

NÚBIA RAMOS CARVALHO

**AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INSULÍNICA E
INFLAMATÓRIAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS
COM PERIODONTITE APICAL SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO COM MELATONINA**

Araçatuba

2023

NÚBIA RAMOS CARVALHO

**AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INSULÍNICA E
INFLAMATÓRIAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS
COM PERIODONTITE APICAL SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO COM MELATONINA.**

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

Orientadora: Profa. Titular Dóris Hissako Matsushita

Coorientador(a): Profa. Giovana Rampazzo Teixeira

Araçatuba

2023

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Carvalho, Núbia Ramos.

C331a Avaliação das vias de sinalização insulínica e inflamatórias
no músculo esquelético de ratos com periodontite apical sub-
metidos ao tratamento com melatonina / Núbia Ramos
Carvalho. - Araçatuba, 2023
71 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba

Orientadora: Profa. Dóris Hissako Matsushita

Coorientadora: Profa. Giovana Rampazzo Teixeira

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

CDD 612

Dados curriculares

Nascimento: 06.12.1996. Birigui-SP

Filiação: Luiz Antonio Carvalho

Viviani Aparecida de Almeida Ramos Carvalho

2017/2020: Curso de Graduação em Nutrição pelo Centro Universitário Toledo – UNITOLEDO, Araçatuba/SP

2021/2023: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Dedicatória

A Deus e minha família por sempre acreditarem na minha vitória

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Titular Doris Hissako Matsushita por ter me recebido com grande carinho em seu laboratório. Obrigada pela orientação, conselhos, paciência, confiança e incentivo que foram fundamentais para realizar e prosseguir este estudo. Eternamente grata por todo o apoio.

Agradeço imensamente a minha família, especialmente meus pais, Luiz Antonio Carvalho e Viviani Aparecida de Almeida Ramos Carvalho, exemplos de honestidade e dedicação. Obrigada pela paciência, carinho e apoio incondicional em todos os momentos. Palavras são escassas para expressar a grande admiração e amor que tenho por vocês!

Ao João Pedro Loli por sempre estar ao meu lado nos momentos bons ou difíceis. Obrigada pela constante presença. Amo você!

À Prof.^a Giovana Rampazzo Teixeira pelos pareceres semestrais do projeto.

À coordenadora e vice-coordenadora do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba / UNESP, Prof.^a Sandra Helena Penha de Oliveira e Prof.^a Titular Dóris Hissako Matsushita.

Aos professores do Prédio 31 do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba / UNESP, Prof.^a Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, Prof. Antonio Hernandes Chaves Neto, Prof.^a Cristina Antoniali Silva, Prof.^a Doris Hissako Matsushita, Prof. João Carlos Callera, Prof.^a Rita Cássia Menegati Dornelles, Prof.^a Sandra Helena Penha de Oliveira e Prof. Wilson Galhego Garcia.

Aos professores membros da banca do Exame Geral de Qualificação, Prof.^a Giovanna Rampazzo Teixeira e Prof.^a Adriane Cristina Garcia Lemos, e aos membros da banca da defesa de dissertação pelos pertinentes apontamentos que engrandeceram esse estudo.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, os meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos do laboratório de Endocrinologia, Maria Sara de Lima Coutinho Mattera, Thais Veronica Saori Tsosura, Lara Teschi Bravo, Bianca Elvira Belardi, Rodrigo Martins dos Santos e Ana Carla Thalez Ywabuchi Nobumoto, pela ajuda, pelo trabalho em equipe, convivência agradável, pelos momentos compartilhados de estresse e também de alegria e descontração. Muito obrigada a todos! Vocês são incríveis!!

Aos colegas do curso de pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba / UNESP.

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

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pelos serviços prestados.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba / UNESP, Cristiane Regina Lui Mattos, pela atenção dispensada e grande disposição em atender. – Pegar nome valéria

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

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma e em qualquer etapa, para a realização deste trabalho.

A todos, muito obrigada!

*“E o futuro é uma astronave
Que tentamos pilotar
Não tem tempo, nem piedade
Nem tem hora de chegar
Sem pedir licença, muda a nossa vida
E depois convida a rir ou chorar*

*Nessa estrada não nos cabe
Conhecer ou ver o que virá
O fim dela ninguém sabe
Bem ao certo onde vai dar*

*Vamos todos numa linda passarela
De uma aquarela
Que um dia enfim descolorirá”*

Aquarela

Canção de Toquinho

CARVALHO, N.R. **AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INSULÍNICA E INFLAMATÓRIAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS COM PERIODONTITE APICAL SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM MELATONINA** 2023. F 73 Tese (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023

AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INSULÍNICA E INFLAMATÓRIAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS COM PERIODONTITE APICAL SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM MELATONINA

RESUMO

A associação entre inflamação oral e saúde sistêmica tem se tornado um assunto 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) está relacionada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias que podem atuar de forma local e sistêmica. Além disso, esta inflamação oral está associada à síndrome metabólica e diabetes mellitus. Estudos anteriores constataram que ratos adultos com PEA apresentam resistência insulínica (RI) e alterações nas vias do sinal insulínico e inflamatórias no músculo esquelético. Sabe-se que a melatonina (MEL) melhora a RI e possui propriedades anti-inflamatórias. Nesse sentido, hipotetizamos que a administração de MEL em ratos com PEA possa prevenir ou diminuir a RI e as alterações nessas vias citadas acima. Portanto, o presente estudo tem como objetivo verificar os efeitos da administração da MEL na RI, concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias, perfil lipídico e vias insulínica e inflamatória em ratos com PEA. Para tanto, foram utilizados 72 ratos Wistar com 60 dias de idade distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n = 18): a) controle (CN); b) controle com MEL (CNMEL); c) ratos com PEA induzida em primeiros e segundos molares inferiores do lado direito (PEA); d) PEA com MEL (PEAMEL). As PEAs foram induzidas aos 60 dias de idade empregando-se broca em aço carbono dotada de esfera na extremidade com 0,1 mm em primeiros e segundos molares inferiores do lado direito. Após a indução das PEAs, foi iniciada a administração de MEL (5mg/Kg) via oral por meio de gavagem durante 60 dias. Ao término do tratamento foram analisados os seguintes parâmetros: 1) reabsorção óssea e intensidade do infiltrado

inflamatório das hemimandíbulas direitas; 2) glicemia; 3) insulinemia; 4) resistência insulínica (HOMA-IR); 5) concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-1 β) e melatonina; 6) perfil lipídico (colesterolemia e triacilgliceridemia); 7) 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 músculo extensor digital longo (EDL); 8) grau de fosforilação de IKK, JNK, ERK 1/2, NF- κ B p65 e NF- κ B p50 em MS e EDL; 9) expressão gênica de GLUT4 e do IRS-1 em MS e EDL. A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA) de dois fatores seguido pelo teste de Bonferroni e as diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. O presente estudo demonstrou que a PEA em ratos promoveu: RI; dislipidemia; aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) e diminuição nas concentrações plasmáticas de melatonina e IL-10 (anti-inflamatória). Ademais, foi observado uma menor fosforilação de JNK no grupo CNMEL e PEAMEL em comparação ao grupo PEA no EDL. A suplementação com MEL em ratos com PEA promoveu melhora na RI, nas concentrações de colesterol total, nas concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-10 e melatonina. Entretanto, não houve alterações no grau de fosforilação de grau de fosforilação da pp185 em tirosina e Akt em serina; expressão gênica da proteína transportadora de glicose (GLUT4) e IRS1; IKK α/β ; NF κ B p65 e NF κ B p50 em ambos os tecidos.

Palavras-chave: Periodontite Periapical. Melatonina. Resistência à Insulina.

CARVALHO, N.R. **EVALUATION OF INSULIN AND INFLAMMATORY SIGNALING PATHWAYS IN THE SKELETAL MUSCLE OF RATS WITH APICAL PERIODONTITIS SUBMITTED TO TREATMENT WITH MELATONIN.** F.73 Thesis (Ms.) - School of Dentistry of Araçatuba, São Paulo State University, 2023

ABSTRACT

The association between oral inflammation and systemic health has become a subject of great interest in the medical and dental community, as the number of publications on this topic has increased considerably in recent years. Apical periodontitis (AP) is related to the increase of pro-inflammatory cytokines that can act locally and systemically. Furthermore, this oral inflammation is associated with metabolic syndrome and diabetes mellitus. Previous studies have found that adult rats with AP exhibit insulin resistance (IR) and alterations in insulin signaling and inflammatory pathways in skeletal muscle. Melatonin (MEL) is known to improve IR and has anti-inflammatory properties. In this sense, we hypothesize that the administration of MEL in rats with AP can prevent or reduce IR and the changes in these pathways mentioned above. Therefore, the present study aims to verify the effects of MEL administration on IR, plasma concentrations of inflammatory cytokines, lipid profile and insulin and inflammatory pathways in rats with AP. For this purpose, 72 Wistar rats, 60 days old, were randomly distributed into 4 groups (n = 18): a) control (CN); b) control with MEL (CNMEL); c) rats with PEA induced in first and second molars (upper and lower) on the right side (PEA); d) PEA with MEL (PEAMEL). APs were induced at 60 days of age using a carbon steel drill with a 0.1 mm ball at the end in upper and lower first and second molars on the right side. After APs induction, oral administration of MEL (5mg/Kg) through gavage was initiated for 60 days. At the end of the treatment, the following parameters were analyzed: 1) bone resorption and intensity of the inflammatory infiltrate of the right hemimaxillas and hemimandibles; 2) glycemia; 3) insulinemia; 4) insulin resistance (HOMA-IR); 5) plasma concentrations of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-10 and IL-1 β) and melatonin; 6) lipid profile (cholesterolemia and triacylglyceridemia); 7) degree of tyrosine phosphorylation of pp185 and degree of serine phosphorylation of Akt (before and after insulin stimulation) in soleus muscle (SM) and long digital extensor muscle (EDL); 8) GLUT4 glucose transporter protein content in MS and EDL; 9) degree of phosphorylation of IKK, JNK, ERK 1/2, NF- κ B p65 and NF- κ B p50 in MS and EDL; 10) GLUT4 and IRS-1 gene expression in MS and EDL. Statistical analysis was performed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test, and differences between groups were considered significant when $p < 0.05$. The present study demonstrated that PEA in rats promoted: IR; dyslipidemia; increased concentrations of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) and decreased plasma concentrations of melatonin and IL-10 (anti-inflammatory). Furthermore, a lower JNK phosphorylation was observed in the CNMEL and PEAMEL group compared to the PEA group in the EDL. MEL supplementation in rats with PEA promoted improvement in IR, in total cholesterol concentrations, in plasma concentrations of TNF- α , IL-10 and melatonin. However,

there were no changes in the degree of phosphorylation of pp185 in tyrosine and Akt in serine; gene expression of glucose transporter protein (GLUT4) and IRS1; IKK α / β ; NFkB p65 and NFkB p50 in both tissues.

