



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

LARA TESCHI BRAVO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MELATONINA NO
SINAL INSULÍNICO E ESTRESSE OXIDATIVO EM
RATOS COM PERIODONTITE APICAL SUBMETIDOS
À INALAÇÃO PASSIVA DE TABACO**

**Araçatuba
2022**

LARA TESCHI BRAVO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MELATONINA NO
SINAL INSULÍNICO E ESTRESSE OXIDATIVO EM
RATOS COM PERIODONTITE APICAL SUBMETIDOS
À INALAÇÃO PASSIVA DE TABACO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Ciência Odontológica”.

Orientadora: Profa. Titular Dóris Hissako Matsushita

Coorientadores: Prof. Associado Eloi Dezan Junior e Prof. Associado Luciano Tavares Angelo Cintra

**Araçatuba
2022**

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

B826a Bravo, Lara Teschi.
Avaliação do efeito da melatonina no sinal insulínico e estresse oxidativo em ratos com periodontite apical submetidos à inalação passiva de tabaco / Lara Teschi Bravo. - Araçatuba, 2023 63 f. : il. ; tab., graf.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Dóris Hissako Matsushita
Coorientador: Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra
Coorientador: Prof. Eloi Dezan Júnior

1. Melatonina 2. Tabaco 3. Periodontite periapical
4. Resistência à insulina 5. Estresse oxidativo I. T.

Black D24
CDD 617.67

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, **Marcelo Bravo** e **Isabel Bravo** e à minha amiga **Bianca Elvira Belardi**, sem o apoio, ajuda e incentivo de vocês esse trabalho não seria possível.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos, sem os quais não teria se tornado uma realidade.

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

Agradeço imensamente a minha família: minha mãe **Isabel Bravo**, meu pai **Marcelo Bravo**, aos meus irmãos, **Lohan e Lanna**, as minhas sobrinhas, **Laura e Liz**, e ao meu namorado **Pedro Yudi**, que estiveram ao meu lado em todos os momentos desta jornada, acreditando no meu potencial para a realização dos meus sonhos.

Ao **Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra**, pela colaboração científica, pela indução da periodontite apical e por ter cedido os equipamentos necessários para realização de parte deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Endocrinologia e de Endodontia, mestrandos, doutorandos e pós doutorandos: **Maria Sara de Lima Coutinho Mattera, Thais Verônica Saori Tsosura, Rodrigo Martins dos Santos, Bianca Elvira Belardi, Nubia Ramos Carvalho, Ana Carla Thalez Ywabuchi Nobumoto, Mariana Justo, Bharbara Moura, Juliana Goto, Bianca Piovezan, Cristiane Cantiga, Pedro Chaves, Ana Cláudia Rodrigues, Thalya Maltarollo, Romulo Sales e Ana Maria Vasques** e aos alunos de iniciação científica: **Ana Carolina Carnevali, Nicolle Carvalho, Ana Flavia Hernandez, Letícia Trabalon, Julia Ogata Santelli, Nayara Gabriely Dourado e Heloisa Macedo Sampaio**, pelos ensinamentos, pelos bons momentos compartilhados, pelas risadas, pela compreensão e pelo imenso apoio que foi dado por todos vocês durante minha trajetória. Muito obrigada a todos! Foi e sempre será uma honra fazer parte dessa equipe.

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

Ao coordenador geral do programa de Pós-Graduação em Ciências, **Juliano Pelim Pessan**, e ao vice coordenador, **Rogério Jacinto Castilho**, pela excelente coordenação do programa e apoio constante aos alunos.

Aos professores membros da banca do Exame Geral de Qualificação, **Prof. Rogério Jacinto Castilho e Prof. João Eduardo Gomes Filho**, pelas pertinentes sugestões realizadas durante meu exame de qualificação, propiciando o engrandecimento desta dissertação.

Aos membros titulares e suplentes da Banca Examinadora de Defesa da Dissertação: **Prof. Paulo Tambasco de Oliveira, Profa. Roberta Okamoto, Prof. Fernando Yamamoto Chiba e Maria Sara de Lima Coutinho Mattera**, pela gentileza e presteza em aceitar o convite de participação em minha banca.

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

Aos **colegas do curso** de pós-graduação em Ciências Fisiológicas e de Ciências da Faculdade de Odontologia de Araçatuba / UNESP, pelo coleguismo.

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

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

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

Aos funcionários da Biblioteca, **Ana Claudia Martins Grieger**

Manzatti, Claudio Hideo Matsumoto, Ana Paula Rimoli de Oliveira, Denise Haruyo Nakamura, Maria Claudia de Castro Benez e Luis Claudio Sedlacek, por sempre estarem dispostos a nos ajudar.

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

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

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

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

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

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro (Código de Financiamento 001), o qual foi imprescindível para a execução do projeto de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- processo 2022/04868-4)**, pelos recursos financeiros necessários para a realização da nossa pesquisa.

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

A todos, muito obrigada!

O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem!

“Guimarães Rosa”

BRAVO, L. T. Avaliação do efeito da melatonina no sinal insulínico e estresse oxidativo em ratos com periodontite apical submetidos à inalação passiva de tabaco. 2022. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araçatuba 2022.

RESUMO

A periodontite apical (PA) e o tabagismo podem estar associados com a síndrome metabólica, diabetes *mellitus*, alteração do sinal insulínico e resistência insulínica (RI). A melatonina (MEL) é um hormônio com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e com participação na remodelação óssea. Estudos anteriores mostram que a MEL melhora a sensibilidade à insulina e sinalização insulínica no músculo esquelético de ratos com PA. Nesse contexto, hipotetizamos que as alterações metabólicas em ratos com PA sejam mais pronunciadas com à inalação passiva de tabaco e a administração de MEL possa prevenir ou diminuir estas alterações. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade à insulina, estresse oxidativo e via de sinalização insulínica no músculo esquelético de ratos adultos com PA submetidos à inalação passiva do tabaco. Foram utilizados 128 ratos Wistar com 60 dias de idade distribuídos em 8 grupos: controle (CN); ratos tabagistas (T); ratos com PA (PA); ratos tabagistas com PA (T+PA); controle tratados com MEL (CN+MEL); ratos tabagistas tratados com MEL (T+MEL); ratos com PA tratados com MEL (PA+MEL); ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+MEL). Os grupos tabagistas receberam à inalação passiva da fumaça do cigarro durante 50 dias, sendo que no 20º dia, os grupos PA foram submetidos à indução da periodontite apical, com auxílio de uma broca em aço carbono em primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito. Ademais, os animais dos grupos MEL foram suplementados com melatonina (5 mg/Kg, via oral por meio de gavagem) do 20º dia até 50º dia experimental. Foram analisados glicemia, insulinemia, sensibilidade à insulina (HOMA-IR), grau defosforilação em tirosina da pp185 e estresse oxidativo (superóxido dismutase - SOD e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS) no músculo gastrocnêmio (MG). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Em função dos resultados do teste de normalidade foram utilizados testes paramétricos para comparar glicemia, insulinemia, sensibilidade à insulina, grau de fosforilação em tirosina da pp185 e estresse oxidativo no MG entre os grupos, com nível de significância de 5%. Os resultados do presente estudo demonstram que os grupos PA, T e T+PA apresentaram aumento da RI quando comparados ao grupo CN. Além do mais, o grupo T+PA apresentou menor sensibilidade à insulina quando comparado aos grupos T e PA, sugerindo que a associação das variáveis, tabaco e periodontite apical, promove alteração

exacerbada neste parâmetro metabólico em relação aos grupos analisados isoladamente. Interessantemente, a administração de MEL em animais com tabaco (grupos T+MEL), periodontite apical (PA+MEL) e a associação destas variáveis (grupo T+PA+MEL) foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina. Em relação ao peso e ingestão alimentar, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Houve prejuízo na transdução da etapa inicial do sinal insulínico nos grupos PA, T e T+PA. A MEL promoveu melhora neste parâmetro somente no grupo de animais com PA (PA+MEL). Além disso, não houve diferença estatística na atividade da defesa antioxidante (SOD) entre os grupos. A administração de MEL em animais tabagistas (T+MEL) ou PA (PA+MEL) promoveu diminuição no dano lipídico (TBARS). Pode-se concluir que ações da PA e do tabagismo se relacionam com o aumento da RI e a associação destes fatores (grupo T+PA) exacerbou os parâmetros sistêmicos correlacionados com a insulinemia e HOMA-IR. Em contrapartida, a suplementação da MEL foi capaz de reverter a RI (grupos PA+MEL, T+MEL e PA+T+MEL) e o dano lipídico (TBARS, grupos T+MEL e PA+MEL), demonstrando suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes.

