dark cycle (lights on at 07:00) at  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  with food (Presence®, Paulínia, São Paulo, SP, Brazil) and water available *ad libitum*.

Seventy-two male albino Wistar rats, 60 days old, were distributed into 4 groups: a) control rats (C); b) control rats supplemented with MEL (M); c) rats with AP induced in the first and second molars (upper and lower) on the right side (AP); d) rats with AP induced in the first and second molars (upper and lower) on the right side supplemented with MEL (AP + M).

### **Apical periodontitis**

At 60 days of life, animals in the AP groups were subjected to AP induction. The animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (80 mg/kg, intramuscular; Dopalen, Sespo Ind e Com Ltda,

Paulínia, SP, Brazil), and xylazine (10 mg/kg, intramuscular; Anasedan, Sespo Ind e Com Ltda, Paulínia, SP, Brazil) and a round bur measuring 0.1 mm in diameter (LN Long Neck Drill, Dentsply Ind e Com Ltda, Petrópolis, RJ, Brazil) was surgically inflicted in the first and second right molars (upper and lower) to expose the dental pulps to the oral environment through the occlusal surface. The dietary intake and body weight of the rats were evaluated daily for sixty days.

### **Administration of melatonin**

The animals in the M and AP + M groups were treated with MEL (Melatonin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) shortly after AP induction. MEL (1 g) was initially diluted in 20 mL of absolute ethanol and 980 mL of drinking water to a final volume of 1 L. Then, this MEL solution was diluted in drinking water to obtain a dosage of 5 mg/kg based on previous studies (Sartori *et al.* 2009, Agil *et al.* 2011, De Oliveira *et al.* 2012). Subsequently, this solution was placed in their drinking bottles during the dark period (7 pm to 7 am) for 60 days. The MEL concentration was adjusted every day according to the animals' evolved body weight. The animals in the C and AP groups received a carrier solution prepared with 20 mL of absolute ethanol dissolved in 980 mL of drinking water added to their drinking bottles following the same criteria for the treated animals.

### **Euthanasia**

After 60 days of treatment with MEL, the rats were fasted for 14 h before the experimental procedures and anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, intraperitoneal; Thiopentax®, Cristália, Itapira, SP, Brazil).

Ten animals from the C, M, AP, and AP + M groups of rats underwent a median laparotomy to collect blood by puncturing the inferior vena cava. Blood samples were transferred to heparinized plastic tubes (BV Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) and centrifuged at 3000×g for 15 min at 4°C. The obtained plasma was stored in aliquots at -80°C for quantification of plasma concentrations of the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and IL-10 as well as of insulinemia and glycemia.

Samples of SM and EDL muscles were collected from another group of the C, M, AP, and AP + M rats (n=8 animals per group) to analyze the insulin signaling and inflammatory pathways by western blot.

Then, all animals were euthanized by an overdose of sodium thiopental anesthetic (150 mg/kg, intraperitoneal, Thiopentax®, Cristália, Itapira, SP, Brazil).

### **Histological analysis of the periapical region**

The right hemimaxyls of the C, AP, M, and AP + M groups were dissected and fixed for 24 h in 4% formaldehyde buffered at neutral pH. Then, the specimens were demineralized in 10% disodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 90 days. Subsequently, the specimens were processed conventionally and embedded in paraffin. Semi-serial slices (5 µm) on the distal-mesial axis of the upper second molars were obtained using a microtome (RM2155, Leica Microsystems, BD, Wetzlar, Germany), stained with hematoxylin and eosin (H&E), and analyzed by optical microscopy (DM 4000 B, Leica).

### **Analysis of glycemia, insulinemia, HOMA-IR, and inflammatory cytokines**

Glycemia was analyzed using the glucose oxidase method (enzymatic glucose, ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brazil) and insulinemia using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Sensitive Rat Insulin, SRI-13K, Millipore, St. Charles, MO, USA). IR was assessed using the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index, which was calculated according to the following formula:  $\text{HOMA-IR} = \text{fasting glucose (mmol/L)} \times \text{fasting insulinemia (}\mu\text{IU/mL)} / 22.5$  (Bonora *et al.* 2000).

Plasma concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, and IL-1 $\beta$  cytokines were determined using ELISA kits, following the manufacturer's instructions (TNF- $\alpha$  and IL-10: Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA; IL-6: BD Biosciences, San Diego, USA; IL-1 $\beta$ : Immuno-Biological Laboratories, Inc., Minneapolis, MN, USA).

### **Evaluation of the inflammatory (IKK and JNK) and insulin signaling pathways (pp185 and Akt) in SM and EDL**

The animals in each group (n=8) were anesthetized and subjected to median laparotomy to remove SM and EDL. Tissues were collected before and after intravenous (portal vein) administration of 1.5 U regular insulin (Humulin, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA) at different times (75 s for EDL and 90 s for SM). The tissue samples were prepared as described by Carvalho *et al.* (1996) and subjected to western blot to quantify: a) pp185 tyrosine phosphorylation status using an anti-phosphotyrosine antibody, b) Akt serine phosphorylation status using an anti-phosphoserine antibody (Ser473), and c) JNK and IKK $\alpha/\beta$  phosphorylation status and total using antibodies against p-JNK, p-IKK $\alpha/\beta$ , JNK, and IKK $\alpha/\beta$ , respectively.  $\beta$ -actin served as the loading control. All primary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The immunoreactive bands were detected by autoradiography using an enhanced chemiluminescence detection system (ECL Kit, Amersham; GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom) according to the manufacturer's instructions. Quantitative analysis of the protein bands was performed using Scion Image software (Scion Image - Release Beta 3b; National Institutes of Health, Frederick, MD, USA).