Key Words: Periapical Periodontics. Melatonin. Insulin Resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma do delineamento do período experimental	32
Figura 2 - Análise histológica da região periapical	43
Figura 3 - Massa corpórea.....	44
Figura 4- Ingestão alimentar e hídrica	45
Figura 5- Avaliação do grau de fosforilação de pp185 em tirosina (pTyr).	47
Figura 6- Avaliação do grau de fosforilação de AKT em serina.....	47
Figura 7 - Avaliação do grau de fosforilação da IKK α / β em tecido muscular extensor digital longo (EDL) (A e B) e esquelético sóleo (MS)	50
Figura 8 - Avaliação do grau de fosforilação da NFkB p65 em tecido muscular extensor digital longo (EDL) (A e B) e esquelético sóleo (MS) (C e D).....	51
Figura 9 - Avaliação do grau de fosforilação da NFkB p50 em tecido muscular extensor digital longo (EDL) (A e B) e esquelético sóleo (MS) (C e D).....	51
Figura 10 - Avaliação da expressão gênica da proteína transportadora de glicose GLUT4 (Slc2a4) em tecido muscular extensor digital longo (EDL) (A) e esquelético sóleo (MS)	53
Figura 11 -- Avaliação da expressão proteica da proteína transportadora de glicose GLUT4 (Slc2a4) em tecido muscular extensor digital longo (EDL)	54
Figura 12 - Avaliação da expressão gênica de IRS1 em tecido muscular extensor digital longo (EDL) (A e B) e esquelético sóleo (MS)	54

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Glicemia, insulinemia e índice HOMA-IR	45
Tabela 2- Concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 e melatonina....	46
Tabela 3 - Concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, colesterol-VLDL e triglicerídeos.	48

LISTA DE ABREVIATURA

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-γ: Interferon gama
IKK: Complexo IκB quinase
IL-1: Interleucina 1
IL-10: Interleucina 10
IL-1β: 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
IRβ: Subunidade β do receptor de insulina
IκB: Inibidor de proteínas κB

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- κ B
NF- κ 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 α : Coativador-1 α 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 poli(acrilamida 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- α : 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
µg: Micrograma
µUI: Microunidades internacionais cromossomo X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS GERAIS	30
2.1 Objetivos específicos.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Animais.....	31
3.2 Delineamento experimental	31
3.3 Coleta de Sangue.....	32
3.4 Indução da periodontite apical	33
3.5 Administração de melatonina	33
3.6 Coleta das mandíbulas para análise histológica das periodontites apicais	34
3.7 Análise histológica das lesões periapicais.....	34
3.9 Avaliação da glicemia, insulinemia e resistência insulínica (HOMA-IR).....	35
3.10 Avaliação das citocinas inflamatórias e melatonina	35
3.11 Avaliação do perfil lipídico	36
3.11.1 Avaliação das concentrações plasmáticas de triglicérides.....	36
3.11.2 Avaliação da concentração plasmática de colesterol total.....	36
3.11.3 Avaliação da concentração plasmática de colesterol HDL.....	37
3.12 Avaliação (IKK, JNK, NF- κ B p65 e NF- κ B p50) em músculo sóleo e músculo extensor digital longo 37	
3.12.1 Preparação das amostras para a técnica de “Western blotting”	37
3.13 Metodologia de quantificação da expressão gênica por meio da técnica de “PCR em tempo real” 39	
3.14 Análise Estatística.....	41
4 RESULTADOS	43
4.1. Avaliação histológica da região periapical	43
4.2 Avaliação da massa corpórea.....	44
4.3 Avaliação da ingestão alimentar e hídrica	44
4.4 Avaliação da glicemia, insulinemia e HOMA-IR.....	45
4.5 Avaliação das concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias e melatonina.....	46
4.6 Avaliação da via de sinalização insulínica (pp185 e Akt) em MS e EDL.....	46
4.7 Avaliação do perfil lipídico	48
4.8 Avaliação da fosforilação de JNK em EDL e MS.....	49

4.9 Avaliação da fosforilação de IKK α/β em EDL e MS	50
4.10 Avaliação da via inflamatória (p-NFkB p65 e p-NFkB p50) em MS e EDL.....	51
4.11 Expressão gênica de GLUT4.....	53
4.12 Expressão gênica de IRS1	54
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

A associação entre inflamação oral e saúde sistêmica tornou-se um assunto de grande interesse para a comunidade médica e odontológica (TIBURCIO-MACHADO et al., 2021)

A periodontite apical (PEA), patologia semelhante à doença periodontal (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 (1965), que avaliou animais comuns e germ-free, a periodontite apical 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, no 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 (PGs) (CYMERMAN et al., 1984; METZGER, 2000; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998).

Inicialmente, ocorre contaminação predominantemente por microrganismos aeróbios facultativos e, após mudança microbiana devido ao ambiente pulpar, predominam os microrganismos anaeróbios gram-negativos (SUNDQVIST, 1992). A parede celular desses microrganismos possui endotoxina denominada lipopolissacarídeos (LPS) (PÅLSSON-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 (PMNs) (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- γ , os quais possuem papel importante no recrutamento e ativação de macrófagos, enquanto que 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, 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 foram 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 à insulina (ASTOLPHI, 2013), que está relacionada com o Diabetes mellitus tipo II (DM2).

Em tecidos sensíveis à insulina, este 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 PI3K e ativa a subunidade p110 catalítica. Isto conduz à ativação proteína quinase B (PKB/Akt) e fosforilação do seu substrato, AS160, ocasionando a translocação de GLUT4 para

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 resistência insulínica na PEA. Em nossos estudos anteriores (PEREIRA et al., 2017) demonstrou-se 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 TLRs, 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 α/β , que promovem ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e proteína ativadora 1 (AP-1) (OHNISHI; MUROI; TANAMOTO, 2007; PÅLSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2004).

O NF- κ B regula a expressão de diversos genes envolvidos em diferentes processos celulares, como respostas inflamatórias e imunes, crescimento e desenvolvimento celular. Esta proteína está presente no citoplasma na forma inativa associada a uma proteína inibidora, a I κ B (NAPETSCHNIG; WU, 2013). A ativação do NF- κ B pode ocorrer, não somente por exposição das células à LPS, mas também por meio da ação de citocinas inflamatórias (TNF- α 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 κ B quinase (IKK) é fosforilado e ativado. O complexo IKK é composto por duas subunidades catalíticas, IKK- α e IKK- β , além do modulador essencial NF- κ B (NEMO) ou IKK- α/β (LI; VERMA, 2002). Após ativação, IKK recruta e fosforila o I κ B que é reconhecido pelo maquinário ubiquitina ligase, o que leva à sua poliubiquitinação e consequente degradação. Desta maneira, os dímeros de NF- κ 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). A família NF- κ B em células de mamíferos é um complexo homo ou heterodimérico formado pelas proteínas RelA (p65) contendo o domínio semelhante a Rel, RelB, NF- κ B1/p105, NF- κ B1/p50, c-Rel, NF- κ B /p52 e NF- κ B 2/p100. A forma heterodimérica p50/p65 é a mais comum (OECKINGHAUS et al. 2009; FURUYA et al., 2013). Ademais, recentemente foi demonstrado que a região promotora do gene Slc2a4 (que codifica o transportador de glicose GLUT4) apresenta sequências (-134/-112 e -82/-60 no gene do camundongo) às quais tanto a subunidade p50 como a p65 do NF- κ B são capazes de se ligar e agir como repressor direto da atividade transcricional do Slc2a4, ocasionando a diminuição da expressão de GLUT4 (FURUYA et al., 2013; SILVA, 2013).

Estudos mostraram que infecções resultam em um estado de resistência à insulina 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- α ; 2) reduzir o grau de fosforilação em tirosina do receptor insulínico em tecido adiposo branco, 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 resistência insulínica nestes animais (ASTOLPHI, 2013; PEREIRA et al., 2017). Adicionalmente, a associação de doenças periodontais e pulpares com diabetes aumenta os níveis de triglicérides 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, este 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 resistência insulínica envolve o aumento da produção compensatória de insulina pelas células β pancreáticas. Porém, com a progressão desta condição, a produção de insulina diminui, devido ao aumento na demanda secretória, e ocorre falência das células β pancreáticas. Dessa forma, a secreção de insulina torna-se insuficiente para compensar a resistência à insulina (PRADHAN; GOEL, 2011).

Sabendo que a PEA pode ocasionar a resistência à insulina, vários compostos com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes [REF] ocasionaram a diminuição da RI. Um candidato que exhibe essas propriedades é a melatonina (MEL) (SZEWCZYK-GOLEC et al., 2017).

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 focou seus estudos nessa molécula.

Em todos os animais, a MEL é sintetizada principalmente na glândula pineal durante o período escuro do ciclo circadiano. Apresenta as concentrações mais altas de secreção à noite, na maioria das espécies (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2014), informando ao organismo que é escuro e 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 e células da medula óssea, como plaquetas e linfócitos (PANDI-PERUMAL et al., 2006). 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 (AANAT), 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; SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

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; PARDRIDGE; MIETUS, 1980) 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; SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003)

A luminosidade pode inibir a produção de MEL via pineal (CIPOLLANETO; 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 β 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- κ 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 α 1, ROR α 2, RZR α e RZR β (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; PANDI- PERUMAL et al., 2008).

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 AMPc (CAROCCI; CATALANO; SINICROPI, 2014), seguido por diminuição da atividade da 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, a regulação dos ciclos circadianos (MANTOVANI et al., 2006), do ciclo sono/vigília, da temperatura 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 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), por exemplo, o aumento noturno de MEL prejudica a migração e aderência dos leucócitos da corrente sanguínea às camadas endoteliais e

estimula os linfócitos T auxiliares a produzirem interleucina (IL) 2 noturna, exercendo um efeito imunomodulador (MARKUS et al., 2007).

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) α , bloqueiam a produção noturna de MEL por meio da via NF- κ B. O estudo de Da Silveira Cruz- Machado et al. (2010) verificou que a ativação dos receptores TLR4 / CD14 pelo LPS induz a translocação nuclear dos dímeros p50 / p50 e p50 / pRELA NF κ B, que leva à expressão de TNF em pinealócitos, regulação positiva de receptor 1 de TNF (TNFR1) nestas células e a inibição da via biossintética da melatonina. Esta inibição ocorre por meio da inibição da transcrição gênica de AA- NAT (uma enzima chave na síntese de melatonina) pelo TNF- α (FERNANDES et al., 2006). O incremento da melatonina, 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 IL-2 pelos linfócitos T auxiliares, exercendo um efeito imunoestimulador. Por outro lado, a liberação de TNF- α a partir de macrófagos ativados suprime o aumento noturno da melatonina, permitindo uma migração celular completa e inibindo a produção de IL-2. Em sequência, as células mononucleares e polimorfonucleares ativadas produzem melatonina 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- α é seguida pela recuperação do aumento noturno da melatonina e produção de IL-2 (MARKUS et al. 2007).

A MEL pode se ligar em receptores de membrana acoplados a proteína G de células imunocompetentes (POON et al. 1994; MAESTRONI, 1995). Os linfócitos CD4⁺ são células mais responsivas à MEL do que os linfócitos CD8⁺, devido a presença de maior número de sítios de ligação para este hormônio. A MEL aumenta a produção de interleucina-2 (IL-2) e interferon-gama (IFN-g) 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- α , melhora na sensibilidade à insulina e no perfil lipídico em ratos pinealectomizados com DP.

A MEL exerce efeitos regulatórios sobre a secreção de insulina pelas células β 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, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicérides, promovendo o aumento das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (AGIL et al., 2011; ALÂ et al., 2017; KADHIM; ALJAWAD; HASHIM, 2014). Adicionalmente, a MEL mostrou-se eficiente no controle tanto da reabsorção óssea alveolar como da concentração plasmática de TNF- α 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 através de sua atividade anti-inflamatória.

Considerando a relação entre processos inflamatórios orais e a resistência à insulina 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 GERAIS

Avaliar, em ratos com periodontite apical, os efeitos do tratamento com melatonina sobre via insulínica, vias inflamatórias, reabsorção óssea e infiltrado inflamatório em hemimandíbulas direitas.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar em ratos com periodontite apical submetidos ou não ao tratamento com melatonina:

- 1) histologia das hemimandibulas direitas;
- 2) concentração plasmática de melatonina;
- 3) glicemia;
- 4) insulinemia;
- 5) Concentração plasmática de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL6, IL10 e IL1 β);
- 6) grau de fosforilação de IKK, JNK, ERK ½ NF- B p65 e NF- B p50 em MS e EDL;
- 7) 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), músculo extensor digital longo (EDL);
- 8) expressão gênica de GLUT4 e IRS-1 em MS e EDL;
- 9) Perfil lipídico (colesterolemia e triacilgliceridemia).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 72 animais (*Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar) machos com 60 dias de idade oriundos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA – Unesp. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e humidade com variação do ciclo claro-escuro de 12/12 horas (período claro iniciado às 7:00 h). Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética local de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal e sua implementação foi aprovada pela Comissão de Ética do Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp/FOA - CEUA - Protocolo FOA nº 00072-2021 (ANEXO-1).