Palavras-chave: Melatonina. Tabaco. Periodontite apical. Resistência à insulina. Estresse oxidativo.

BRAVO, L. T. Evaluation of the effect of melatonin on the insulnic signal and oxidative stress in rats with apical periodontitis submitted to passive tobacco inhalation. 2022. 63 f. São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Apical periodontitis (AP) and smoking may be associated with metabolic syndrome, diabetes mellitus, altered insulin signal and insulin resistance (IR). Melatonin (MEL) is a hormone with antioxidant, anti-inflammatory properties and participation in bone remodeling. Previous studies show that MEL improves insulin sensitivity and insulin signaling in skeletal muscle of rats with AP. In this context, we hypothesized that the metabolic alterations in rats with AP are more pronounced with passive inhalation of tobacco and the administration of MEL can prevent or reduce these alterations. The objective of this work was to evaluate insulin sensitivity, oxidative stress and insulin signaling pathway in the skeletal muscle of adult rats with AP submitted to passive inhalation of tobacco. 128 Wistar rats, 60 days old, were divided into 8 groups: control (CN); smoking rats (T); rats with AP (AP); smoking rats with AP (T+AP); control treated with MEL (CN+MEL); smoking rats treated with MEL (T+MEL); mice with AP treated with MEL (AP+MEL); smoking rats with AP treated with MEL (T+AP+MEL). The smokers groups received passive inhalation of cigarette smoke for 50 days, and on the 20th day, the AP groups were submitted to the induction of apical periodontitis, with the aid of a carbon steel drill in the upper and lower first and second molars on the lateral side right. Furthermore, the animals in the MEL groups were supplemented with melatonin (5 mg/Kg, orally through gavage) from the 20th to the 50th experimental day. Glycemia, insulinemia, insulin sensitivity (HOMA-IR), degree of pp185 tyrosine phosphorylation and oxidative stress (superoxide dismutase - SOD and thiobarbituric acid reactive substances - TBARS) were analyzed in the gastrocnemius muscle (MG). Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. Based on the results of the normality test, parametric tests were used to compare glycemia, insulinemia, insulin sensitivity, degree of pp185 tyrosine phosphorylation and oxidative stress in the MG between groups, with a significance level of 5%. The results of the present study demonstrated that the AP, T and T+AP groups showed an increase in IR when compared to the CN group. Moreover, the T+PA group presented lower insulin sensitivity when compared to groups T and AP, suggesting that the association of the variables, tobacco and apical periodontitis, promotes exacerbated change in this metabolic parameter in relation to the groups analyzed separately. Interestingly, the administration of MEL in animals with tobacco (T+MEL groups), apical periodontitis (AP+MEL) and the association of these variables (T+AP+MEL

group) was able to improve insulin sensitivity. Regarding weight and food intake, no significant differences were found between groups. There was impairment in the transduction of the initial stage of the insulin signal in the AP, T and T+AP groups. MEL promoted improvement in this parameter only in the group of animals with AP (AP+MEL). Furthermore, there was no statistical difference in antioxidant defense activity (SOD) between groups. The administration of MEL in smoking animals (T+MEL) or AP (AP+MEL) promoted a decrease in lipid damage (TBARS). It can be concluded that AP and smoking actions are related to increased IR and the association of these factors (T+AP group) exacerbated the systemic parameters correlated with insulinemia and HOMA-IR. In contrast, MEL supplementation was able to reverse IR (AP+MEL, T+MEL and T+ AP+MEL groups) and lipid damage (TBARS, T+MEL and AP+MEL groups), demonstrating its anti-inflammatory actions and antioxidants.

Keywords: Melatonin Tobacco Apical periodontitis Insulin resistance Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fluxograma contendo os grupos experimentais, número de animais (n) correspondentes a cada grupo, tecidos que foram coletados e as análises realizadas em cada tecido 24
- Figura 2 - Indução da Periodontite Apical (PA) em maxila e mandíbula do lado direito, nos primeiros e segundos molares superiores e inferiores, com auxílio de uma broca LN (LN Long Neck, Dentisply Maillefer, Ballaigues- Suíça) acoplada em baixa rotação 25
- Figura 3 - Ingestão alimentar (média) dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+MEL), ratos com PA tratados com MEL (PA+MEL), ratos tabagistas tratados com MEL (T+MEL) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+MEL) avaliado desde o início até o final do experimento. Os valores são expressos como média \pm EPM (n = 10 animais por grupo) 31
- Figura 4 - Massa corpórea dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+MEL), ratos com PA tratados com MEL (PA+MEL), ratos tabagistas tratados com MEL (T+MEL) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+MEL) avaliado desde o início o final do experimento. Os valores são expressos como média \pm EPM (n = 10 animais por grupo) 32
- Figura 5 - Valores de glicemia, insulinemia e HOMA-IR dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+MEL), ratos com PA tratados com MEL (PA+MEL), ratos tabagistas tratados com MEL (T+MEL) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+MEL). Os valores são apresentados como média \pm EPM de cada grupo (n=10 animais por grupo). Letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significantes (p<0,05) 33
- Figura 6 - Avaliação do grau de fosforilação da pp185 em tirosina (pTyr) antes (-) e após (+) estímulo insulínico, no músculo gastrognômico (MG) dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+MEL), ratos com PA tratados com MEL (PA+MEL), ratos tabagistas tratados com MEL (T+MEL) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+MEL). Em A autorradiografias típicas: quantidades iguais de proteínas foram analisadas (185 μ g), sendo a β -actina usada como controle. Em B são demonstrados os valores do grau de fosforilação em tirosina da pp185 apresentados como média \pm EPM (n=10 animais por grupo). Letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significantes (p<0,05) 34
- Figura 7 - A avaliação da defesa enzimática (SOD), normalizada pela proteína total do músculo

gastrocnêmico (mg) dos respectivos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+MEL), ratos com PA tratados com MEL (PA+MEL), ratos tabagistas tratados com MEL (T+MEL) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+MEL). Os valores são expressos como média \pm EPM (n = 10 animais por grupo). Letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

35

Figura 8 - A avaliação do dano oxidativo lipídico (TBARS), normalizada pela proteína total do músculo gastrocnêmico (mg) dos respectivos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+MEL), ratos com PA tratados com MEL (PA+MEL), ratos tabagistas tratados com MEL (T+MEL) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+MEL). Os valores são expressos como média \pm EPM (n = 10 animais por grupo). Letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