### **Statistical analysis**

For the analysis of body weight, food intake, blood glucose, insulinemia, HOMA-IR, and inflammatory cytokines, the normality of the data was statistically verified. Statistical analyses were performed by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni test. The results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ , using the Graph Pad Prism version 7.0 statistical software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Values are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

For protein analysis, the normality of the data was statistically verified. Statistical analyses were performed using three-factor ANOVA, followed by the Bonferroni test. The results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ , using the Graph Pad Prism version 7.0 statistical software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

According to the power calculation, inclusion of animals would be sufficient to detect a statistically significant difference between samples with a power of 80% (Dos Santos *et al.* 2018). Sample size was calculated using the OpenEpi ([http://www.openepi.com/Menu/OE\\_Menu.htm](http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm)).

## **Results**

### **Histological evaluation of periapical tissues**

Histological analyses showed that in the C and M groups, the dental apices showed characteristics compatible with normal appearance (Fig. 1 a1-a2 and c1-c2). However, in the AP and AP + M groups, infiltration of inflammatory cells was observed in the area around the dental apex as well as tooth resorption, 60 days after pulp exposure (Fig. 1 b1-b2 and d1-d2).

### **Assessment of body weight and food intake**

The body weight and food intake of rats in the C, AP, M, and AP + M groups were assessed daily, starting from AP induction and the initiation of the supplementation with MEL in drinking water, until the end of the experiment (Fig. 2A and B). The results demonstrate that there was no statistically significant difference in body weight and food intake among the groups.

### **Assessment of glycemia, insulinemia, and HOMA-IR index**

The M group showed a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in glycemia compared to the C and AP groups. However, there were no statistical difference in fasting glycemia values among the C, AP, and AP + M groups as well between M and AP + M. Insulinemia values were higher in the AP group ( $p < 0.05$ ) than in the C and M groups. There were no statistically significant differences in plasma insulin concentrations among the C, M, and AP + M groups and between the AP and AP + M groups. HOMA-IR was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the AP group than in the other groups. There were no statistically significant differences in HOMA-IR among the C, M, and AP + M groups (Table 1).

### **Evaluation of plasma concentrations of inflammatory cytokines**

The plasma concentration of TNF- $\alpha$  was higher ( $p < 0.05$ ) in the AP group than in the other groups. However, there was no difference in the concentration of TNF- $\alpha$  among the C, M, and AP + M groups (Table 2).

There was a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the concentration of IL-6 in the AP group compared to the C and M groups. However, there was no difference in the concentration of IL-6 among the C, M, and AP + M groups as well between AP and AP + M groups (Table 2).

The concentration of IL-1 $\beta$  was higher ( $p < 0.05$ ) in the AP group than in the other groups. In addition, the plasma concentration of this cytokine in the M group was significantly lower than that in the C and AP groups ( $p < 0.05$ ). There was no difference in the concentration of IL-1 $\beta$  between the C and AP + M groups as well between M and AP + M groups (Table 2).

A significant decrease in IL-10 ( $p < 0.05$ ) was observed in the AP group compared to the M and AP + M groups and a significant increase in the M group compared to the C and AP groups. There was no difference in the concentration of IL-10 between the C and AP groups as well between the C and AP + M groups and between the M and AP + M groups (Table 2).

### **Evaluation of the insulin signaling pathway (pp185 and Akt) in the SM and EDL**

pp185 tyrosine and Akt serine phosphorylation status increased ( $p < 0.05$ ) after stimulation with insulin in relation to baseline levels in all groups in SM and EDL.

After insulin stimulation, pp185 tyrosine phosphorylation status (Fig. 3A and B) and Akt serine phosphorylation status (Fig. 4A and B) were lower ( $p < 0.05$ ) in the AP group than in the C, M, and AP + M groups in the SM. However, regarding EDL, there were no statistically significant differences in the phosphorylation status of these proteins among the groups (Fig. 3C, 3D and Fig. 4C, 4D).

### **Inflammatory pathway assessment (JNK and IKK $\alpha/\beta$ ) in the SM and EDL**

There was increase IKK $\alpha/\beta$  phosphorylation status ( $p < 0.05$ ) in the AP group compared to the C, M, and AP + M groups in the SM (Fig. 5A and B) and EDL (Fig. 5C and D). There was no difference in JNK phosphorylation status among the groups in both tissues (Fig. 6).

## Discussion

The present study demonstrated that AP in rats promoted: IR; increased the concentrations of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ ); increased IKK $\alpha$ / $\beta$  phosphorylation status in SM and EDL. In addition, it caused a decrease in the concentration of IL-10 and impaired the transduction of the insulin signaling in SM. MEL supplementation in rats with AP improved: insulin sensitivity; concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-10; changed found in the insulin signaling in SM, and the IKK $\alpha$ / $\beta$  phosphorylation status in SM and EDL. Thus, the hypothesis of the study was confirmed.

MEL mediates the integration between the cyclic environment and the circadian distribution of physiological and behavioral processes necessary to optimize energy homeostasis (Cipolla-Neto *et al.* 2014). It has been shown that MEL regulates the expression of the hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) gene (Rasmussen *et al.* 2003), which can exert a direct anorexigenic effect. Buonfiglio *et al.* (2018) have found that pinealectomized rats have central resistance to leptin (a hormone responsible for promoting an anorexigenic response in hypothalamic neurons), changes in thermoregulatory mechanisms, decreased activity of brown adipose tissue, and increased food intake and body weight. In contrast, treatment of these animals for 13 weeks with MEL reduced food intake and body weight due to the action of this hormone on the hypothalamus, modulating the expression of orexigenic neuropeptides (Agouti-related peptide - AgRP and Orexin). In models of obesity (Prunet-Marcassus *et al.* 2003) and aging (Mendes *et al.* 2013), it has been observed that MEL treatment for 3 and 16 weeks, respectively resulted in a reduction in body weight and food intake. However, the results of the present study demonstrated that MEL treatment did not affect body weight or food intake among groups. Zanuto *et al.* (2013) have also demonstrated that in elderly and obese rats supplementation with MEL in drinking water for 8 weeks, had no effect on these parameters.