3.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em quatro grupos: a) ratos controle (CN); b) ratos controle administrados com MEL (CNMEL); c) ratos com PEA induzida em primeiros e segundos molares inferiores do lado direito (PEA); d) ratos com PEA induzida em primeiros e segundos molares inferiores do lado direito tratados com MEL (PEAMEL).

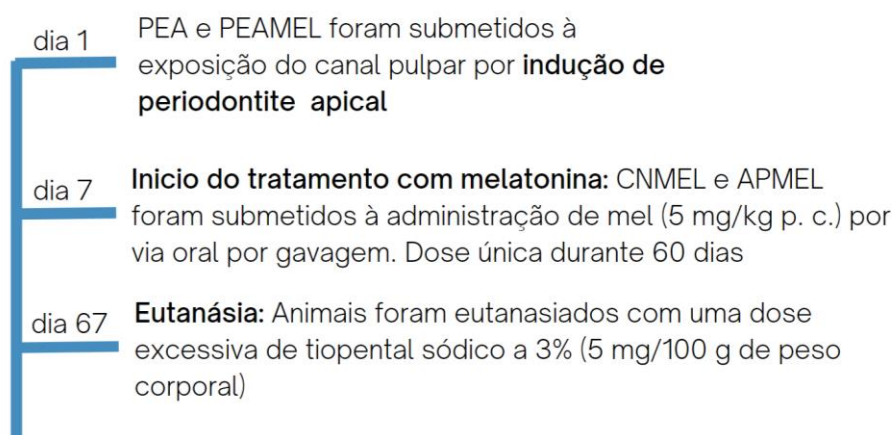
Aos 2 meses de vida, os animais dos grupos PEA foram submetidos à indução das PEAs, utilizando a metodologia descrita por Tsosura et al. (2019). Após sete dias da indução das PEAs, os grupos CNMEL e PEAMEL foram submetidos à administração de MEL (5 mg/kg p. c.) via oral por meio de gavagem. Salientamos que a MEL foi ministrada diariamente em dose única durante 60 dias.

As PEAs foram realizadas sob anestesia com cloridrato de quetamina (80 mg/Kg p.c., i.m.) e xilazina (10 mg/Kg p.c., i.m.) e empregando-se uma broca de aço carbono (Broca Ln Long NeckMaillefer, Dentsply) dotada de uma esfera na extremidade com 0,1 mm de diâmetro. A permanência da abertura é o método mais utilizado para o desenvolvimento de periodontites apicais. Diariamente foram avaliados a ingestão de ração e o peso corporal dos ratos.

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, Brasil,

3%, 5 mg/100 g p. c., i. p.) precedidos pela aplicação de anestésico de bloqueio regional/local (Lidocaína, 4 mg/kg p. c., i. p.), 10 minutos antes da aplicação do barbitúrico. A eutanásia dos animais ocorreu entre 19 h e 20 h.

Figura 1- Fluxograma do delineamento do período experimental



Fonte: do autor

3.3 Coleta de Sangue

Um grupo de ratos CN, CNMEL, PEA e PEAMEL (n = 10 animais por grupo) foi submetido a laparotomia mediana para a colheita de sangue (4 mL) pela veia cava inferior. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados (BV Vacutainer, Flanklin Lakes, NJ, EUA) e centrifugadas a 3000 × g por 15 minutos a 4° C.

O plasma obtido foi armazenado a -80° C para avaliações bioquímicas das concentrações plasmáticas melatonina, glicemia, insulinemia, concentração plasmática de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-1 β), colesterolemia e triacilgliceridemia. Ademais, destes mesmos animais foram coletados os tecidos (MS e EDL) para avaliação da expressão gênica de GLUT4 e do IRS-1. Após este procedimento, os animais foram eutanasiados por dose excessiva do anestésico tiopental sódico (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP, Brasil; 3%, 150 mg/100 g p. c., i. p.).

Em outro grupo de ratos CN, CNMEL, PEA e PEAMEL (n = 8 animais por grupo) foram coletadas 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 e 90 s para o MS). Salientamos que para analisar o grau de fosforilação de IKK, JNK, NF-κB p65 e NF-κB p50 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, Itapira/SP, Brasil; 3%, 150 mg/kg p. c., i. p.).

3.4 Indução da periodontite apical

Os animais do grupo CN, PEA, CNMEL E PEAMEL foram anestesiados com associação de cloridrato de Quetamina (10%, 80mg/kg de peso corpóreo, intraperitoneal) e Xilazina (2%, 10 mg/kg de peso corpóreo, intramuscular, e a periodontite apical (PA) foi induzida por meio de orifício realizado em 1º e 2º molar superior direito e inferior direito com auxílio de broca em aço carbono (Broca Long Neck - Maillefer, Dentsply, Terezópolis, RJ, Brasil) dotada de esfera na extremidade com 0,1mm de diâmetro, acoplada à caneta de baixa. Ressaltamos que a exposição pulpar realizada por meio da abertura da cavidade pulpar com brocas, geralmente não induz à dor. A permanência da abertura é o método mais utilizado para o desenvolvimento da PA.

3.5 Administração de melatonina

Os animais dos grupos CNMEL e PEAMEL receberam MEL (Melatonin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) via oral por meio de gavagem. Salientamos que a MEL foi ministrada em dose única (5 mg/kg de peso corpóreo; volume de 0,2 mL de MEL), diariamente às 19:00 durante 60 dias. Os animais não tratados (CN e PEA)

receberam a solução salina via oral por meio de gavagem, seguindo os mesmos critérios para os animais tratados (PALIN et al., 2018).

Todos os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (4 animais por caixas). Salientamos que não optamos por deixar os ratos em gaiolas individuais devido ao estresse que isto pode ocasionar, pois vários trabalhos demonstram isto (MANOUZE et al., 2019).

A MEL (0,5g) foi inicialmente diluída em 1 mL de etanol absoluto, adicionando 49 ml de água para um volume final de 50mL. A quantidade a ser administrada por animal foi dependente do peso de cada um.

3.6 Coleta das mandíbulas para análise histológica das periodontites apicais

Após a eutanásia, foram removidas as mandíbulas do lado direito e as mesmas 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. Após, as peças foram desmineralizadas em solução de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) a 10%. Posteriormente, as hemimandíbulas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A orientação no momento da inclusão permitirá a realização de cortes teciduais do alvéolo em seu sentido longitudinal englobando o tecido periapical a ser avaliado. Após inclusão, as peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 5 µm de espessura, realizados em micrótomo.

3.7 Análise histológica das lesões periapicais

Para a análise histológica foram empregadas, para cada grupo, 2 lâminas com 3 cortes teciduais cada, preparadas e coradas com hematoxilina e eosina (Lillie, 1954). Os resultados foram expostos por meio de duas análises, sendo uma descritiva e outra qualitativa/quantitativa. As lâminas contendo os cortes representativos de cada espécime foram avaliadas sob a microscopia óptica e utilizadas na análise descritiva, que consistirá na descrição dos fenômenos histopatológicos, procurando caracterizá-los globalmente em função das variáveis experimentais (Cintra et al., 2016).

3.9 Avaliação da glicemia, insulinemia e resistência insulínica (HOMA-IR)

A glicemia foi analisada pelo método enzimático glicose-oxidase (Análisa Diagnóstica, São Paulo, Brasil) e a amostra de plasma (n=10) foram utilizadas para avaliação da insulinemia, esta foi avaliada pelo método Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) com a utilização de kit, seguindo as instruções do fabricante (Sensitive Rat Insulin, SRI-13K, Millipore, St Charles, MO, EUA).

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

3.10 Avaliação das citocinas inflamatórias e melatonina

As concentrações das citocinas (IL-6, IL-10 e TNF- α) presentes no plasma foram mensuradas por meio de ensaios enzimáticos (ELISA), utilizando-se kits comerciais (INVITROGEN Corporatio, Camirillo, CA, USA) com concentrações mínimas detectáveis respectivas (12.00 pg/mL; 1.5 pg/mL; 4 pg/mL) seguindo as recomendações do fabricante. As leituras das reações colorimétricas foram realizadas a 450 nm em leitor de microplacas (EPOCHH, Bio Tek Instruments, Inc, Hinghland Park, Winooski, USA). As concentrações plasmáticas citocina analisada foi determinada a partir dos valores obtidos com a curva padrão realizada com as diferentes diluições da proteína recombinante. A concentração de melatonina presentes no plasma foi mensurada por meio do método de ensaio enzimáticos (ELISA), utilizando-se kit comercial (MyBioSource, San Diego, CA, EUA) com concentrações mínimas detectáveis (7,813-500pg/ml), seguindo as recomendações do fabricante. A placa de microtitulação fornecida neste kit (Rat MT, #MBS764385) foi pré-revestida com melatonina (MEL). Durante a reação, a MEL da amostra ou padrão compete com uma quantidade fixa de MEL no suporte da fase sólida para locais no Anticorpo de Detecção Biotinilado específico para MEL. O excesso de conjugado e amostra ou padrão não ligado foi lavado da placa e "HRP-Streptavidin" (SABC) foi adicionada a cada poço da microplaca e incubada. Em seguida, a solução de substrato TMB foi adicionada a cada poço. A reação enzima-substrato foi terminada pela adição

de uma solução de ácido sulfúrico e a mudança de cor foi medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 450 nm.

3.11 Avaliação do perfil lipídico

3.11.1 Avaliação das concentrações plasmáticas de triglicérides

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

3.11.2 Avaliação da concentração plasmática de colesterol total

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

3.11.3 Avaliação da concentração plasmática de colesterol HDL

Este é um método enzimático específico para quantificação de colesterol HDL (C-HDL) (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil). O conjunto Colesterol HDL é um sistema que se destina à separação do colesterol ligado à fração HDL no plasma sanguíneo. A mistura ácido fosfotúngstico/cloreto de magnésio precipita os 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 (C-HDL) 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.

3.12 Avaliação (IKK, JNK, NF- κB p65 e NF-κB p50) em músculo sóleo e músculo extensor digital longo

3.12.1 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-RadProteinAssay - Bio-RadLaboratories, Hercules, USA), e para estoque em tampão desenvolvido por Laemmli (azul de bromofenol 0,1 %; SDS 10 %; fosfato de sódio 1 M, pH 7,0; glicerol 50 %; DTT 15 %)

- “SDS-PAGE” - (“Sodium Dodecil Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis”): A primeira etapa do Western blotting consistirá 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 geis 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 manterá as porções superiores e inferiores do gel em contato com um tampão de corrida (Tris 50 mM; glicina 375 mM; SDS 0,1%; EDTA 1,8 mM). No gel de “stacking” foram aplicadas as amostras solubilizadas em tampão de “Laemmli”. Imediatamente antes da aplicação, as amostras foram fervidas por 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 ocorra o empacotamento da amostra, o que pode ser observado na transição dos geis. Posteriormente foi aplicada voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante 2 h. Juntamente com as amostras, sempre foi colocado um padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (Amersham ECL Full-Range Rainbow, GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA).

- **Transferência eletroforética:** Após a separação das frações proteicas no gel de poli(acrilamida), foi feita a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose HybondC Super (GE Healthcare Buckinghamshire, Germany). A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 2 h, a 4° C, utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,02%).