35

LISTA DE ABREVIATURAS

CAMK II	Proteína quinase II dependente de cálcio-calmodulina
CAT	Catalase
CK2	Caseína quinase-2
CN	Ratos do grupo controle
CN+MEL	Ratos do grupo controle tratados com melatonina
CREB	Proteína Ligante de Elemento Responsivo a Cálcio
DP	Doença periodontal
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPM	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FN- γ	Interferon- γ
GLUT4	Transportador de Glicose tipo 4
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
GSH	Glutathiona peroxidase
HOMA-IR	Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina
IKK	Quinase do inibidor kappa- β
IKK α	Quinase do inibidor kappa- α
IKK α/β	Quinase do inibidor kappa β - α/β
IKK β	Quinase do inibidor kappa B- β
IKK γ	Quinase do inibidor kappa B- γ
IL-1 β	Interleucina 1- β
IL-6	Interleucina 6
IRS's	Substratos do receptor de insulina
JNK	C-Jun N-terminal quinase
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MDA	Malondialdeído
MEL	Melatonina
MG	Músculo gastrocnêmio

NF- κ B	Fator nuclear kappa- β
NOS	Espécies reativas de nitrogênio
NOX4	NADPH oxidase 4
OCN	Osteocalcina
PA	Periodontite Apical
PA+MEL	Ratos com peridontite apical tratados com melatonina
PGC-1 α	Proliferador do peroxissoma
PKB	Proteína quinase β
pp185	Substrato do receptor de insulina (IRS-1/IRS-2)
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear-kappa β
RI	Resistência à insulina
SB	Solução basal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SI	Sinal insulínico
SOD	Superóxido dismutase
T	Ratos tabagistas
T+PA	Ratos tabagistas com periodontite apical
T+PA+MEL	Ratos tabagistas com periodontite apical tratados com melatonina
T+MEL	Ratos tabagistas tratados com melatonina
TAB	Tecido Adiposo branco periepididimal
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEMED	Tetrametil etilenodiamina
TLR	Receptores do tipo toll
TLR4	Receptor do tipo toll 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
TRIS	Hidroximetil aminometano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODO	23
3.1 Animais	23
3.2 Indução da periodontite apical	25
3.3 Protocolo de tabagismo – fumante passivo.....	25
3.4 Administração de melatonina	26
3.5 Avaliação da glicemia, insulinemia e sensibilidade à insulina.....	26
3.6 Avaliação da etapa inicial da via insulínica (pp185) em MG	27
3.6.1 Preparação das amostras para a técnica de “Western blotting”.....	27
3.7 Análise do grau de estresse oxidativo (superóxido dismutase - SOD e espécies reativas ao tiobarbitúrico -TBARS)	29
3.8 Análise estatística	29
4 RESULTADOS	31
4.1 Ingestão alimentar.....	31
4.2 Avaliação da massa corpórea	31
4.3 Avaliação da glicemia, insulinemia e índice de HOMA-IR.....	32
4.4 Grau de fosforilação em tirosina da pp185 (antes e após o estímulo insulínico) no MG.....	33
4.5 Análise do grau de estresse oxidativo (superóxido dismutase - SOD e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico -TBARS).....	34
5 DISCUSSÃO	36
6. RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS	43
7. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS.....	45

ANEXOS	60
--------------	----

1 INTRODUÇÃO

A periodontite apical (PA) é uma doença de caráter inflamatório dos tecidos perirradiculares, ocasionada por infecção microbiana persistente no sistema de canais radiculares (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965), caracterizando-se de forma aguda (sintomática) ou crônica (assintomática), localizada junto ao ápice dentário (STASHENKO *et al.*, 1994)

A PA possui etiologia microbiana, embora fungos, arqueas e vírus tenham sido encontrados em associação com esta lesão, sendo as bactérias os principais agentes etiológicos microbianos. A microbiota é encontrada em entidades altamente organizadas e complexas, conhecidas como biofilmes multiespécies, localizadas principalmente no interior dos canais radiculares, porém, em circunstâncias específicas, os microrganismos podem ultrapassar a barreira de defesa e estabelecer uma infecção extra-radicular (SUNDE *et al.*, 2019; NAIR, 2006).

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

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

colagenase (PEREIRA *et al.*, 2021; TAUBMAN *et al.*, 2005).

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

A RI é definida como a incapacidade de tecidos periféricos responsivos à insulina responderem adequadamente às concentrações circulantes deste hormônio, resultando em diminuição da sua ação biológica nesses tecidos (ROBERTS; HEVENER; BARNARD, 2013). Como consequência, as células beta pancreáticas secretam mais insulina a fim de evitar a hiperglicemia. A sobrecarga da função secretória destas células induz a falência celular, ocasionando diminuição da secreção de insulina (PRADHAN; GOEL, 2011).

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

Os estudos anteriores em nosso laboratório mostram que ratos com PA apresentam: 1) RI; 2) aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- α ; 3) redução no grau de fosforilação em tirosina do receptor insulínico em tecido adiposo branco e muscular; 4) redução no grau de

fosforilação em serina da Akt em músculo gastrocnêmio (MG) e 5) diminuição no conteúdo de GLUT4 em MG (ASTOLPHI *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2017). Ademais, no estudo de Pereira *et al.* (2017) foi constatado aumento do conteúdo de macrófagos e ativação de via inflamatória relacionada a atenuação do sinal insulínico no MG, concomitante ao aumento das concentrações séricas de LPS em ratos com PA. Assim, esses resultados demonstram que a PA promove alterações sistêmicas e em outros tecidos como o tecido adiposo e muscular (PEREIRA *et al.*, 2017).

Além da inflamação, citada anteriormente como fator relevante para a RI, o estresse oxidativo também tem sido relacionado ao desenvolvimento, progressão e complicações desta alteração metabólica (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003; RAINS; JAIN, 2011).

Em condições fisiológicas, há um equilíbrio entre a geração e depuração de espécies reativas de oxigênio (EROs), pois as células eucarióticas possuem mecanismos de defesa antioxidante (NITA; GRZYBOWSKI, 2016), os quais incluem moléculas enzimáticas (superóxido dismutase – SOD, catalase – CAT, glutaciona peroxidase – GPx e glutaciona redutase – GR) e não enzimáticas (glutaciona e vitaminas A,C e E) (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003; VALKO *et al.*, 2007). Contudo, quando ocorre o desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a capacidade das células de neutralizá-las pela defesa antioxidante, ocorre o processo de estresse oxidativo (PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014). As EROs podem ativar vias celulares sensíveis ao estresse, tais como JNK, p38 MAPK, IKK e quinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2) que podem interferir negativamente nas vias de sinalização insulínica (BLOCH-DAMTI; BASHAN, 2005). Ademais, as EROs podem danificar macromoléculas, como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (BIRBEN *et al.*, 2012; NITA; GRZYBOWSKI, 2016).

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

No estudo de César-Neto *et al.* (2003) ao analisar os efeitos da inalação passiva da fumaça do cigarro sobre a osteointegração de implantes em ratos, concluíram que o processo

de osteointegração nessa situação foi menor devido em parte pela ação da nicotina.

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

Em relação às alterações relacionadas com perda óssea em pacientes com periodontite crônica, Amaranath *et al.* (2020) avaliou 60 participantes do sexo masculino, subdividindo os mesmos em dois grupos com 30 participantes, fumantes e não fumantes respectivamente. Foram avaliados parâmetros clínicos periodontais (índice de placa, profundidade de sondagem e perda de inserção clínica), concluindo que o tabagismo estava associado às alterações graves periodontais, verificando alterações nos tecidos moles e ósseos.