Research has been carried out to improve understanding of the relationship between oral diseases and systemic changes. Astolpho *et al.* (2013) and Pereira *et al.* (2017) have found that rats with AP develop IR. In the present study, there was no statistically significant difference in glycemia and insulinemia in the AP + M group compared to the AP group. However the AP + M group showed reduced IR compared to the AP group, demonstrating that MEL reversed IR in rats with AP. Similar results, in relation to IR, have been found in another type of oral disease, such as PD, by Dos Santos *et*

*al.* (2018), in rats with PD and/or pinealectomized treated with MEL. According to Prunet-Marcassus *et al.* (2003), MEL had no effect on insulinemia and glycemia in pinealectomized rats fed a high-fat diet (HFD). We emphasize that the AP group also had higher IR and insulinemia in relation to the C and M groups. Regarding blood glucose, the M group showed lower levels only in relation to the C and AP groups. However, insulinemia in M did not differ from that in C and AP + M.

MEL has been described as a potent antidiabetic agent (Agil *et al.* 2012, She *et al.* 2014, Zephy & Ahmad 2015). Animal (Picinato *et al.* 2008, Nagorny *et al.* 2011) and human (Bouatia-Naji *et al.* 2009) studies have found that MEL directly affects insulin production and secretion. In this context, the literature demonstrates that oral administration of MEL reduces insulinemia and HOMA-IR index values in insulin-resistant mice fed with HFD (Sartori *et al.* 2009) and in women with polycystic ovary syndrome (Shabani *et al.* 2019). These studies demonstrate that MEL can be a potential therapeutic agent for the prevention of IR.

Another beneficial effect of MEL is its function in the oral cavity (Cutando *et al.* 2003), since this hormone is able to improve periodontal conditions, such as the depth of the periodontal pocket and the level of clinical insertion in insomniac individuals (El-Sharkawy *et al.* 2019) and diabetic patients (Bazyar *et al.* 2019) with PD. In addition, it reduces tissue concentrations (gingival) of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in obese animals with PD (Virto *et al.* 2018). Likewise, MEL reduces plasma concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in an experimental model of rats with PD (Kara *et al.* 2013) and acute pulpitis (Li *et al.* 2015). In addition, MEL decreases gingival concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-6, and prostaglandin E2 in patients with diabetes and PD (Montero *et al.* 2017).

Tissue damage caused by periodontitis is associated with high concentrations of inflammatory cytokines (Kara *et al.* 2013), such as TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  (De Molon *et al.* 2018, Akutagawa *et al.* 2019) and lower concentrations of the anti-inflammatory cytokine, IL-10 (Bi *et al.* 2019). In the present study, rats with AP showed increased plasma concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in relation to all groups. In addition, the concentration of IL-1 $\beta$  was higher in group C than in group M. Regarding IL-6 concentration, the AP group showed higher value compared to the C and M groups. In addition, the AP group showed a decrease in the concentration of IL-10 in relation to the M and AP + M groups. The concentration of this cytokine was also lower in group C than in group M. The comparisons of the

cytokines mentioned above between the AP and AP + M groups indicated that treatment with MEL reversed the changes induced by AP, except for IL-6.

Our results are similar to those of Carrillo-Vico *et al.* (2005). These authors verified in an experimental model of septic shock in mice that MEL increased the levels of IL-10, both locally and systemically, and decreased that of TNF- $\alpha$ , while had no significant effect on the levels of IL-6. However, the administration of oral capsules containing 6 mg of MEL for 8 weeks reduced the levels of IL-6 and C-reactive protein in diabetic patients with PD but did not significantly alter serum concentrations of TNF- $\alpha$  (Bazyar *et al.* 2019). In addition, no decrease in IL-1 $\beta$  concentration was observed in diabetic rats with PD administered intraperitoneally 10 mg/kg of MEL for 4 weeks (Balci Yuce *et al.* 2016). The dose, duration, and route of administration of the hormone are possible factors that led to the diversity of results.

As previously described, inflammatory cytokines are associated with the development of IR (Huang *et al.* 2016, Blasco-Baque *et al.* 2017). Several potential mechanisms may explain the deleterious effects of TNF- $\alpha$  on insulin signaling: 1) suppression of insulin-tyrosine kinase receptor activity; 2) decreased tyrosine phosphorylation of IRS-1 (Hotamisligil *et al.* 1994, Peraldi *et al.* 1997); 3) increased serine phosphorylation of IRS-1 (Aguirre *et al.* 2000); 4) reduction of Akt phosphorylation in serine/threonine; 5) impairment in the translocation of GLUT4 to the plasma membrane (Nieto-Vazquez *et al.* 2007); and 6) activation of the NF- $\kappa$ B pathway (Hayden & Ghosh 2014, Shoelson *et al.* 2006).

It has been shown that rats with AP have higher plasma concentrations of TNF- $\alpha$  and reduced phosphorylation of IRS1/IRS2 in periepididimal white adipose tissue (WAT) (Astolphi *et al.* 2013) and in muscle tissue (Astolphi *et al.* 2015). Similarly, we observed high plasma concentrations of pro-inflammatory cytokines, IR, and impairment in insulin signaling pathway, as evidenced by decreased of pp185 and Akt phosphorylation status in muscle tissue, in rats with AP.

Anhê *et al.* (2004) demonstrated for the first time that the insulin receptor can be coactivated by MEL. MEL increased the activation of insulin-tyrosine kinase receptor, followed by tyrosine phosphorylation of IRS-1 and serine phosphorylation of Akt in the hypothalamus of rats. Additionally, it has been shown hypothalamic-liver communication triggered by MEL-induced hypothalamic

phosphorylation of Akt, leading to the suppression of hepatic gluconeogenesis, probably through peripheral muscarinic receptors (Faria *et al.* 2013). This central-peripheral communication highlights the role of MEL in controlling glucose metabolism.