- **“Immunoblotting”:** Após a transferência eletroforética, foi iniciado o processo de imunodeteção de proteínas específicas (KRUGER; HAMMOND, 1988). As membranas de nitrocelulose foram, primeiramente, incubadas na presença de solução bloqueadora (solução basal [SB] - NaCl 150 mM; Tris 10 mM; “Tween” 20 0,02%; pH 7,2 - acrescida de 5% de leite desnatado - 0% de gordura) durante 2 h à temperatura ambiente, e então, 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 α/β , anti p-IKK- α/β , anti NF- B

p65, anti p-NF- B p65, anti p-NF- B p50 e anti NF- B p50. Todos os anticorpos foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA. Posteriormente foram realizadas três lavagens com SB, e as membranas foram incubadas durante 1 h com segundo anticorpo contendo peroxidase de “horseradish” (kit de quimioluminescência – ECL – GE Healthcare Buckinghamshire, Germany). Novamente, foram realizadas 3 lavagens da membrana de nitrocelulose com SB, com duração de 10 min cada lavagem. Após estes procedimentos, as membranas foram levadas até uma câmara escura, onde foi adicionado 1 mL de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL), e foram incubadas por 1 minuto. Por fim, foi drenado o excesso de reagente e as membranas de nitrocelulose foram expostas a filme de RX (Hyperfilm ECL – GE Healthcare Buckinghamshire, Germany), durante 10 min em temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR) e solução fixadora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR). A intensidade dos “blots” foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se um programa Scion Image (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, USA).

3.13 Metodologia de quantificação da expressão gênica por meio da técnica de “PCR em tempo real”

3.13.1 Extração e quantificação do RNA total e transcrição reversa

A extração de RNA total tecidual foi realizada por meio da adição do reagente Trizol LS (Invitrogen, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para isso, após remoção do tecido, estas amostras permaneceram armazenadas a -80 °C até o início dos experimentos. No momento do experimento estas amostras foram adicionados 1000 µL do reagente Trizol LS (Invitrogen), homogeneizamos e foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck, Germany) em cada amostra. Os tubos foram vigorosamente agitados por 30 segundos, e logo após, mantidos em repouso à temperatura ambiente, por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4°C e 13000 G, por 15 minutos. Novos tubos foram nomeados de acordo com as amostras, e ao fim da centrifugação coletamos cerca de 300 µL da fase aquosa e colocamos no novo tubo. Em seguida, adicionamos nestes novos tubos 500 µL de álcool isopropílico (Merck), agitamos novamente e armazenamos à -20 °C. No dia seguinte, descongelamos estas amostras e centrifugaremos a 4°C e 13000G por 15 minutos, depois retiramos o álcool

isopropílico, acrescentamos então 500µL de etanol 75% (Merck), agitamos e centrifugamos a 4°C e 10000 G por 10 minutos. Em seguida desprezamos o sobrenadante e colocamos os tubos com a borda virada para baixo em uma superfície coberta com papel absorvente, quando os tubos estavam secos nós desvirmos e acrescentamos 20 µL de água DEPC para ressuspender o pellet. Por fim as amostras foram armazenadas à -80°C para posterior quantificação.

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por leitura em espectrofotômetro aplicando-se 1 µL de cada amostra num dispositivo Nanodrop® (ThermoScientific, Wilmington, EUA). Foram consideradas as leituras nos comprimentos de onda de 280 e 260 nm. A concentração das amostras foi fornecida pelo equipamento em ng/µL.

A transcrição reversa das amostras de RNA em cDNA foi realizada por meio do kit comercial (SuperScript® II First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR, Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. A quantidade de RNA total de partida foi definida com base no volume máximo de amostra recomendado pelo fabricante (12 µL) multiplicado pela concentração da amostra que obtiver menor rendimento.

3.13.2 PCR quantitativo

A expressão quantitativa do RNAm para os diferentes alvos foi realizada por meio de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema Taqman® (AppliedBiosystems, Life Technologies, EUA) em um aparelho Step One™ Real-Time PCR System (AppliedBiosystems, Life Technologies, United Kingdom). Para esta reação foram utilizadas sondas inventoriadas marcadas com fluoróforo FAM disponibilizados pela mesma empresa: GLUT4 (Slc2a4 (GLUT4) - Rn01752377_m1) e IRS-1 (Rn02132493_s1). Paralelamente, também foi realizado a amplificação do gene constitutivo com sonda inventoriada, marcada com o fluoróforo VIC, disponibilizada pela mesma empresa: β-actina (Actb -Rn00667869_m1). Alíquotas de 0,5 µL do DNA complementar sintetizado a partir do RNAm foram utilizadas juntamente com reagentes Taqman® Gene Expression Mastermix (AppliedBiosystems, Life Technologies, EUA), e as sondas inventoriadas como determinado pelo fabricante, num volume final de reação de 10 µL. A reação de amplificação compreendeu 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, e quarenta ciclo de 15 s a 95 °C a 1 min e 60 °C, conforme recomendado pela empresa. Os resultados foram

analisados com base no valor de Ct (ciclethreshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclo a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. As médias dos valores de Ct de medidas em duplicatas foram utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, com normalização em relação ao controle interno (β -actina), e então comparadas com um controle alvo interno de uma amostra do grupo de células não estimuladas obtendo-se assim o cálculo do aumento da expressão, utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Uma amostra negativa (água), também foi submetida à reação.

3.14 Análise Estatística

Todos os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e apresentados na forma de tabelas e gráficos. A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) de dois fatores seguido pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações. Para os resultados na forma de escores e para as variáveis quantitativas que não seguirem uma distribuição normal foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$) e os testes foram realizados utilizando o Software GraphPad Prisma 7.

4 RESULTADOS

4.1. 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. 1).

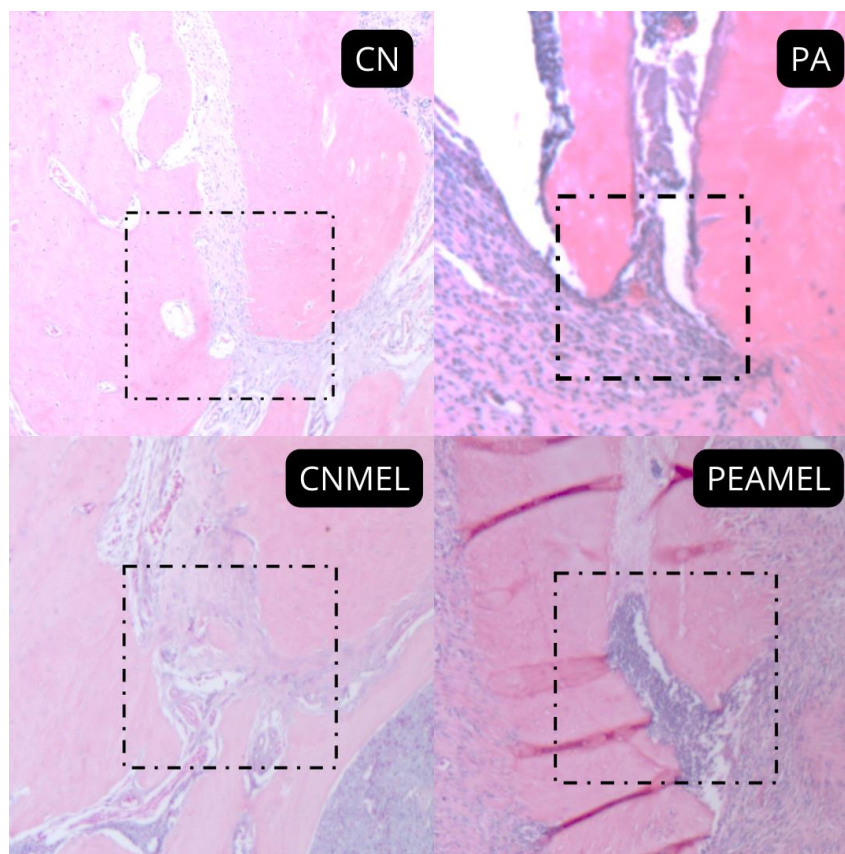


Figura 2 - Análise histológica da região periapical após 60 dias de exposição pulpar. Os grupos CN e CNMEL apresentaram região periapical livre de infiltrado inflamatório; o grupo AP e APMEL apresentou infiltrado inflamatório moderado ao redor do ápice, ruptura do ligamento periodontal e área de reabsorção óssea. Aumento de 400x.

4.2 Avaliação da massa corpórea

As massas corpóreas (Figura 2) dos grupos CN, PEA, CNMEL E PEAMEL foram avaliadas semanalmente, desde a indução das PEA até o final da manutenção dos animais. Os resultados demonstram que não houve diferença estatística significativa na massa corpórea entre os grupos.

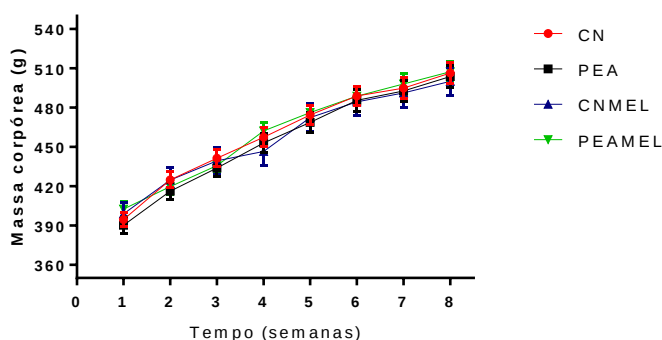


Figura 3 - Massa corpórea semanal dos grupos controle (CN), periodontite apical (PEA) grupo controle suplementados com melatonina (CNMEL) e PEA suplementados com melatonina (PEAMEL). Parâmetros avaliados desde a indução das PEA até o final da manutenção dos animais. Os valores são expressos como média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

4.3 Avaliação da ingestão alimentar e hídrica

A ingestão alimentar (Figura 3A) e ingestão hídrica (3B) dos grupos CN, PEA, CNMEL E PEAMEL foram avaliadas semanalmente, a partir da indução das PEA até o final da manutenção dos animais. Os resultados demonstram que não houve diferença estatística significativa na ingestão alimentar e hídrica entre os grupos

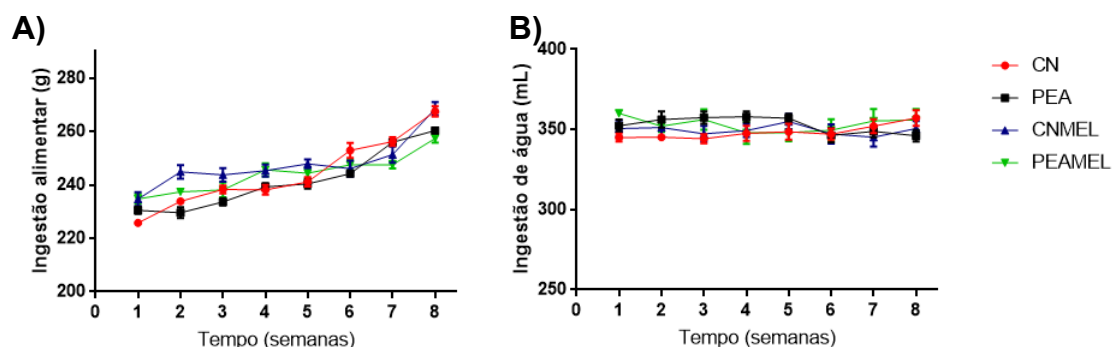


Figura 4 – A) Média da ingestão alimentar semanal; periodontite apical (PA) grupo controle suplementados com melatonina (CNMEL) e PEA suplementados com melatonina (PEAMEL). Parâmetros avaliados desde a indução das PEA até o final da manutenção dos animais. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM de 18 animais por grupo.