Outro aspecto relevante é associação do tabaco com o processo de estresse oxidativo, pois sabe-se que os radicais livres presentes na fumaça do cigarro podem interferir no processo oxidativo e antioxidante do fumante (KOPA; PAWLICZAK, 2020). Os radicais livres derivados tanto do oxigênio como do nitrogênio participam do processo de peroxidação de diferentes moléculas estruturais, gerando secreção de citocinas e quimiocinas (KOPA; PAWLICZAK, 2020). A presença de inflamação pode iniciar alterações nas vias respiratórias estruturais e doenças decorrentes do tabagismo (CAI; WANG, 2017; WILLIAMS *et al.*, 2013). Nesses casos, o processo de estresse oxidativo é resultante da exposição crônica do epitélio pulmonar à fumaça do cigarro, podendo este estar relacionado ao desenvolvimento de

enfermidades pulmonares (REPINE; BAST; LANKHORST, 1997). Além disso, Bodas *et al.* (2016) citam em seu estudo que a exposição da nicotina, gerada por cigarros eletrônicos, propiciou o estresse oxidativo e prejudicou a autofagia das células pulmonares, podendo ser fatores desencadeadores da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC).

Um dos fatores que pode contribuir para a diminuição do processo inflamatório e o estresse oxidativo é a MEL (LAN *et al.*, 2020; REITER *et al.*, 2018). Ademais, sabe-se que o uso de MEL propicia efeitos anti-inflamatórios melhorando o estado de RI (TAVARES *et al.*, 2021). A MEL é uma molécula sintetizada em diferentes tipos celulares, tecidos e órgãos como a retina, linfócitos, leucócitos, pele e trato gastrointestinal, entretanto, as concentrações de MEL encontradas no plasma circulante e no líquido cefalorraquidiano derivam quase exclusivamente da glândula pineal (CAROCCI; CATALANO; SINICROPI, 2014). Estudos apontam que a produção de MEL tem associação direta com a intensidade de exposição à luminosidade, sendo mais sensível à luz azul com comprimento de ondas curtas (466-477nm) quando comparadas aos de ondas mais longas (>500nm) (BRAINARD *et al.*, 1984; SOUSA NETO; CASTRO, 2008). Outro fator limitante na produção da MEL é o avanço da idade, pois estudos em indivíduos mais velhos observaram concentrações menores de produção da MEL (KARASEK, 2004; SACK *et al.*, 1986).

A MEL está envolvida nas funções metabólicas como a regulação lipídica e glicídica, participando do aumento da sensibilidade à insulina (BORGES *et al.*, 2015; DI BELLA *et al.*, 2013; LEE; CUA, 2015; MANCHESTER *et al.*, 2015; MAURIZ *et al.*, 2013; SUN; HUANG; QU, 2015). Além da ação da MEL sobre a sensibilidade à insulina (SANTOS *et al.*, 2018; TAVARES *et al.*, 2021) constatou-se que este hormônio modula o processo de reabsorção óssea alveolar, bem como a diminuição de citocinas inflamatórias, por exemplo o TNF- α e IL-6, sendo estas relacionadas com o processo de reabsorção óssea (MARANI *et al.*, 2021). Saritekin *et al.* (2019) demonstraram que a administração de MEL pela via intraperitoneal na dose de 10mg/Kg por 21 dias promoveu uma redução do processo inflamatório e da destruição óssea em lesões periapicais induzidas em ratos. Ademais, outros estudos apontam que a melatonina tem atuação direta no processo de remodelação óssea, beneficiando o mesmo pela ação anabólica e antirreabsortiva, por meio de múltiplos mecanismos como: diferenciação de células tronco mesenquimais humanas na linhagem de células osteoblásticas, reduzindo a reabsorção óssea, aumentando a síntese de OPG (receptor chamariz que impede a ligação da RANKL em se ligar ao seu receptor correspondente RANK), além de reduzir a síntese de RANKL prevenindo a reabsorção óssea adicional (AMSTRUP *et al.*, 2013). Tresguerres *et al.* (2014)

conduziram um estudo que avaliou os efeitos da suplementação de melatonina dietética sobre propriedades biomecânicas dos fêmures de ratos idosos, concluindo que o grupo tratado com MEL apresentou maiores volume ósseo, número de trabéculas ósseas, espessura trabecular e cortical em comparação ao grupo controle (não tratado com melatonina). Além disso, a MEL possui efeitos antioxidantes e depuradoras de radicais livres, protegendo o tecido ósseo das ações degenerativas dos radicais livres, os quais relacionam-se com a osteoclastogênese (CARDINALI *et al.*, 2003). Por fim, no estudo conduzido por Wang *et al.* (2019), avaliando a ação protetora da MEL contra o desequilíbrio do metabolismo ósseo em ratos com osteoporose induzida com ácido retinóico, concluíram que o tratamento com MEL amenizou os efeitos decorrentes do ácido retinóico, aumentou a quantidade do osso trabecular, diminuiu o número de osteoclastos, melhorou a microestrutura do fêmur e vértebras, bem como aumentou a densidade óssea e a expressão de fosfatase alcalina.

No estudo de Balaji e Rao (2020) foi verificado aumento na concentração de MEL no tecido gengival de pacientes periodontalmente saudáveis sem hábito de fumar, enquanto houve diminuição nesse parâmetro em pacientes fumantes com periodontite crônica generalizada. Ademais, houve diminuição na concentração de TNF- α na gengiva em pacientes fumantes com periodontite crônica generalizada tratados com MEL. Os autores deste estudo concluíram que a MEL pode ser usada como suplemento para aumentar os mecanismos anti-inflamatórios na terapia periodontal, especialmente em fumantes de cigarros.

Sabendo-se que às alterações locais e sistêmicas podem ser desencadeadas tanto pela PA como pelo tabagismo e que a MEL apresenta propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, torna-se fundamental investigar o papel da MEL sobre parâmetros sistêmicos e em tecidos à distância da cavidade bucal de ratos com PA submetidos a inalação passiva de tabaco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

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

2.2 Objetivos específicos

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

- glicemia, insulinemia e resistência insulínica (HOMA-IR);
- grau de fosforilação em tirosina da pp185 (antes e após o estímulo insulínico) no tecido muscular gastrocnêmio;
- estresse oxidativo (superóxido dismutase e substâncias reativas - SOD ao ácido tiobarbitúrico - TBARS) no tecido muscular gastrocnêmio.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

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

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

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

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

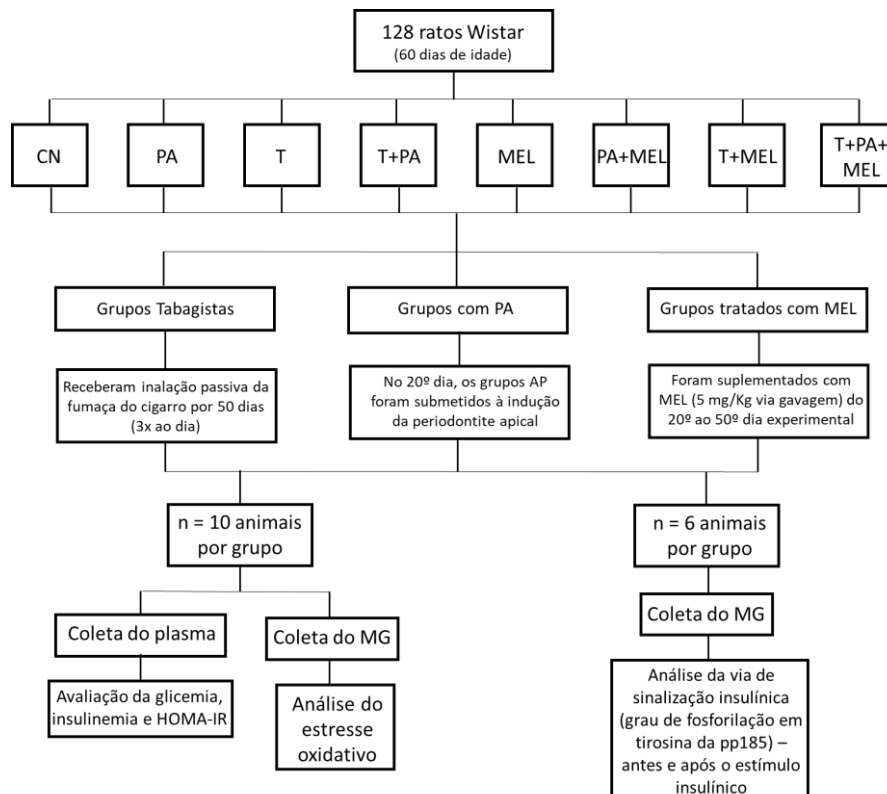
Após o término do tratamento, os ratos foram submetidos a jejum de 12 horas, antes dos procedimentos experimentais, e anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5 mg/100 g p. c., i. p.). A eutanásia dos animais ocorreu entre 19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