The beneficial effects of MEL on insulin signaling in skeletal muscle cells have been demonstrated in vivo (Teodoro *et al.* 2014) and in vitro (Quan *et al.* 2015). The intracellular mechanism by which MEL can improve IR in these cells was first identified by Teodoro *et al.* (2014). These authors found that MEL, by activating calcium kalmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), induces phosphorylation of cAMP-responsive binding protein (CREB). CREB increases the expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PGC-1 $\alpha$ ), which in turn activates key genes involved in mitochondrial biogenesis, leading to Akt phosphorylation and increased glucose uptake in skeletal muscle. Similarly, Quan *et al.* (2015) observed that pretreatment with MEL restored tunicamycin-reduced insulin signaling pathway by increasing the phosphorylation of IRS-1 and Akt in cultured skeletal muscle cells.

In the present study, we evaluated the insulin signaling pathway in SM and EDL tissues. We observed that animals with AP showed impairment of this pathway only in SM, and the treatment with MEL reversed this change. Similarly, other studies have found that MEL treatment restored the activity of proteins involved in the insulin signaling pathway in the hippocampus (diabetic rats) (Kamsrijai *et al.* 2020), hypothalamus, liver, skeletal muscle, and WAT in elderly and obese rats (Zanuto *et al.* 2013). In addition, MEL has been shown to be effective in improving IR and liver steatosis in mice fed HFD (Heo *et al.* 2018).

However, Dos Santos *et al.* (2018) did not observe an increase in Akt serine phosphorylation status, after insulin stimulation, in muscle, liver, and WAT of pinealectomized rats with PD supplemented with MEL. Likewise, there was no increase in Akt phosphorylation in the SM of animals fed HFD (Sartori *et al.* 2009) and in the liver of elderly rats (Mendes *et al.* 2013) after administration of MEL.

Skeletal muscle is responsible for most of insulin-stimulated use of glucose (DeFronzo *et al.* 1985). It is worth mentioning that some muscles are more sensitive to insulin than others. Skeletal muscle is composed of two main types of fibers: 1) Type I fibers (also called slow-twitch) are oxidative,

have a large number of mitochondria, and use fatty acids for energy production; 2) type II fibers (also called fast-twitch) are glycolytic because they have fewer mitochondria and use glucose for energy production (Torre-Villalvazo *et al.* 2019). Slow-twitch fibers are more sensitive to insulin and more responsive to insulin than fast-twitch fibers (James *et al.* 1985). In addition, it has been shown that the amount of GLUT4 is higher in slow-twitch fibers (Gaster *et al.* 2000). SM is considered a predominantly oxidative muscle and is more sensitive to insulin. However, EDL is considered a less oxidative muscle (Messa *et al.* 2019). This data may explain the reason for the impairment in the insulin signaling pathway only in the SM in this study.

As previously described, the insulin signaling pathway can also be impaired by pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , as they can activate inflammatory pathways, such as JNK and IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B (Shoelson *et al.* 2006). In this direction, in order to ascertain the mechanisms involved in IR in rats with AP, an analysis of the inflammatory pathway was performed and the results demonstrated that high plasma concentrations of pro-inflammatory cytokines, and consequent activation of the IKK $\alpha$ / $\beta$  protein in the muscle tissues of these animals, can cause this change. Our results corroborate the study by Pereira *et al.* (2017), who observed an increase in the IKK $\alpha$ / $\beta$  phosphorylation status in the muscle tissue of rats with AP.

Another study has found that in adult rats, the offspring of rats with AP showed IR, increased plasma concentration of TNF- $\alpha$ , changes in the inflammatory pathway (increased IKK $\alpha$ / $\beta$  phosphorylation status) and insulin signaling (decreased pp185 tyrosine phosphorylation status and increased IRS-1 serine phosphorylation status) in muscle tissue and WAT (Tsosura *et al.* 2019).

It is known that MEL has an anti-inflammatory function, and its inhibitory effects on NF- $\kappa$ B have been previously found in several cells and tissues. In the muscle tissue of rats, MEL has been shown to have protective effects against damage caused by acute exercise, since it prevents oxidative stress, inhibits the IKK/NF- $\kappa$ B cascade, and blocks the production of harmful inflammatory mediators (Alonso *et al.* 2006). In the study by Chuffa *et al.* (2015), MEL was able to downregulate IKK- $\alpha$ , I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B, IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 in an ovarian cancer rat model. In addition, Ali *et al.* (2018) demonstrated, in vivo and in vitro, that MEL, by means of the nuclear factor-dependent antioxidant mechanism related to erythroid 2 (Nrf2), decreased reactive oxygen species and neuroinflammation,

blocked the activation of the MAPK p-P38/p-JNK, reduced the expression of p-NF- $\kappa$ B/p-IKK $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and COX-2, and prevented neurodegeneration in rats. In the present study, MEL was effective in decreasing the activation of IKK $\alpha/\beta$  in the muscle tissues of rats with AP.

Tang *et al.* (2001) showed that IKK negatively modulates JNK activity, probably through the induction of NF- $\kappa$ B target genes that encode proteins, such as the X chromosome-linked apoptosis inhibitor (XIAP), which interferes with JNK-mediated activation by TNF- $\alpha$ . These findings reveal that the NF- $\kappa$ B and JNK signaling pathways are functionally interconnected (Schwabe & Brenner 2006). This may be the reason why no difference was found in the JNK phosphorylation status, as the IKK signaling pathway may have overtaken the JNK signaling pathway.

Our results demonstrated that there was no statistically significant difference in the JNK phosphorylation status in muscle tissue between the groups. Similarly, there were no differences in this parameter in muscle tissue of adult rats, offspring of rats with AP (Tsosura *et al.* 2019) or PD (Mattera *et al.* 2019).