4.4 Avaliação da glicemia, insulinemia e HOMA-IR

Não houve diferenças significativa nos valores de glicemia entre os grupos estudados. Entretanto, o grupo PEA apresentou aumento de insulinemia e HOMA-IR em comparação aos demais grupos. O tratamento com melatonina reverteu essas alterações.

Tabela 1 - Glicemia, insulinemia e índice HOMA-IR

Parâmetros	CN	PEA	CNMEL	PEAMEL
Glicemia (mmol/L)	5,88 $\pm$ 0,29 ^a	5,99 $\pm$ 0,18 ^a	5,02 $\pm$ 0,29 ^a	5,56 $\pm$ 0,45 ^a
Insulina (μ U/mL)	51,23 $\pm$ 10,07 ^a	176,7 $\pm$ 21,87 ^b	74,72 $\pm$ 13,58 ^a	87,28 $\pm$ 11,54 ^a
HOMA-IR	13,12 $\pm$ 2,37 ^a	46,76 $\pm$ 5,55 ^b	16,71 $\pm$ 3,15 ^a	22,04 $\pm$ 4,43 ^a

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

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

4.5 Avaliação das concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias e melatonina

Houve aumento da concentração de TNF- α , IL-6 e IL-1 β no grupo AP em relação ao grupo controle e o tratamento com melatonina reverteu essa alteração apenas em relação ao TNF- α e IL-1 β .

O grupo AP apresentou diminuição na concentração de IL-10 em relação aos demais grupos e o tratamento com melatonina reverteu essa alteração.

O grupo AP apresentou a menor concentração plasmática de melatonina e o tratamento com MEL aumentou essa concentração, porém foi menor em relação aos controles.

Ressaltamos que mesmo nos grupos C, o tratamento com melatonina provocou diminuição de IL-1 β e aumento de IL-10 em relação ao C não tratado, demonstrando que mesmo no grupo controle, o tratamento com melatonina promove melhora desses parâmetros. (Tabela 2)

Tabela 2 - Concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 e melatonina

Parâmetros (pg/mL)	CN	PEA	CNMEL	PEAMEL
TNF- α	9,32 $\pm$ 0,11 ^a	10,27 $\pm$ 0,34 ^b	9,28 $\pm$ 0,18 ^a	9,75 $\pm$ 0,17 ^a
IL-6	3,54 $\pm$ 0,03 ^a	3,74 $\pm$ 0,06 ^b	3,60 $\pm$ 0,03 ^a	3,66 $\pm$ 0,03 ^{a,b}
IL-1 β	13,38 $\pm$ 0,90 ^a	17,46 $\pm$ 0,93 ^b	9,49 $\pm$ 0,33 ^c	12,66 $\pm$ 1,04 ^{a,c}
IL-10	10,29 $\pm$ 1,41 ^a	4,91 $\pm$ 0,60 ^b	15,69 $\pm$ 0,81 ^c	12,76 $\pm$ 1,99 ^{a,c}
Melatonina	215,60 $\pm$ 6,86 ^a	106,20 $\pm$ 5,42 ^b	232,60 $\pm$ 11,93 ^a	166,20 $\pm$ 9,39 ^c

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

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

4.6 Avaliação da via de sinalização insulínica (pp185 e Akt) em MS e EDL

Não houve diferença significativa no grau de fosforilação de pp185 em tirosina e de Akt em serina e pp185 em tirosina em MS e EDL.

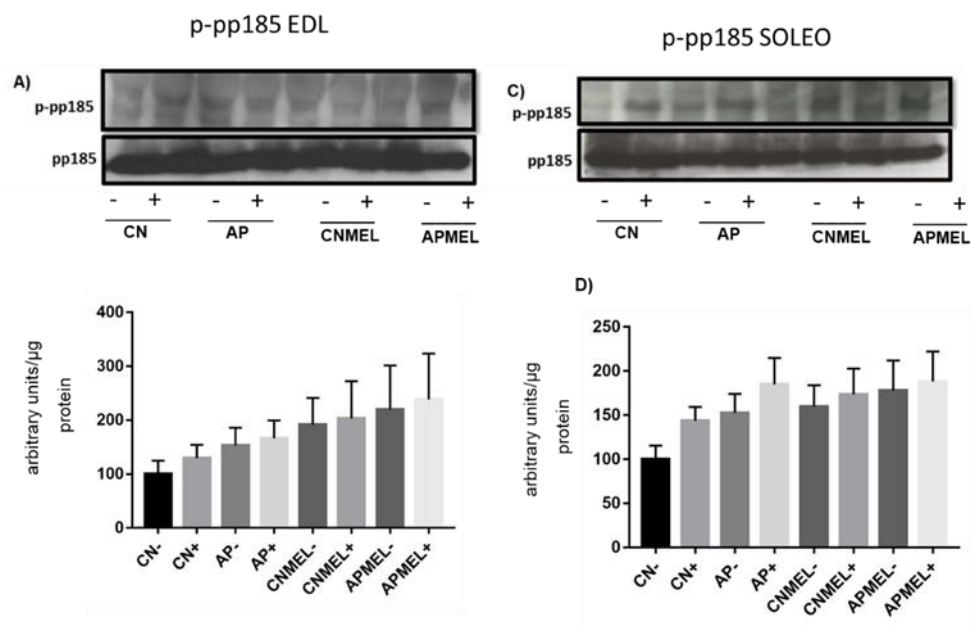


Figura 5 - Avaliação do grau de fosforilação de pp185 em tirosina (pTyr) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em tecido muscular esquelético sóleo (MS) (A e B) e extensor digital longo (EDL) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). Em A e C, autoradiografia típica: quantidades iguais de proteína (185 μg) foram submetidas a SDS-PAGE. Pp185 total e akt total foram utilizados 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 (+).

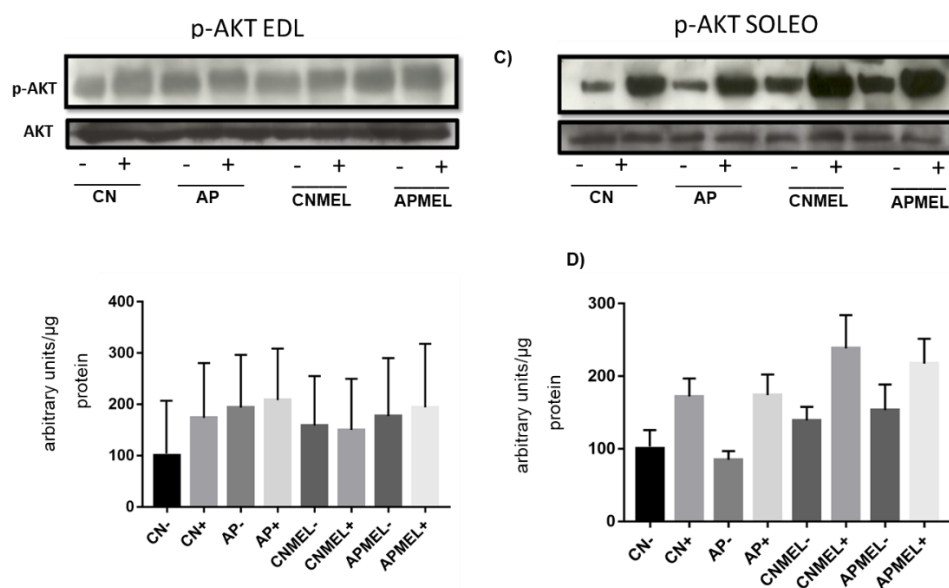


Figura 6 - Avaliação do grau de fosforilação de AKT em serina antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em tecido muscular esquelético sóleo (MS) (A e B) e extensor digital longo (EDL) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) 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. Pp185 total e akt total foram utilizados 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 (+).

4.7 Avaliação do perfil lipídico

O grupo PEA apresentou aumento de CT e LDL quando comparado aos grupos controle e o tratamento com melatonina reverteu apenas os valores de CT.

Em relação ao HDL, não houve diferença significativa entre os grupos.

Não há diferença de VLDL e triglicerídeos entre CN e PEA e entre seus respectivos grupos de tratamento com melatonina (Tabela 3).

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

Parâmetros (mg/dL)	CN	PEA	CNMEL	PEAMEL
Colesterol total	53,75 ± 2,66 ^a	71,57 ± 1,37 ^b	60,97 ± 2,46 ^a	64,06 ± 3,44 ^a
C-HDL	37,08 ± 2,35 ^a	30,84 ± 2,10 ^a	38,19 ± 2,28 ^a	31,58 ± 0,98 ^a
C-LDL	19,79 ± 1,78 ^a	29,86 ± 2,97 ^b	18,79 ± 1,07 ^a	24,41 ± 1,56 ^{a,b}
C-VLDL	8,22 ± 0,43 ^{a,b}	9,33 ± 0,53 ^b	6,77 ± 0,87 ^a	7,49 ± 0,64 ^{a,b}
Triglicérides	41,11 ± 2,15 ^{a,b}	46,67 ± 2,65 ^b	33,84 ± 1,70 ^a	37,46 ± 3,21 ^{a,b}

Valores são apresentados como média ± EPM (n = 10 animais por grupo). *Mesmas letras sobrescritas indicam que não houve diferença estatística entre os grupos.

4.8 Avaliação da fosforilação de JNK em EDL e MS

Observamos menor fosforilação de JNK no grupo CNMEL e PEAMEL em comparação ao grupo PEA no EDL (fig. 5A e B). Entretanto, não houve diferença nesse parâmetro entre os grupos no MS.

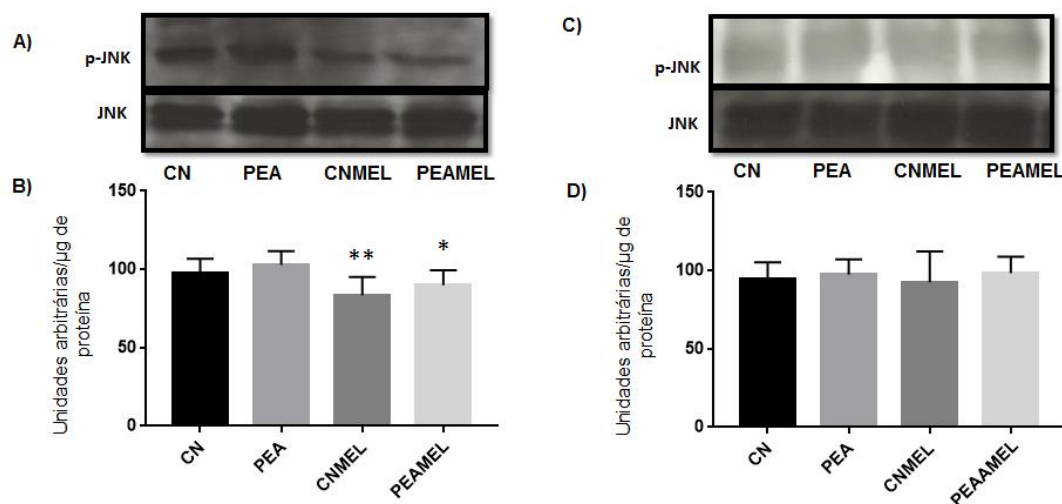


Figura 5 - Avaliação do grau de fosforilação da JNK em tecido muscular extensor digital longo (EDL) (A e B) e esquelético sóleo (MS) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). 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 ± EPM, n=8 para EDL e n=6 para MS. * $p < 0,05$ PEA vs. PEAMEL; ** $p < 0,01$ PEA vs. CNMEL.