Um grupo de ratos CN, T, PA, T+PA, CN+MEL, T+MEL, PA+MEL e T+PA+MEL ($n = 10$ animais por grupo) foi submetido à laparotomia mediana para a coleta de sangue (4 mL) pela veia cava inferior. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados (BV Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, EUA) e centrifugadas a $3000 \times g$ por 15 minutos a 4°C . O plasma obtido foi armazenado a -80°C para avaliação das concentrações

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

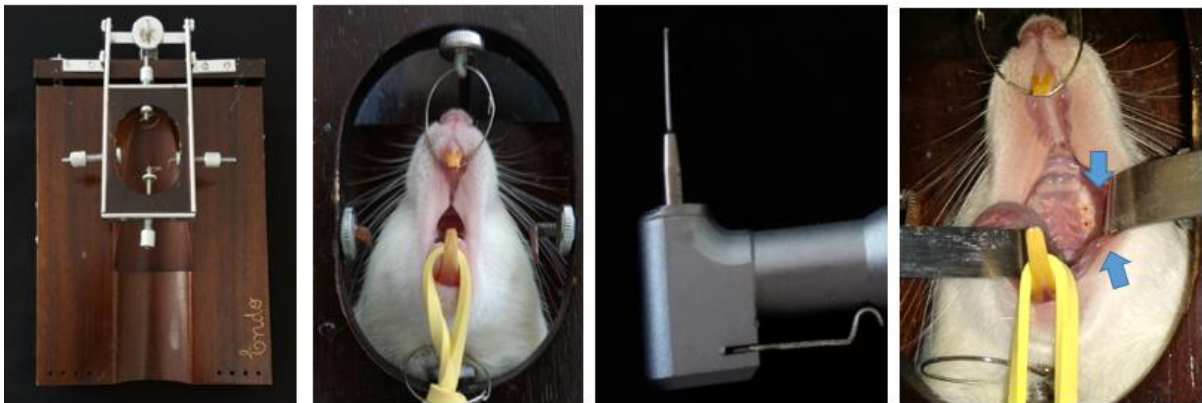
Figura 1 - Fluxograma contendo os grupos experimentais, número de animais (n) correspondentes a cada grupo, tecidos que foram coletados e as análises realizadas em cada tecido



3.2 Indução da periodontite apical

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

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



Fonte: CINTRA, L.T.A e CONTI, L.C, 2016.

3.3 Protocolo de tabagismo – fumante passivo

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

A câmara de exposição a fumaça foi confeccionada em madeira com as medidas 40x33x17 cm, tampa de vidro transparente para observação dos animais durante a inalação da fumaça. A câmara de exposição foi dividida em duas repartições por uma tela perfurada. A área maior era usada para alojar os animais, cinco por vez, e a menor para os cigarros, que foram

acoplados em uma base de madeira com orifícios adaptado de (ERCAN *et al.*, 2019). Em uma das paredes da câmara foi instalado um ventilador com a finalidade de fazer circular o ar. Na parede oposta ao ventilador, foram realizadas algumas perfurações para ventilação, gerando um fluxo de ar contínuo dentro da câmara de experimento.

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

3.4 Administração de melatonina

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

3.5 Avaliação da glicemia, insulinemia e sensibilidade à insulina

A glicemia foi analisada pelo método enzimático glicose-oxidase (Análise Diagnóstica, São Paulo, Brasil) e a insulinemia foi avaliada pelo método Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) com a utilização de kit, seguindo as instruções do fabricante (Sensitive Rat Insulin, SRI-13K, Millipore, St Charles, MO, EUA). A sensibilidade insulínica foi avaliada por meio do índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance / Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina), calculado a partir da fórmula: HOMA - IR

= glicemia de jejum (mmol/L) x insulinemia de jejum (μ IU/ml/22,5) (BONORA *et al.*, 2000).

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

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

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

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

Na montagem, o gel de resolução ficou sob o gel de “stacking”, com orientação vertical, num sistema de câmaras que manteve as porções superiores e inferiores do gel em contato com um tampão de corrida (Tris 50 mM; glicina 375 mM; SDS 0,1%; EDTA 1,8 mM). No gel de “stacking” foram aplicadas as amostras solubilizadas em tampão de “Laemmli”. Imediatamente antes da aplicação, as amostras foram fervidas por 4 min. A eletroforese foi realizada em equipamento para mini gel da Bio Rad (Mini-Protean, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA), e começou com a corrida no gel de “stacking” sob voltagem constante em 30 V até que ocorra

m empacotamento da amostra, o que pode ser observado na transição dos géis. Posteriormente foi aplicada voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante 2 h. Juntamente com as amostras, sempre foi colocado um padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (Amersham ECL Full-Range Rainbow, GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA).

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

- **“Immunoblotting”:** Após a transferência eletroforética, foi iniciado o processo de imunodeteção de proteínas específicas (KRUGER; HAMMOND, 1988). As membranas de nitrocelulose foram, primeiramente, incubadas na presença de solução bloqueadora (solução basal [SB] - NaCl 150 mM; Tris 10 mM; "Tween" 20 0,02%; pH 7,2 - acrescida de 5% de leite desnatado - 0% de gordura) durante 2 h à temperatura ambiente, e então, 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 antifosfotirosina, e anti- β -actina. Todos os anticorpos foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA. Posteriormente foram realizadas três lavagens com SB, e as membranas serão incubadas durante 1 h com segundo anticorpo contendo peroxidase de “horseradish” (kit de quimioluminescência – ECL – GE Healthcare Buckinghamshire, Germany). Novamente, foram realizadas 3 lavagens da membrana de nitrocelulose com SB, com duração de 10 min cada lavagem. Após estes procedimentos, as membranas foram levadas até uma câmara escura, onde foi adicionado 1 ml de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL), e foram incubadas por 1 minuto. Por fim, foi drenado o excesso de reagente e as membranas de nitrocelulose foram expostas a filme de RX (Hyperfilm ECL – GE Healthcare Buckinghamshire, Germany), durante 10 min em temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR) e solução fixadora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR). A intensidade dos "blots" foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se um programa Scion Image (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, USA).