The results of the present study demonstrate that MEL is a potent adjuvant treatment to improve AP-induced IR, and changes in the insulin signaling and inflammatory pathways. In addition, these findings highlighted the impact of AP (localized inflammatory process) on the oral and systemic health of adult rats.

## Conclusion

Supplementation with MEL was effective in improving AP-induced IR, plasma concentrations of cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10, as well as changes in the insulin signaling and inflammatory pathways in muscle tissue. As this work was carried out in rats, we suggest that it should be performed in humans to ascertain the importance of MEL supplementation in patients with AP.

## Acknowledgments

This work was supported by São Paulo Research Foundation – FAPESP (grant numbers #2018/23346-3, #2019/12995-3, #2019/18589-7).

### Conflict of interest statement

The authors have stated explicitly that there are no conflicts of interest in connection with this article.

### References

- Agil A, Navarro-Alarcón M, Ruiz R, Abuhamad S, El-Mir MY, Vázquez GF (2011) Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. *Journal of pineal research* **50**, 207-212.
- Agil A, Rosado I, Ruiz R, Figueroa A, Zen N, Fernández-Vázquez G (2012) Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. *Journal of pineal research* **52**, 203-210.
- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White, MF (2000) The c-Jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 9047-9054.
- Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF (2002) Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 1531-7.
- Akutagawa K, Fujita T, Ouhara K *et al.* (2019) Glycyrrhizic acid suppresses inflammation and reduces the increased glucose levels induced by the combination of *Porphyromonas gulae* and ligature placement in diabetic model mice. *International immunopharmacology* **68**, 30-38.
- Ali T, Rehman SU, Shah FA, Kim MO (2018) Acute dose of melatonin via Nrf2 dependently prevents acute ethanol-induced neurotoxicity in the developing rodent brain. *Journal of neuroinflammation* **15**, 119.
- Alonso M, Collado PS, González-Gallego J (2006) Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. *Journal of pineal research* **41**, 8-14.
- Anhê GF, Caperuto LC, Pereira-Da-Silva M *et al.* (2004) In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. *Journal of neurochemistry* **90**, 559-566.

- Astolpho RD, Curbete MM, Chiba FY *et al.* (2015) Periapical lesions decrease insulin signaling in rat skeletal muscle. *Journal of endodontics* **41**, 1305-1310.
- Astolpho RD, Curbete MM, Colombo NH *et al.* (2013) Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. *Journal of endodontics* **39**, 648-652.
- Balci Yuce H, Karatas O, Aydemir Turkal H *et al.* (2016) The effect of melatonin on bone loss, diabetic control, and apoptosis in rats with diabetes with ligature-induced periodontitis. *Journal of periodontology* **87**, e35-e43.
- Bazyar H, Gholinezhad H, Moradi L *et al.* (2019) The effects of melatonin supplementation in adjunct with non-surgical periodontal therapy on periodontal status, serum melatonin and inflammatory markers in type 2 diabetes mellitus patients with chronic periodontitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Inflammopharmacology* **27**, 67-76.
- Bi CS, Sun LJ, Qu HL, Chen F, Tian BM, Chen FM (2019) The relationship between T-helper cell polarization and the RANKL/OPG ratio in gingival tissues from chronic periodontitis patients. *Clinical and Experimental Dental Research* **5**, 377-388.
- Blasco-Baque V, Garidou L, Pomié C *et al.* (2017) Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *Gut* **66**, 872-885.
- Bonora E, Targher G, Alberiche M *et al.* (2000) 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* **23**, 57-63.
- Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proença C *et al.* (2009) A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nature genetics* **41**, 89.
- Buonfiglio D, Parthimos R, Dantas R *et al.* (2018) Melatonin absence leads to long-term leptin resistance and overweight in rats. *Frontiers in endocrinology* **9**, 122.
- Caplan DJ, Chasen JB, Krall EA *et al.* (2006) Lesions of endodontic origin and risk of coronary heart disease. *Journal of dental research* **85**, 996-1000.

- Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L *et al.* (2005) Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *Journal of pineal research* **39**, 400-408.
- Carvalho JB, Zecchin HG, Saad MJ (2002) Vias de sinalização da insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* **46**, 419-425.
- Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ (1996) Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* **137**, 151-159.
- Chuffa LGA, Fioruci-Fontanelli BA, Mendes LO *et al.* (2015) Melatonin attenuates the TLR4-mediated inflammatory response through MyD88-and TRIF-dependent signaling pathways in an in vivo model of ovarian cancer. *BMC cancer* **15**, 34.
- Cintra LTA, da Silva Facundo AC, Azuma MM *et al.* (2013) Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. *Clinical oral investigations* **17**, 1595-1599.
- Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ (2014) Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *Journal of pineal research* **56**, 371-381.
- Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D (2003) Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. *Journal of pineal research* **35**, 239-244.
- De Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA (2018) Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microscopy research and technique* **81**, 1412-1421.
- De Oliveira AC, Andreotti S, Farias TDSM *et al.* (2012) Metabolic disorders and adipose tissue insulin responsiveness in neonatally STZ-induced diabetic rats are improved by long-term melatonin treatment. *Endocrinology* **153**, 2178-2188.
- DeFronzo RA, Gunnarsson R, Björkman O, Olsson M, Wahren J (1985) Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* **76**, 149-155.
- Dodd DZ, Rowe DJ (2013) The relationship between postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. *American Dental Hygienists' Association* **87**, 336-344.