4.9 Avaliação da fosforilação de IKK α / β em EDL e MS

Não houve diferença no grau de fosforilação de IKK α / β entre os grupos nos tecidos analisados. (Figura 7)

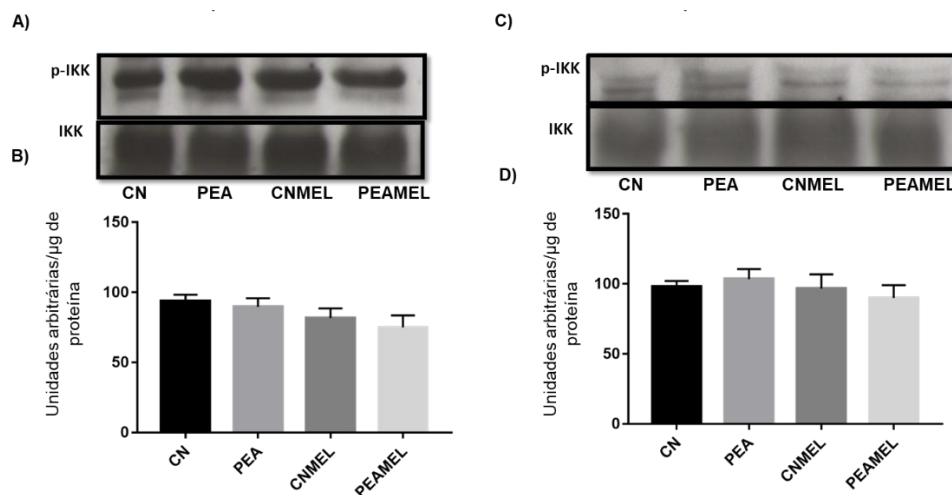


Figura 7 - Avaliação do grau de fosforilação da IKK α / β em tecido muscular extensor digital longo (EDL) (A e B) e esquelético sóleo (MS) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). Em A e C, auto-radiografia típica: quantidades iguais de proteína (185 μ g) foram submetidas a SDS-PAGE. IKK α / β foi utilizada como controle. Em B e D, valores do grau de fosforilação da proteína IKK α / β , expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ EPM, n=8 para EDL e n=6 para MS.

4.10 Avaliação da via inflamatória (p-NFkB p65 e p-NFkB p50) em MS e EDL

Não houve diferença na fosforilação de NFkB-p65 e NFkB-p50 entre os grupos em ambos os tecidos (Figura 8 e 9).

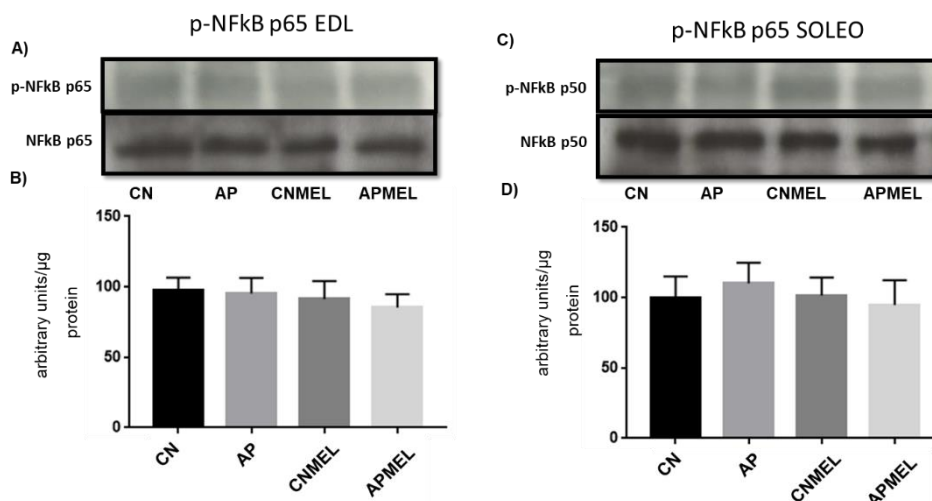


Figura 8 - Avaliação do grau de fosforilação da NFkB p65 em tecido muscular extensor digital longo (EDL) (A e B) e esquelético sóleo (MS) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). Em A e C, auto-radiografia típica: quantidades iguais de proteína (185 µg) foram submetidas a SDS-PAGE. NFkB p65 foi utilizada como controle. Em B e D, valores do grau de fosforilação da proteína NFkB p65, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=8.

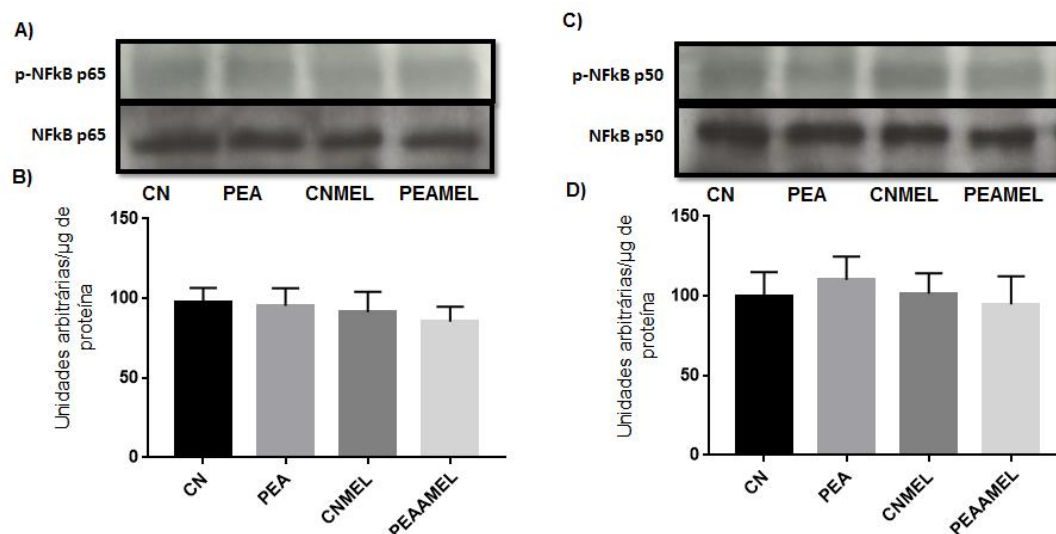
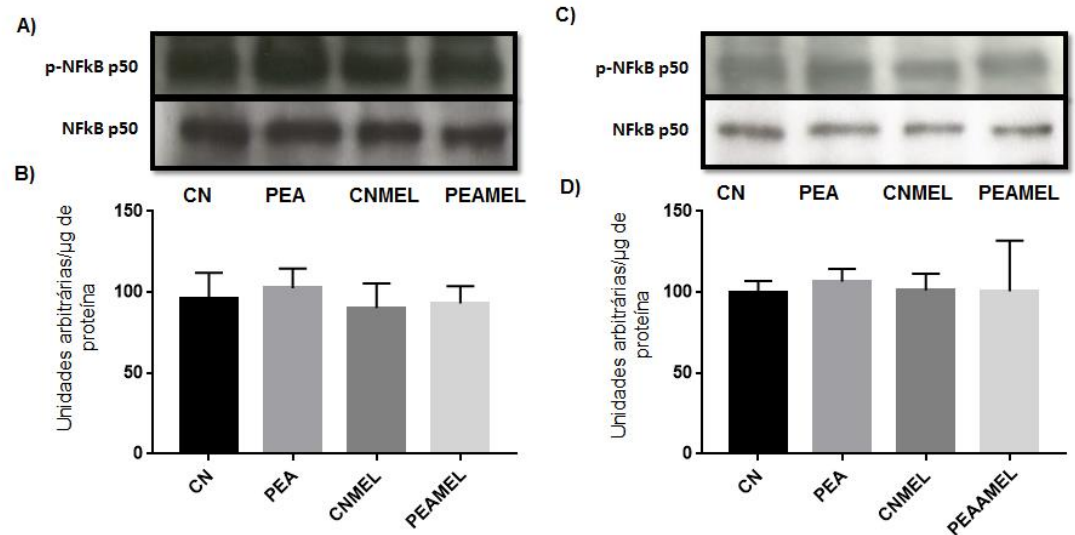


Figura 9 - Avaliação do grau de fosforilação da NFkB p50 em tecido muscular extensor digital longo (EDL) (A e B) e esquelético sóleo (MS) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). Em A e C, auto-radiografia típica: quantidades iguais de proteína (185 µg) foram submetidas a SDS-PAGE. NFkB p50 foi utilizada como controle. Em B e D, valores do grau de fosforilação da proteína NFkB p50, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ EPM, n=8 para EDL e n=7 para MS.



4.11 Expressão gênica de GLUT4

Não houve diferença entre os grupos na expressão gênica da proteína transportadora de glicose (GLUT4).

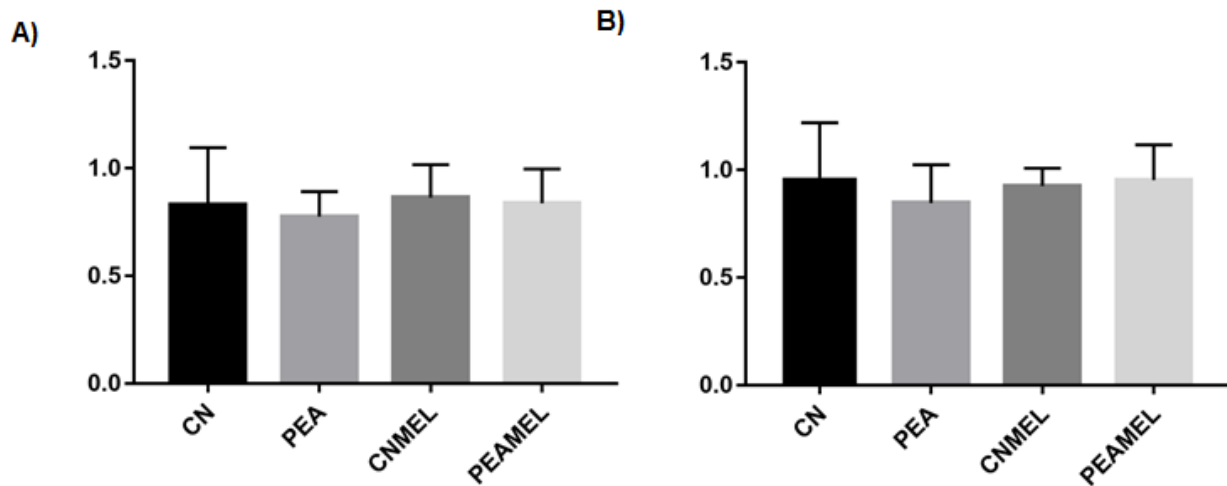


Figura 10 - Avaliação da expressão gênica da proteína transportadora de glicose GLUT4 (Slc2a4) em tecido muscular extensor digital longo (EDL) (A) e esquelético sóleo (MS) (B) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM, n=5.

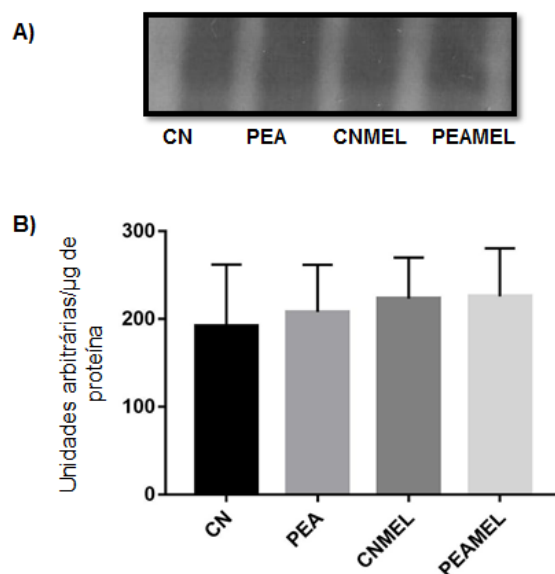


Figura 11 - Avaliação da expressão proteica da proteína transportadora de glicose GLUT4 (Slc2a4) em tecido muscular extensor digital longo (EDL) (A e B) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM, $n=5$.