3.7 Análise do grau de estresse oxidativo (superóxido dismutase - SOD e espécies reativas ao tiobarbitúrico -TBARS)

- **Preparo dos homogenatos:** o MG foi homogeneizado manualmente com pistilo de porcelana por cerca de 3 min em solução salina/tampão fosfato (pH 7,2), sempre mantidos no gelo. Após este processo, os homogenatos foram centrifugados a 10.000G, durante 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a mensuração da atividade da enzima antioxidante SOD. Para a determinação da concentração tecidual de TBARS, os homogenatos foram centrifugados a 5.000G, durante 5 min, a temperatura ambiente. As proteínas no MG foram quantificadas pelo método de Lowry.

- **Determinação da concentração tecidual de SOD:** o ensaio foi realizado de acordo com Dieterich et al. (2007). Nas alíquotas do homogenato foi adicionado 1mL de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,8) contendo 1mM de DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético) e a reação foi iniciada com a adição de pirogallol (0,2 mM). A leitura foi realizada durante 3 min à 37°C no espectrofotômetro a 420 nm. A determinação da atividade da enzima dada em U.mg proteína, foi determinada a partir da capacidade da SOD em inibir a autoxidação do pirogallol, onde 1U = 50% de inibição da autoxidação do pirogallol.

- **Determinação da concentração tecidual de TBARS:** em 125 µL de homogenato tecidual foram adicionados 375 µL de ácido tricloroacético 10%, para promover a precipitação das proteínas. Após 5s de agitação no vórtex, os tubos permanecerão em banho de gelo por 30 min e foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 3.000 RPM, por 10 min, sob temperatura inferior à 10 °C. Em tubos de vidro, foram colocados 250 µL de sobrenadante e 250 µL de ácido tiobarbitúrico 0,67% (Sigma, St. Louis, MO, USA), de acordo com (NEVES *et al.*, 1997). A solução foi agitada no vórtex por 5s e, a seguir, aquecida em banho-maria a 100°C por 15 min. Após resfriamento em banho de gelo, acrescentou-se 750 µL de álcool n-butilico em cada tubo, promovendo a extração do produto corado (MDA+TBA) da solução aquosa. Após agitação (por 40s) no vórtex e centrifugação a 2.000 RPM, por 5 min, o sobrenadante corado foi colocado em cubetas para a leitura em espectrofotômetro a 535 nm (BUEGE; AUST, 1978).

3.8 Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Em função dos resultados do teste de normalidade foram utilizados testes paramétricos para comparar glicemia,

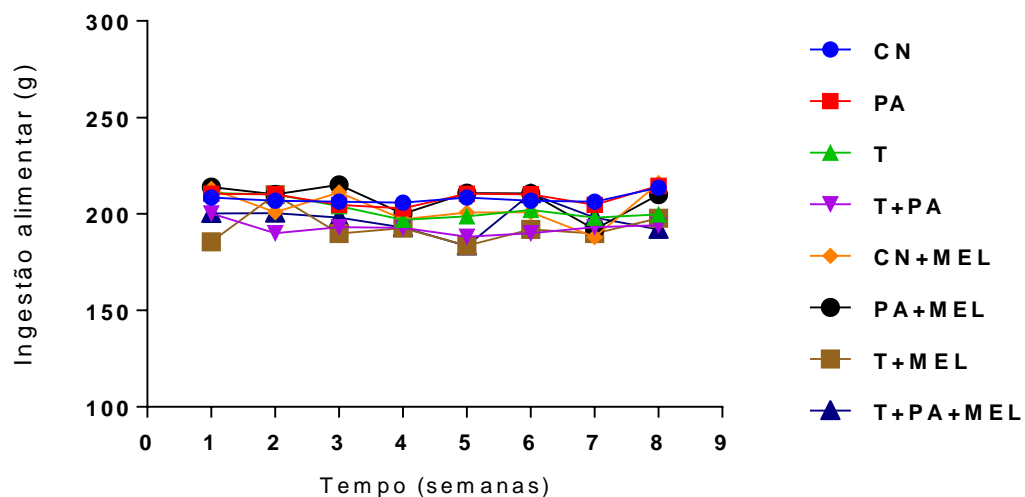
insulinemia, sensibilidade à insulina, grau de fosforilação em tirosina da pp185 e estresse oxidativo no MG entre os grupos, com nível de significância foi de 5%, sendo o processamento dos dados realizado com auxílio do software Graph Pad Prism versão 7.0.

4 RESULTADOS

4.1 Ingestão alimentar

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

Figura 3 - Ingestão alimentar (média) dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+MEL), ratos com PA tratados com MEL (PA+MEL), ratos tabagistas tratados com MEL (T+MEL) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+MEL) avaliado desde o início até o final do experimento. Os valores são expressos como média \pm EPM (n = 10 animais por grupo)

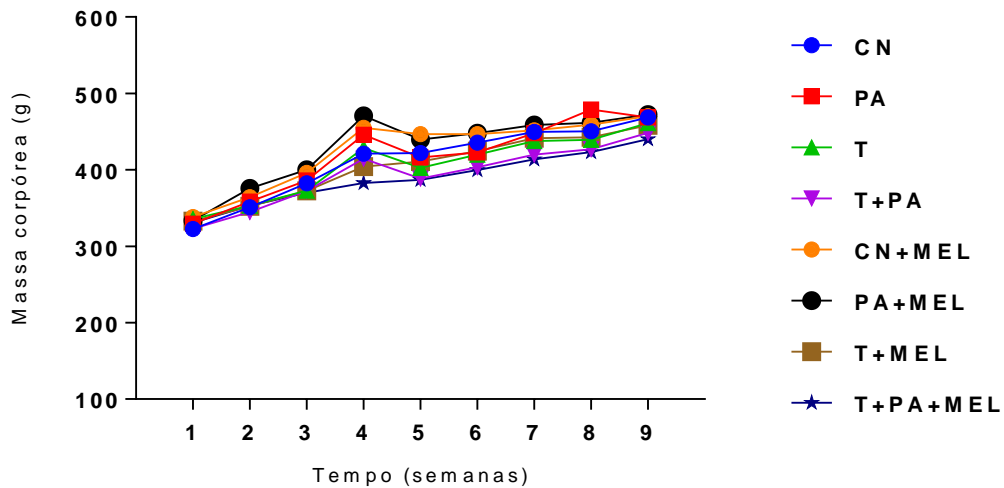


Fonte: Autor, 2022

4.2 Avaliação da massa corpórea

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

Figura 4 - Massa corpórea dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+MEL), ratos com PA tratados com MEL (PA+MEL), ratos tabagistas tratados com MEL (T+MEL) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+MEL) avaliado desde o início o final do experimento. Os valores são expressos como média \pm EPM (n = 10 animais por grupo)