- Dos Santos RM, Marani F, Chiba FY *et al.* (2018) Melatonin promotes reduction in TNF levels and improves the lipid profile and insulin sensitivity in pinealectomized rats with periodontal disease. *Life sciences* **213**, 32-39.
- El-Sharkawy H, Elmeadawy S, Elshinnawi U, Anees M (2019) Is dietary melatonin supplementation a viable adjunctive therapy for chronic periodontitis?—A randomized controlled clinical trial. *Journal of periodontal research* **54**, 190-197.
- Faria JA, Kinote A, Ignacio-Souza LM *et al.* (2013) Melatonin acts through MT1/MT2 receptors to activate hypothalamic Akt and suppress hepatic gluconeogenesis in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **305**, E230-E242.
- Gaster M, Poulsen P, Handberg A, Schröder HD, Beck-Nielsen H (2000) Direct evidence of fiber type-dependent GLUT-4 expression in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **278**, E910-E916.
- Genovese T, Paola RD, Mazzon E, Muià C, Caputi AP, Cuzzocrea S (2005) Melatonin limits lung injury in bleomycin treated mice. *Journal of pineal research* **39**, 105-112.
- Hayden MS, Ghosh S (2014) Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines. In *Seminars in immunology*. Academic Press. **26**, 253-266.
- Heo JI, Yoon DW, Yu JH *et al.* (2018) Melatonin improves insulin resistance and hepatic steatosis through attenuation of alpha-2-HS-glycoprotein. *Journal of pineal research* **65**, e12493.
- Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM (1994) Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 4854-4858.
- Huang Y, Zeng J, Chen G, Xie X, Guo W, Tian W (2016) Periodontitis contributes to adipose tissue inflammation through the NF- $\kappa$ B, JNK and ERK pathways to promote insulin resistance in a rat model. *Microbes and infection* **18**, 804-812.
- James DE, Jenkins AB, Kraegen EW (1985) Heterogeneity of insulin action in individual muscles in vivo: euglycemic clamp studies in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* **248**, E567-E574.

- Kadry SM, El-Dakdoky MH, Haggag NZ, Rashed LA, Hassen, MT (2018) Melatonin improves the therapeutic role of mesenchymal stem cells in diabetic rats. *Toxicology mechanisms and methods* **28**, 529-538.
- Kamsrijai U, Wongchitrat P, Nopparat C, Satayavivad J, Govitrapong, P (2020) Melatonin attenuates streptozotocin-induced Alzheimer-like features in hyperglycemic rats. *Neurochemistry international* **132**, 104601.
- Kara A, Akman S, Ozkanlar S *et al.* (2013) Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. *Free Radical Biology and Medicine* **55**, 21-26.
- Li JG, Lin JJ, Wang ZL *et al.* (2015) Melatonin attenuates inflammation of acute pulpitis subjected to dental pulp injury. *American journal of translational research* **7**, 66-78.
- Mattera M, Chiba FY, Lopes FL *et al.* (2019) Effect of maternal periodontitis on GLUT4 and inflammatory pathway in adult offspring. *Journal of periodontology* **90**, 884-893.
- Mendes C, Lopes AM, do Amaral FG *et al.* (2013) Adaptations of the aging animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin. *Journal of pineal research* **55**, 229-239.
- Messa GAM, Piasecki M, Hill C, McPhee JS, Tallis J, Degens H (2019) Morphological alterations of mouse skeletal muscles during early ageing are muscle specific. *Experimental gerontology*, **125**, 110684.
- Montero J, Lopez-Valverde N, Ferrera MJ, Lopez-Valverde A (2017) Changes in crevicular cytokines after application of melatonin in patients with periodontal disease. *Journal of clinical and experimental dentistry* **9**, e1081-e1087.
- Nagorny CL, Sathanoori R, Voss U, Mulder H, Wierup N (2011) Distribution of melatonin receptors in murine pancreatic islets. *Journal of pineal research* **50**, 412-417.
- Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D *et al.* (2004) Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 45803-45809.
- Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, de Alvaro C, Rondinone CM, Valverde AM, Lorenzo M (2007) Protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient myocytes show increased insulin sensitivity and protection against tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance. *Diabetes* **56**, 404-413.

- Paju S, Scannapieco FA (2007) Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral diseases* **13**, 508-512.
- Peraldi P, Xu M, Spiegelman BM (1997) Thiazolidinediones block tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inhibition of insulin signaling. *The Journal of clinical investigation* **100**, 1863-1869.
- Pereira RF, Cintra LTA, Tessarin GWL *et al.* (2017) Periapical Lesions Increase Macrophage Infiltration and Inflammatory Signaling in Muscle Tissue of Rats. *Journal of endodontics* **43**, 982-988.
- Picinato MC, Hirata AE, Cipolla-Neto J *et al.* (2008) Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. *Journal of pineal research* **44**, 88-94.
- Pradhan S, Goel K (2011) Interrelationship between diabetes and periodontitis: a review. *JNMA; journal of the Nepal Medical Association* **51**, 144-153.
- Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A *et al.* (2003) Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology* **144**, 5347-5352.
- Quan X, Wang J, Liang C, Zheng H, Zhang L (2015) Melatonin inhibits tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in skeletal muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications* **463**, 1102-1107.
- Rasmussen, DD, Marck, BT, Boldt, BM, Yellon, SM, Matsumoto, AM (2003) Suppression of hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) gene expression by daily melatonin supplementation in aging rats. *Journal of pineal research* **34**, 127-133.
- Saritekin E, Ureyen Kaya B, Asci H, Ozmen O (2019) Anti-inflammatory and antiresorptive functions of melatonin on experimentally induced periapical lesions. *International endodontic journal* **52**, 1466-1478.
- Sartori C, Dessen P, Mathieu C *et al.* (2009) Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice. *Endocrinology* **150**, 5311-5317.
- Schwabe RF, Brenner DA (2006) Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- $\alpha$ -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **290**, G583-589.