4.12 Expressão gênica de IRS1

Não houve diferença entre os grupos na expressão gênica de IRS1.

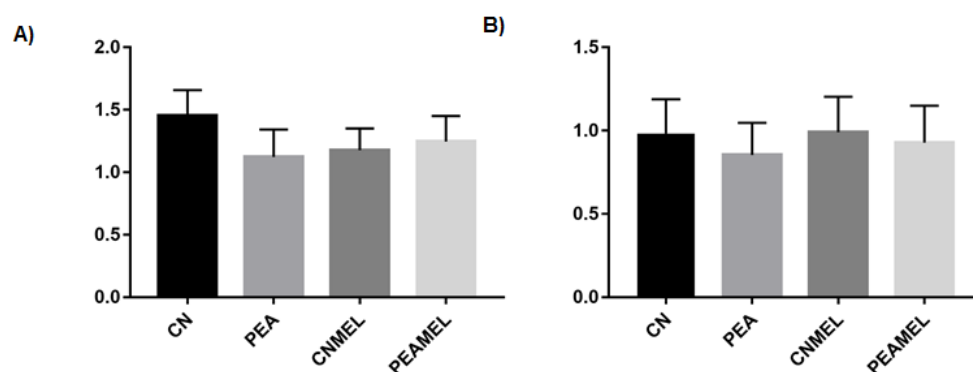


Figura 12 - Avaliação da expressão gênica de IRS1 em tecido muscular extensor digital longo (EDL) (A e B) e esquelético sóleo (MS) (C e D) de ratos controle (CN), ratos com periodontite apical (PEA), ratos controle suplementados com melatonina (CNMEL) e ratos com PEA suplementados com MEL (PEAMEL). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM, $n=5$.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a AP em ratos promoveu: RI, dislipidemia, aumento das concentrações plasmáticas de insulina e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) e diminuição das concentrações plasmáticas de melatonina e IL-10. O tratamento com MEL em ratos com PA promoveu redução da insulinemia, RI, CT, TNF- α , IL-1 β e aumento da concentração plasmática de MEL e IL-10. Não houve alteração no grau de fosforilação de pp185 em tirosina, Akt em serina; NFkB p65 e NFkB p50 e IKK em ambos os tecidos. Contudo, houve uma diminuição no grau de fosforilação de JNK em EDL, mas sem alterações em MS. Não houve alteração da expressão gênica de GLUT4 e IRS-1.

Os resultados referentes a ingestão alimentar e peso corpóreo foram similares entre os grupos avaliados. Em vista disso, nossos estudos demonstraram que 8 semanas de tratamento com melatonina não promoveu alterações nesses parâmetros. Por outro lado, Buonfiglio et al. (2018) demonstrou que o tratamento com MEL em animais pinealectomizados, após 13 semanas, reduziu tanto a ingestão alimentar como o peso corporal. Esses autores sugerem que esses resultados devam ser decorrentes da ação desse hormônio no hipotálamo, promovendo a diminuindo da expressão de neuropeptídeos orexigênicos como, o peptídeo relacionado ao *Agouti* (AgRP) e orexina. Ademais, a MEL também regula a expressão do gene da pró-opiomelanocortina (POMC) hipotalâmico (RASMUSSEN et al. 2003), podendo exercer um efeito anorexigênico direto. Essa divergência entre os nossos resultados e de Buonfiglio e colaboradores (2018) pode ser em decorrência da diferença do tempo de tratamento com MEL utilizado por esses autores e o nosso trabalho, assim podemos inferir que 8 semanas de tratamento não foram suficientes para promover alterações nesses parâmetros.

No presente estudo, não verificamos diferenças estatísticas na glicemia entre os grupos. Por outro lado, observou-se que o grupo PEA apresentou uma maior insulinemia e o tratamento com MEL reverteu este parâmetro. Este mesmo resultado foi observado com relação a HOMA-IR. Os estudos de Astolphi et al. (2013) e Pereira et al. (2017) também verificaram que ratos com PEA apresentam aumento na insulinemia e em resistência a insulina. Ademais, Dos Santos et al. (2018) observou

que a suplementação de melatonina em ratos com DP e/ou pinealectomizados promoveu melhora nos parâmetros de insulinemia e sensibilidade à insulina.

Nossos resultados demonstram que houve aumento do colesterol total e do LDL, sendo que a melatonina reverteu apenas os valores do colesterol total. Kantar et al., (2018) demonstraram que MEL administrado por 8 semanas não reduziu significativamente a concentração de TG, C-VLDL, C-HDL e CT em ratos com síndrome metabólica. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças estatísticas em relação a C-HDL e C-LDL em pacientes com esteato-hepatite não alcoólica tratados com MEL. Por outro lado, no estudo de Agil et al. (2011) demonstraram que a suplementação de MEL em ratos foi capaz de reduzir TG e C-LDL e aumentar C-HDL, mas não teve efeito sobre CT. Em uma meta-análise, o MEL mostrou ter um efeito benéfico em TG e CT, mas não em relação ao C-HDL e C-LDL dos participantes. Neste estudo, uma diminuição na concentração de TG foi observada apenas em doses de MEL ≥ 8 mg/dia ou quando os tratamentos duraram 8 ou mais semanas. Além disso, as concentrações de colesterol total também foram significativamente reduzidas apenas em doses de MEL ≥ 8 mg/dia e quando as concentrações basais eram iguais ou superiores a 200 mg/dL.

Observamos que a concentração plasmática de TNF- α , IL-6 e IL-1 β foram maiores no grupo PEA. Além disso, foi observada diminuição significativa de IL-10 no grupo PEA em comparação aos demais grupos. Nossos resultados corroboram com os estudos de outros autores que demonstraram que a periodontite promoveu aumento de citocinas inflamatória, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (AKUTAGAWA et al., 2019; DE MOLON et al., 2018) e menor concentração da citocina anti-inflamatória, a IL-10 (BI et al., 2019). Carrillo-Vico et al. (2005) 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- α , 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- α (BAZYAR et al., 2019). Assim como não foram observadas diminuição da concentração de IL-1 β 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.

No presente estudo, que não houve diferença no grau da fosforilação de pp185 e Akt e expressão gênica de GLUT4 em tecido muscular entre os grupos avaliados. Similarmente ao presente estudo, Dos Santos et al. (2018) não observaram aumento na fosforilação de Akt em serina, após o estímulo insulínico, no músculo, fígado e TABP 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 dieta hiperlipídica (SARTORI et al., 2009) e em fígado de ratos idosos (MENDES et al., 2013) após administração de MEL. Por outro lado, outros autores observaram os efeitos benéficos da MEL sobre a sinalização insulínica em células musculares esqueléticas (TEODORO et al., 2014) e in vitro (QUAN et al., 2015). Quan e colaboradores (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.

Com o intuito de averiguar os mecanismos envolvidos na RI em ratos com PEA, foi realizada análise da via inflamatória. Os resultados demonstraram que não houve diferença no grau de fosforilação de IKK α / β no tecido muscular EDL e sóleo. Entretanto, os resultados do estudo de Pereira et al. (2017) mostraram que houve aumento no grau de fosforilação de IKK α / β no tecido muscular gastrocnêmio de ratos com PEA. Nesse sentido, podemos inferir que a discordância dos resultados pode ser em decorrência do tipo de musculo estudado. Por outro lado, observamos menor fosforilação de JNK no grupo CNMEL e PEAMEL em comparação ao grupo PEA no EDL. Sabe-se que a MEL tem ação anti-inflamatória e seus efeitos inibitórios sobre o NF- κ 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 κ B; bloqueou a produção muscular esquelética de mediadores nocivos envolvidos no processo inflamatório (ALONSO; COLLADO; GONZÁLEZ-GALLEGU, 2006). No estudo de Chuffa et al. (2015), a MEL foi capaz de atenuar a via IKK- α , I κ B, NF- κ B, IFN- β , TNF- α 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- κ B/p-IKK β , TNF- α , IL-1 β e COX2 e prevenindo a neurodegeneração em ratos.

Os resultados do presente estudo demonstraram que uma inflamação localizada, como a periodontite apical, pode promover: RI, dislipidemia, aumento das citocinas inflamatórias e alterações nas vias inflamatórias em ratos. E o tratamento com melatonina foi capaz de reverter essas alterações. Em vista disso, podemos sugerir que a MEL possa ser um importante adjuvante terapêutico para evitar as alterações sistêmicas promovidas pela PEA.

6 CONCLUSÃO

A melatonina promoveu efeitos anti-inflamatórios, anti-hiperlipidêmicos e melhorou a sensibilidade à insulina em ratos com PEA, podendo ser utilizada como método preventivo e/ou terapêutico nas alterações locais e sistêmicas causadas pela PEA.

REFERÊNCIAS

ABBAS; LICHTMAN. *Imunologia Básica*. 3ª Edição. 2009.

ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and molecular life sciences*, v. 71, n. 16, p. 2997-3025, 2014.

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. *Journal of pineal research*, v. 50, n. 2, p. 207-212, 2011.

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. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 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 Journal of Pharmaceutical Sciences* (P-ISSN: 1683-3597, E-ISSN: 2521-3512), v. 15, n. 1, p. 27- 32, 2017.

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.

ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

ANHÊ, G. F. et al. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. *Journal of neurochemistry*, v. 90, n. 3, p. 559-566, 2004.

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.

ARENDT, J. et al. Immunoassay of 6-hydroxymelatonin sulfate in human plasma and urine: abolition of the urinary 24-hour rhythm with atenolol. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 60, n. 6, p. 1166-1173, 1985.

ASTOLPHI, R. D. Avaliação do sinal insulínico em ratos adultos com lesão periapical. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

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-κB and IκB proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*, v. 14, n. 1, p. 649-681, 1996.

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

BARKHORDAR, R. A.; HUSSAIN, M. Z.; HAYASHI, C. Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 73, n. 3, p. 334-336, 1992.

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. *Journal of pineal research*, v. 40, n. 1, p. 1-9, 2006.

BERGENHOLTZ, G.; NAGAOKA, S.; JONTELL, M. Class II antigen presenting cells in experimentally induced pulpitis.

International endodontic journal, v. 24, n. 1, p. 8-14, 1991.

BERTOLINI, D. R. et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors.

Nature, v. 319, n. 6053, p. 516, 1986.

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. *International journal of molecular sciences*, 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.

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

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.