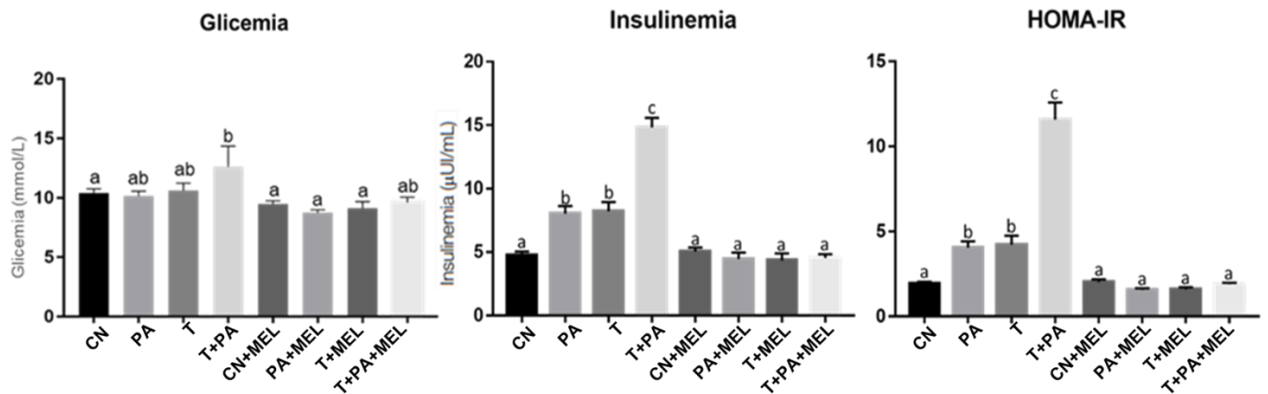


Fonte: Autor, 2022

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

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

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

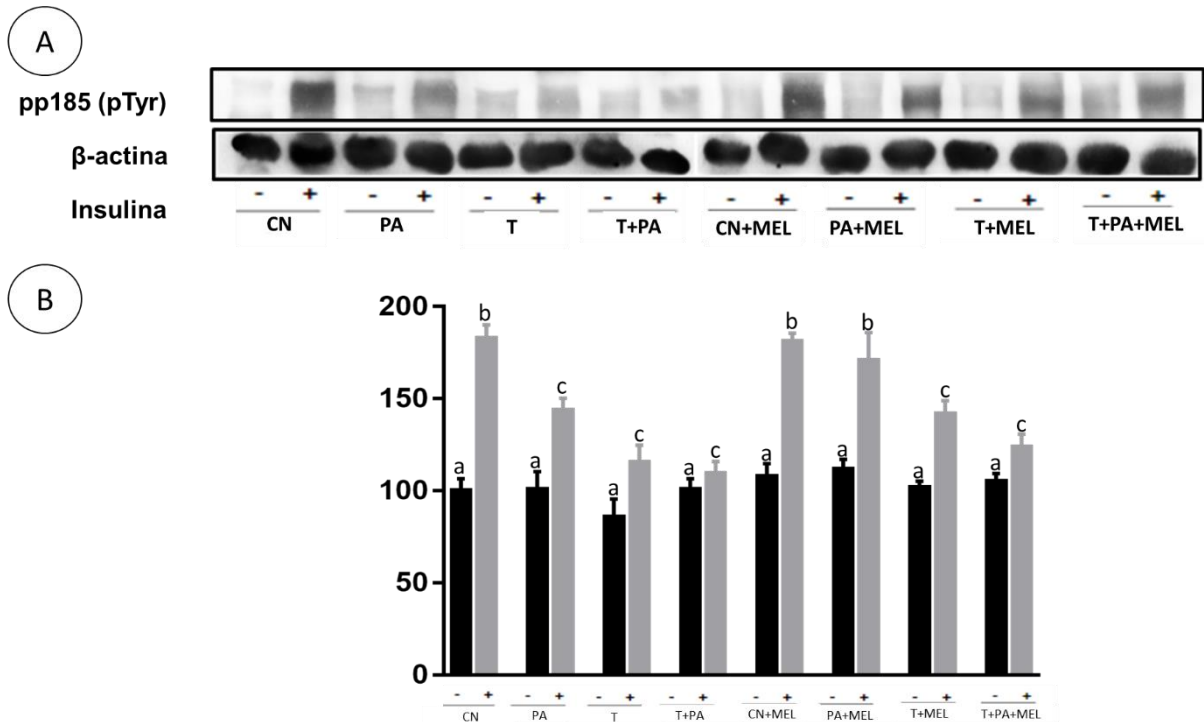


Fonte: Autor, 2022

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

A Figura 6 apresenta a avaliação do grau de fosforilação da pp185 em tirosina antes (-) e após (+) o estímulo insulínico. Observa-se uma redução significativa no grau de fosforilação da pp185 em tirosina, após o estímulo insulínico, nos grupos PA, T, T+PA, T+MEL e T+PA+MEL quando comparados aos grupos CN, CN+MEL e PA+MEL. Entretanto, não houve diferença estatística neste parâmetro entre os três últimos grupos (CN, CN+MEL e PA+MEL).

Figura 6 - Avaliação do grau de fosforilação da pp185 em tirosina (pTyr) antes (-) e após (+) estímulo insulínico, no músculo gastrocnêmico (MG) dos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+MEL), ratos com PA tratados com MEL (PA+MEL), ratos tabagistas tratados com MEL (T+MEL) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+MEL). Em A autorradiografias típicas: quantidades iguais de proteínas foram analisadas (185 µg), sendo a β-actina usada como controle. Em B são demonstrados os valores do grau de fosforilação em tirosina da pp185 apresentados como média ± EPM (n=10 animais por grupo). Letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significantes (p<0,05)

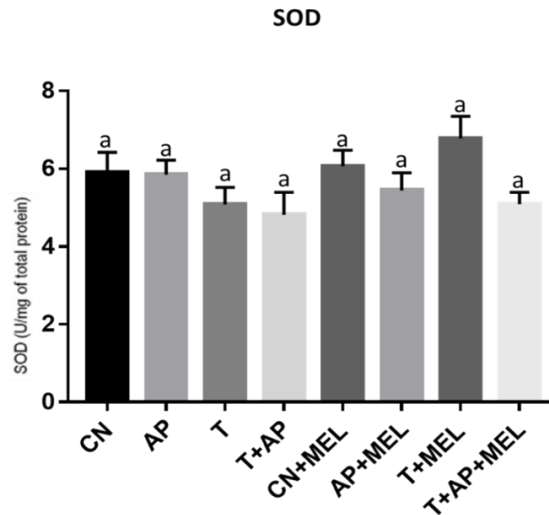


Fonte: Autor, 2022

4.5 Análise do grau de estresse oxidativo (superóxido dismutase - SOD e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico -TBARS)

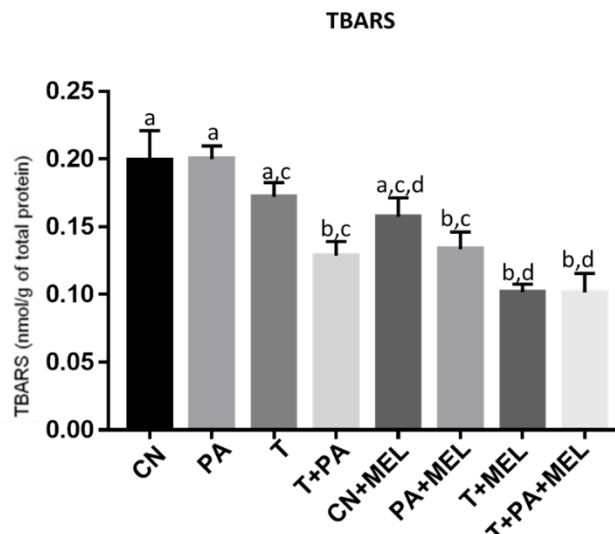
As figuras 7 e 8 correspondem aos resultados referentes à superóxido dismutase (SOD) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), respectivamente. Com relação a SOD, observa-se que não houve diferenças estatisticamente significantes nos grupos estudados (Figura 7). Em relação à TBARS, os grupos T+PA, PA+MEL, T+MEL e T+PA+MEL apresentaram uma diminuição em comparação ao grupo CN. Ademais, nos grupos T+MEL e T+PA+MEL houve diminuição de TBARS em relação ao grupo T (Figura 8).