- Shabani A, Foroozanfard F, Kavossian E *et al.* (2019) Effects of melatonin administration on mental health parameters, metabolic and genetic profiles in women with polycystic ovary syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of affective disorders* **250**, 51-56.
- Sharfi H, Eldar-Finkelman H (2008) Sequential phosphorylation of insulin receptor substrate-2 by glycogen synthase kinase-3 and c-Jun NH2-terminal kinase plays a role in hepatic insulin signaling. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **294**, E307-E315.
- She M, Laudon M, Yin W (2014) Melatonin receptors in diabetes: a potential new therapeutical target?. *European journal of pharmacology* **744**, 220-223.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006) Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1793-1801.
- Tang G, Minemoto Y, Dibling B *et al.* (2001) Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* **414**, 313-317.
- Teodoro BG, Baraldi FG, Sampaio IH *et al.* (2014) Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Journal of pineal research* **57**, 155-167.
- Torre-Villalvazo I, Alemán-Escondrillas G, Valle-Ríos R, Noriega LG (2019) Protein intake and amino acid supplementation regulate exercise recovery and performance through the modulation of mTOR, AMPK, FGF21, and immunity. *Nutrition research* **72**, 1-17.
- Tsosura TVS, Chiba FY, Mattera, M. *et al.* (2019) Maternal apical periodontitis is associated with insulin resistance in adult offspring. *International endodontic journal* **52**, 1040-1050.
- Virto L, Cano P, Jimenez-Ortega V *et al.* (2018) Melatonin as adjunctive therapy in the treatment of periodontitis associated with obesity. *Journal of clinical periodontology* **45**, 1336-1346.
- Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers JR (2008) Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **294**, R673-R680.
- Zanuto R, Siqueira-Filho MA, Caperuto LC *et al.* (2013) Melatonin improves insulin sensitivity independently of weight loss in old obese rats. *Journal of Pineal Research* **55**, 156-165.
- Zephy D, Ahmad J (2015) Type 2 diabetes mellitus: Role of melatonin and oxidative stress. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* **9**, 127-131.

## Figure Legends

**Figure 1** Representative images of histological analysis of the periapical region after 60 days of pulp exposure. H&E staining shows no inflammatory infiltrate in the periapical region in the C group (a1, a2); a moderate inflammatory infiltrate around the apex, disruption of the periodontal ligament and bone resorption area in the AP group (b1, b2); no inflammatory infiltrate in the periapical region in the M group (c1, c2); moderate inflammatory infiltrate and periapical bone resorption area in the AP + M group (d1, d2) (a1-d1, 100x; a2-d2, 400x increase).

**Figure 2** Evaluation of body weight and food intake weekly. A. Weekly body weight. B. Average weekly food intake. Groups of control rats (C), rats with apical periodontitis (AP), control rats supplemented with melatonin (M), and rats with AP supplemented with melatonin (AP + M). Body weight and food intake were evaluated from the AP induction and initiation of supplementation with melatonin, until the end of the experiment. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 18 animals per group.

**Figure 3** Evaluation of pp185 tyrosine (pTyr) phosphorylation status before (-) and after (+) insulin stimulation in the soleus (SM) (A and B) and extensor digitorum longus (EDL) (C and D) muscles of control rats (C), rats with apical periodontitis (AP), control rats supplemented with melatonin (M), and rats with AP supplemented with MEL (AP + M). In A and C, typical autoradiograph: equal amounts of protein were analyzed to SDS-PAGE (185  $\mu$ g).  $\beta$ -actin was used as the control. In B and D, the values of pp185 tyrosine phosphorylation status (expressed in arbitrary units) are presented as mean  $\pm$  SEM, n=8 animals per group. \*  $p < 0.05$  insulin (-) vs. insulin (+); †  $p < 0.05$  AP (+) vs. C (+), M (+), and AP + M (+).

**Figure 4** Evaluation of Akt serine (pSer 473) phosphorylation status before (-) and after (+) insulin stimulation in soleus (SM) (A and B) and extensor digitorum longus (EDL) (C and D) muscles of control rats (C), rats with apical periodontitis (AP), control rats supplemented with melatonin (M) and rats with AP supplemented with MEL (AP + M). In A and C, typical autoradiograph: equal amounts of protein were analyzed to SDS-PAGE (185  $\mu$ g).  $\beta$ -actin was used as the control. In B and D, the values of Akt serine phosphorylation status (expressed in arbitrary units) are presented as mean  $\pm$  SEM, n=8 animals per group. \*  $p < 0.05$  insulin (-) vs. insulin (+); †  $p < 0.05$  AP (+) vs. C (+), M (+), and AP + M (+).

**Figure 5** Evaluation of IKK $\alpha/\beta$  phosphorylation status in the soleus (SM) (A and B) and extensor digitorum longus (EDL) (C and D) muscles of control rats (C), rats with apical periodontitis (AP), control rats supplemented with melatonin (M), and rats with AP supplemented with MEL (AP + M). In A and C, typical autoradiograph: equal amounts of protein were analyzed to SDS-PAGE (185  $\mu$ g). IKK $\alpha/\beta$  total was used as a control. In B and D, the values of IKK $\alpha/\beta$  phosphorylation status (expressed in arbitrary units) are presented as mean  $\pm$  SEM, n=8 animals per group. \*  $p < 0.05$  AP vs. C, M and AP + M.

**Figure 6** Evaluation of JNK phosphorylation status in the soleus (SM) (A and B) and extensor digitorum longus (EDL) (C and D) muscles of control rats (C), rats with apical periodontitis (AP), control rats supplemented with melatonin (M), and rats with AP supplemented with MEL (AP + M). In A and C, typical autoradiograph: equal amounts of protein were analyzed to SDS-PAGE (185  $\mu$ g). JNK total was used as a control. In B and D, the values of JNK phosphorylation status (expressed in arbitrary units) are presented as mean  $\pm$  SEM, n=8 animals per group.