BUBENIK, G. A. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Digestive diseases and sciences*, 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. *Journal of dental research*, 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. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 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. *Clinical pharmacology: advances and applications*, 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. *Journal of pineal research*, v. 39, n. 4, p. 400-408, 2005.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 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 patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery*, 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. *Clinical oral investigations*, v. 17 n. 6, p. 1595-1599, 2013.
- CINTRA, L. T. et al. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. *Journal of endodontics*, v. 42, n. 5, p. 747-751, 2016.
- CINTRA, L. T. et al. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. *International endodontic journal*, v. 47, n. 3, p. 228-237, 2014.
- CIPOLLA-NETO, J. et al. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *Journal of pineal research*, v. 56, n. 4, p. 371-381, 2014.
- CIPOLLA-NETO, J.; AFECH, S. C. Glândula Pineal: in Aires, M. M. *Fisiologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1046-1053, 2012.
- CUTANDO, A. et al. A. Effect of topical application of melatonin on serum levels of C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF α) in patients with type 1 or type 2 diabetes and periodontal disease. *Journal of clinical and experimental dentistry*, v. 7, n. 5, e628-33, 2015.
- CYMERMAN, J. J., et al. Human T lymphocyte subpopulations in chronic periapical lesions. *Journal of endodontics*, n. 10, v. 1, p. 9-11, 1984.
- DA SILVA CRUZ-MACHADO, S. et al. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NF κ B pathway. *Journal of pineal research*, 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. *Pharmacology & therapeutics*, v. 69, n. 1, p. 15-36, 1996.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- DODD, D. Z.; ROWE, D. J. The relationship between postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. *American Dental Hygienists Association*, v. 87, n. 6, p. 336-344, 2013.
- 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 in Pharmacological Sciences*, 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 research*, 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. *Medical Science Monitor*, v. 12, n. 9, p. 307-312, 2006.
- ERREN, T. C.; REITER, R. J. Melatonin: a universal time messenger. *Neuroendocrinology Letters*, 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 α on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: Basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. *Journal of pineal research*, 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. *Chronobiology International*, 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. *Clinical chemistry*, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.
- GARCIA, R. A. P. et al. Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. *Life sciences*, v. 82, n. 1, p. 108-114, 2008.
- GARFIN, D. E. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods in enzymology*, 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. *Journal of periodontology*, v. 73, n. 1, p. 73-78, 2002.
- GENOVESE, T. et al. Melatonin limits lung injury in bleomycin treated mice. *Journal of pineal research*, 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. *Journal of endodontics*, v. 15, n. 1, p. 20-26, 1989.
- HARDELAND, R. et al. Melatonin — A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in Neurobiology*, 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- κ B by TNF Family Cytokines. *Semin Immunol*. v. 26, n. 3, p. 253-266, 2014.
- 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- κ 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. *Journal of pineal research*, v. 42, n. 3, p. 267-71, 2007. IKEGAMI K et al. Interconnection between circadian clocks and thyroid function. *Nat Rev Endocrinol*. 2019.
- ISHIMI, Y. et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *The Journal of Immunology*, v. 145, n. 10, p. 3297- 3303, 1990.
- 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.
- JAWOREK, J. et al. Pinealectomy aggravates acute pancreatitis in the rat. *Pharmacological Reports*, v. 62, n. 5, p. 864-873, 2010. JIN, X. et al. Targeted disruption of the mouse Mel1b melatonin receptor. *Molecular and cellular biology*, v. 23, n. 3, p. 1054-1060, 2003.
- JONTELL, M. et al. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 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 Journal of Medical Sciences*, v. 12, n. 1, p. 72-77, 2014.
- 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. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 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 Radical Biology and Medicine*, 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. *Molecular endocrinology*, v. 27, n. 8, p. 1217-1233, 2013.
- KARAASLAN, C.; SUZEN, S. Antioxidant properties of melatonin and its potential action in diseases. *Curr Top Med Chem*, v. 15, n. 9, p. 894-903, Feb 2015
- 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. *Journal of Endodontics*, v. 22, n. 6, p. 311-316, 1996.
- KIM, M. H. et al. Glutamate transporter-mediated glutamate secretion in the mammalian pineal gland. *Journal of Neuroscience*, 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. *Journal of endodontics*, 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. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 349, n. 2, p. 128-137, 2012.
- KOSE, O. et al. Effects of Melatonin on Oxidative Stress Index and Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats With Periodontitis. *Journal of periodontology*, v. 87, n. 5, p. e82-e90, 2016.
- 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 125 I-labeled protein A. In: WALKER, J. M. *New Protein Techniques*. New Jersey: 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. *Journal of the American Chemical Society*, v. 80, n. 10, p. 2587, 1958.
- LEWY, A. J. Clinical applications of melatonin in circadian disorders. *Dialogues in clinical neuroscience*, v. 5, n. 4, p. 399, 2003. LI, Q.; VERMA, I. M. NF-kb regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 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. *Immunity & Ageing*, v. 2, n. 1, p. 8, 2005.
- LILLIE, R. D. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. New York, Blakinston, 2 ed, 501fls, 1954.
- LIMA, F. B. et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 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. MAESTRONI GJ. T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res.*, v. 18, n. 1, p. 84-9, 1995.
- MAESTRONI GJ. The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. *J Photochem Photobiol.*, v. 43, n. 3, p. 186-92, 1998.

- MALDONADO, M. D. et al. Possible involvement of the inhibition of NF- κ 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. *Journal of Pineal Research*, v.41, n. 4, p. 382-389, 2006.
- MANOUZE et al. Effects of single cage housing on stress, cognitive and seizure parameters in the rat and mouse pilocarpine models of epilepsy. *eNeuro*, v. 6, n. 4, 2019.
- MARANI, F. EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA NA REMODELAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM RATOS PINEALECTOMIZADOS COM DOENÇA PERIODONTAL. 2018. 65f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.
- MARIE HANSEN, A.; HELENE GARDE, A.; HANSEN, J. Diurnal urinary 6-sulfatoxymelatonin levels among healthy Danish nurses during work and leisure time. *Chronobiology International*, 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.
- MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 1, n. 2, p. 135, 2001.
- 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.
- 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.
- METZGER, Z. Macrophages in periapical lesions. *Dental Traumatology*, 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*. *Journal of pineal research*, 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 Radical Biology & Medicine*, v. 21, n. 2, 241-249, 1996.
- MIZRAK, B. et al. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on rat hearts. *Acta histochemica*, v. 106, n. 1, p. 29-36, 2004. MOORE, R. Y.; LENN, N. J. A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, v. 146, n. 1, p. 1-14, 1972.
- 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.
- MURPHY, P. J.; MYERS, B. L.; BADIA, P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs alter body temperature and suppress melatonin in humans. *Physiology & behavior*, 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- κ B signaling. *Annual review of biophysics*, v. 42, p. 443-468, 2013.
- NELSON, R. J.; DRAZEN, D. L. Melatonin mediates seasonal changes in immune function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 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.
- 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. *Clinical Endocrinology*, 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 Immunology & Medical Microbiology*, v. 51, n. 1, p. 84-91, 2007.
- PAJU, S.; SCANNAPIECO, F. A. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral diseases*, v. 13, n. 6, p. 508-512, 2007.
- PALIN, L. P. et al. Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats. *Journal of Applied Oral Science*, v. 26, 2018.
- PÅLSSON-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? *The FEBS journal*, 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. *Nature Reviews Neurology*, 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. *Journal of pineal research*, v. 8, n. 2, p. 179-192, 1990.
- PARDRIDGE, W. M.; MIETUS, L. J. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *Journal of neurochemistry*, v. 34, n. 6, p. 1761-1763, 1980.
- PELICIARI-GARCIA, R. A. et al. Leptin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. *BioMed research international*, v. 2013, 2013.
- PERALDI, P.; XU, M.; SPIEGELMAN, B. M. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor- α -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. *Journal of endodontics*, 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. *Neuroendocrinology Letters*, v. 24, n. 1/2, p. 33-38, 2003.

- POON AM, LIU ZM, PANG CS, BROWN GM, PANG SF. Evidence for a direct action of melatonin on the immune system. *Biol Signals.*, v. 3, n. 1, p. 107-17, 1994.
- PRADHAN, S.; GOEL, K. Interrelationship between diabetes and periodontitis: a review. *JNMA; journal of the Nepal Medical Association*, v. 51, n. 183, p. 144-153, 2011.
- 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. *Biochemical and biophysical research communications*, 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. *International journal of biometeorology*, 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 Journal of Neuroscience*, v. 120, n. 9, p. 583-590, 2010.
- SANCHEZ-HIDALGO, M. et al. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Experimental gerontology*, v. 44, n. 5, p. 328-334, 2009.
- Santos RMD 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.
- SARITEKIN E, ÜREYEN KAYA B, AŞCI H, ÖZMEN Ö. Anti-inflammatory and antiresorptive functions of melatonin on experimentally induced periapical lesions. *Int Endod J*, 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.
- 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. *Journal of pineal research*, v. 36, n. 3, p. 212-216, 2004.
- SEYMOUR, G. J. et al. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 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. *Pharmacological Reviews*, 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.

SRINIVASAN, V. et al. Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicity Research*, v. 7, n. 4, p. 293-318, 2005. STASHENKO, P. et al. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 78, n. 4, p. 494-502, 1994.

STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, v. 9, n. 4, p. 498-521, 1998.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. *Journal of endodontics*, 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. *The Journal of Immunology*, v. 169, n. 1, p. 10-14, 2002.

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

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

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

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. *Journal of endodontics*, v. 4, n. 6, p. 167-177, 1978.

WARFVINGE, J.; DAHLEN, G.; BERGENHOLTZ, G. Dental pulp response to bacterial cell wall material. *Journal of dental research*, 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, Mar. 2008.

WIESENBERG, I. et al. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR α by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Research*. 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 Research, v. 68, n. 2, p. 103-113, 2006.

ZANUTO, R. et al. Melatonin improves insulin sensitivity independently of weight loss in old obese rats. *Journal of Pineal Research*, 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.

ANEXOS

ANEXO A - Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO 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 **"Avaliação da sensibilidade à insulina, concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias, perfil lipídico e vias insulínica e inflamatória em ratos com periodontite apical tratados com melatonina"**, Processo FOA nº 0072-2021, sob responsabilidade de Dóris Hissako Matsushita apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 04 de Março de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 03 de Julho de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 03 de Agosto de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Assessment of insulin sensitivity, plasma concentrations of inflammatory cytokines, lipid profile and insulin and inflammatory pathways in rats with apical periodontitis treated with melatonin"**, Protocol FOA nº 0072-2021, under the supervision of Dóris Hissako Matsushita presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 04, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 03, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 03, 2022.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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

ANEXO B

COMPROVANTE DE ENVIO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO QUALIS
CAPES A1 (CBII)

Life Sciences
Melatonin treatment improves insulin sensitivity, lipid profile and reduced inflammatory cytokines in rats with apical periodontitis.
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Article Type:	Research paper
Keywords:	periapical periodontics; melatonin; inflammation; inflammatory cytokines; insulin resistance
Corresponding Author:	NUBIA RAMOS CARVALHO São Paulo State University Faculty of Dentistry BRAZIL
First Author:	NUBIA RAMOS CARVALHO
Order of Authors:	NUBIA RAMOS CARVALHO Thais Veronica Saori Tsosura Maria Sara de Lima Coutinho Mattara Bianca Elvira Belardi Rodrigo Martins dos Santos Lara Teschi Bravo Ana Carla Thalez Yamabuchi Nobumoto Giovanna Mendes Gomes da Silva Fernando Yamamoto Chiba Doris Hissako Matsushita
Abstract:	Aims To evaluate in rats with apical periodontics the effects of melatonin treatment on glycemia, insulinemia, HOMA-IR, lipid profile, insulin pathway, inflammatory pathways and cytokines. Main methods Seventy-two 60-day-old Wistar rats were randomly distributed into 4 groups (n=18): a) control (CN); b) CN with MEL (CNMEL); c) apical periodontics (AP); d) AP with MEL (APMEL). The AP were induced at 60 days of age in the right upper first molars. After induction of AP, mel (5 mg/kg) was administered orally by gavage for 60 days. After 60 days, the following parameters were evaluated: plasma concentrations of glucose, insulin, TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-10 and inflammatory pathway (NF-κB p50 and p65) and insulin pathway (pp185 and AKT) in the sorus and long digital extensor muscles. Key findings AP was associated with increased pro-inflammatory cytokines TNF-α, IL-6 and IL-1β, increased cholesterol (LDL and VLDL), triglycerides, insulinemia and insulin sensitivity HOMA-IR, in addition to the decrease in anti-inflammatory cytokines IL-10, melatonin and cholesterol-HDL. AP did not show significant results on insulin and inflammatory pathways. Significance Melatonin treatment demonstrated anti-inflammatory and anti-hyperlipidemic effects and improved insulin sensitivity in rats with AP.
Suggested Reviewers:	Gestter William Lattari Tessarin gestter_william@hotmail.com

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation
 e.involno@unesp.br