## Tables

**Table 1** Glycemia, insulinemia, and HOMA-IR.

| Parameters           | C                        | AP                       | M                        | AP + M                    |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Glycemia (mmol/L)    | 8.14 ± 0.28 <sup>a</sup> | 8.43 ± 0.42 <sup>a</sup> | 6.70 ± 0.35 <sup>b</sup> | 7.19 ± 0.19 <sup>ab</sup> |
| Insulinemia (μUI/mL) | 6.87 ± 0.61 <sup>a</sup> | 9.48 ± 0.33 <sup>b</sup> | 7.26 ± 0.18 <sup>a</sup> | 8.04 ± 0.16 <sup>ab</sup> |
| HOMA-IR              | 2.49 ± 0.24 <sup>a</sup> | 3.57 ± 0.24 <sup>b</sup> | 2.17 ± 0.13 <sup>a</sup> | 2.57 ± 0.09 <sup>a</sup>  |

Values are presented as the mean ± SEM\* (n = 10 animals per group).

\* Same superscript letters indicate that there was no statistical difference between the groups.

Legends: C - control rats; AP - rats with apical periodontitis; M - control rats supplemented with melatonin; AP + M - rats with apical periodontitis supplemented with melatonin; HOMA-IR - homeostasis model assessment of insulin resistance.

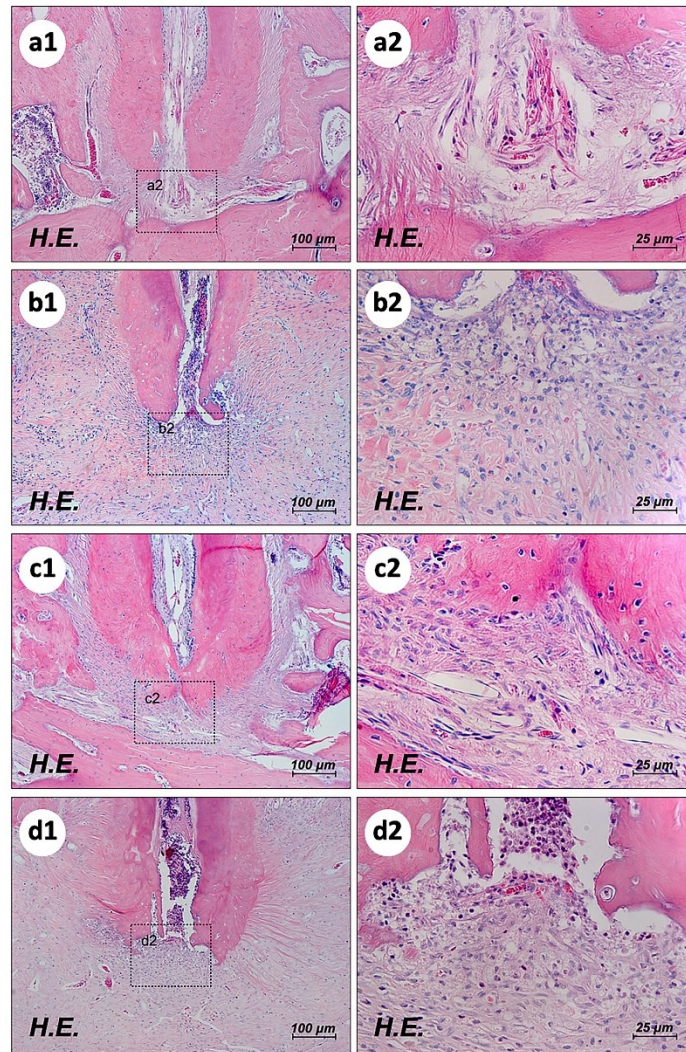
**Table 2** Plasma concentrations of TNF-α, IL-6, IL-1β, and IL-10.

| Parameters    | C                          | AP                        | M                         | AP + M                     |
|---------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| TNF-α (pg/mL) | 8.56 ± 0.84 <sup>a</sup>   | 13.42 ± 0.86 <sup>b</sup> | 9.21 ± 0.83 <sup>a</sup>  | 8.62 ± 0.42 <sup>a</sup>   |
| IL-6 (pg/mL)  | 2.46 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 2.60 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 2.49 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 2.54 ± 0.02 <sup>ab</sup>  |
| IL-1β (pg/mL) | 10.72 ± 0.70 <sup>a</sup>  | 14.06 ± 0.75 <sup>b</sup> | 7.59 ± 0.27 <sup>c</sup>  | 10.15 ± 0.85 <sup>ac</sup> |
| IL-10 (pg/mL) | 40.41 ± 1.22 <sup>ab</sup> | 34.22 ± 2.31 <sup>a</sup> | 48.62 ± 1.81 <sup>c</sup> | 41.87 ± 1.83 <sup>bc</sup> |

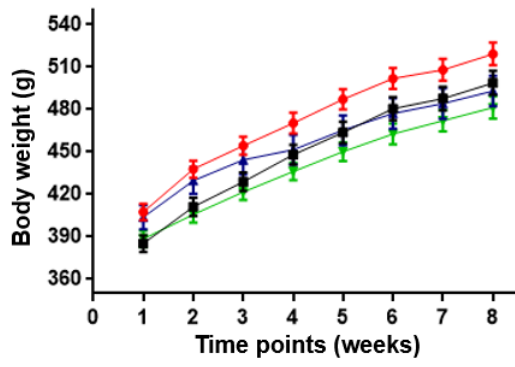
Values are presented as the mean ± SEM\* (n = 10 animals per group).

\* Same superscript letters indicate that there was no statistical difference between the groups.

Legends: C - control rats; AP - rats with apical periodontitis; M - control rats supplemented with melatonin; AP + M - rats with apical periodontitis supplemented with melatonin; TNF-α - tumor necrosis factor alpha; IL-6 - interleukin 6; IL-1β - interleukin 1β; IL-10 - interleukin 10.



A)



B)