Figura 7 - A avaliação da defesa enzimática (SOD), normalizada pela proteína total do músculo gastrocnêmico (mg) dos respectivos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com PA (T+PA), controle tratados com MEL (CN+MEL), ratos com PA tratados com MEL (PA+MEL), ratos tabagistas tratados com MEL (T+MEL) e ratos tabagistas com PA tratados com MEL (T+PA+MEL). Os valores são expressos como média \pm EPM (n = 10 animais por grupo). Letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significantes (p<0,05)



Fonte: Autor, 2022

Figura 8 - A avaliação do dano oxidativo lipídico (TBARS), normalizada pela proteína total do músculo gastrocnêmico (mg) dos respectivos grupos: controle (CN), ratos tabagistas (T), ratos com PA (PA), ratos tabagistas com AP (T+PA), controle tratados com MEL (CN+MEL), ratos com AP tratados com MEL (PA+MEL), ratos tabagistas tratados com MEL (T+MEL) e ratos tabagistas com AP tratados com MEL (T+PA+MEL). Os valores são expressos como média \pm EPM (n = 10 animais por grupo). Letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significantes (p<0,05)



Fonte: Autor, 2022

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que os grupos PA, T e T+PA apresentaram aumento da RI quando comparados ao grupo CN e os grupos tratados com MEL. Ademais, a associação das variáveis tabaco e periodontite apical promoveu alteração exacerbada neste parâmetro metabólico em relação aos grupos analisados isoladamente. Interessantemente, a administração de MEL em animais com tabaco (grupos T+MEL), periodontite apical (PA+MEL) e a associação destas variáveis (grupo T+PA+MEL) foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina. Houve prejuízo na transdução da etapa inicial do sinal insulínico nos grupos PA, T e T+PA. A MEL promoveu melhora neste parâmetro somente no grupo de animais com PA (PA+MEL). Além disso, não houve diferença estatística na atividade da defesa antioxidante (SOD) entre os grupos. A administração de MEL em animais com PA (PA+MEL) e tabagistas (T+MEL) promoveu diminuição no dano lipídico (TBARS).

A avaliação do desenvolvimento de patologias infecciosas bucais, alterações ósseas e inflamatórias em animais são amplamente estudadas na literatura (ALMEIDA *et al.*, 2020; AZUMA *et al.*, 2018; BIGUETTI *et al.*, 2020; BUENO *et al.*, 2021; NOCITI JUNIOR *et al.*, 2002; TAVARES *et al.*, 2021). Enfatizamos que nosso estudo é pioneiro em relacionar processos inflamatórios (via tabaco e PA), sinal insulínico e MEL.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a MEL, o tabaco e a PA e/ou a associação destes fatores, não promoveram alterações significativas na ingestão alimentar e no peso corporal dos grupos analisados. Na literatura contém informações relevantes sobre a ação da MEL e do tabaco sobre estes parâmetros. Referente a MEL, sabe-se que este hormônio medeia a integração entre o ambiente cíclico e a distribuição circadiana de processos fisiológicos e comportamentais necessários para otimizar a homeostase energética (CIPOLLANETO *et al.*, 2014). Estudos demonstram que a MEL regula a expressão do gene pró-opiomelanocortina (POMC) hipotalâmico (RASMUSSEN *et al.*, 2003), podendo exercer um efeito anorexigênico direto, o qual está envolvido com a ingestão alimentar destes animais. Nossos resultados estão de acordo com o estudo conduzido por Zanuto *et al.* (2013), o qual demonstrou que ratos idosos e obesos suplementados com MEL na água de beber por 8 semanas não apresentaram alterações nestes parâmetros. Além disso, Buonfiglio *et al.* (2018) verificaram que ratos pinealectomizados apresentaram resistência progressiva à leptina, alteração nos mecanismos termorreguladores, diminuição da atividade do tecido adiposo marrom, resposta orexigêna e aumento do peso corporal. Em contrapartida, neste mesmo

estudo, o tratamento com MEL promoveu redução na ingestão alimentar e peso corporal devido seu efeito no hipotálamo, modulando expressão de peptídeos relacionados à ingestão alimentar.

Com relação ao tabagismo, a literatura demonstra que em humanos a nicotina está relacionada com um aumento de gasto energético, redução do apetite e palatabilidade, correlacionando o motivo de fumantes apresentarem menor massa corporal que não fumantes (CHIOLERO *et al.*, 2008). Além disso, pode-se observar um ganho de peso em pessoas que param de fumar, uma vez que aumentam a ingestão alimentar (CHIOLERO *et al.*, 2008). No presente estudo, como supracitado, não houve alteração na massa corporal e na ingestão alimentar entre os grupos estudados (figuras 3 e 4). Estes resultados podem ser explicados provavelmente porque o período de exposição à fumaça (50 dias) não foi longo o suficiente para provocar prejuízo na ingestão ou palatabilidade alimentar. Ebersbach-Silva *et al.* (2013) conduziu um estudo com exposição passiva à fumaça de cigarro durante 8 semanas em ratos sedentários e com realização de exercício físico, não obtendo resultados referentes à alteração de peso dos animais nos diferentes grupos experimentais. Em contrapartida, Wager-Srdar *et al.* (1984) constatou que ratos expostos por 14 dias à fumaça do cigarro tiveram diminuição de peso e de ingestão alimentar quando comparados aos animais não expostos ao tabaco, salientando que a exposição à fumaça do cigarro foi superior em comparação ao presente estudo. Nossos resultados estão de acordo com os de Azzalini *et al.* (2010), que não encontraram alterações destes parâmetros em ratos expostos à fumaça de cigarro por 4 semanas. Sendo assim, os parâmetros de ingestão alimentar e peso corporal parecem ser dose-tempo-dependentes em relação à exposição à fumaça do cigarro.

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas para compreender melhor a relação entre as doenças orais com as alterações sistêmicas, bem como os efeitos da administração de determinadas substâncias no desenvolvimento destas patologias (AZUMA *et al.*, 2018; TAVARES *et al.*, 2021). A RI é definida como uma resposta anormal dos tecidos periféricos à ação da insulina, promovendo uma utilização inadequada da glicose e, eventualmente gerando um quadro de hiperglicemia (REHMAN; AKASH, 2016). Estudos indicam que o tabagismo está associado a RI e à diminuição da tolerância à glicose (SAIRENCHI *et al.*, 2004; WEITZMAN *et al.*, 2005). No presente estudo, constatou-se que o grupo T+PA apresentou aumento na glicemia quando comparado aos grupos CN, CN+MEL, PA+MEL e T+MEL. Em relação à insulinemia, os grupos PA, T e T+AP apresentaram aumento neste parâmetro quando comparado aos demais grupos. Enfatizamos que a associação entre T e PA (grupo T+PA) promoveu piora na insulinemia em comparação aos grupos avaliados isoladamente. Pode-se verificar que o

tratamento com MEL foi capaz de melhorar à insulinemia nos grupos PA (PA+MEL), T (T+MEL) e associação das variáveis (T+PA+MEL). Kose *et al.* (2016) conduziu um estudo em ratos diabéticos induzidos por aloxana, no qual verificaram redução significativa nos níveis plasmáticos de glicose em animais diabéticos tratados com MEL. Além disso, a MEL é capaz de reverter a RI e melhorar captação de glicose em tecido adiposo de ratos pinealectomizados (LIMA *et al.*, 1998; ZANQUETTA *et al.*, 2003). Oliveira *et al.*, (2012) verificou que a MEL promoveu alterações metabólicas positivas em ratos diabéticos em longo prazo, incluindo a RI e o controle glicêmico. Ademais, Patel *et al.* (2022) correlacionam uma ligação funcional entre a MEL e a insulina implicada no aparecimento do diabetes mellitus tipo 2, destacando que o tratamento com MEL exógena em modelos celulares, animais e pacientes diabéticos promove alívio do diabetes e complicações correlacionadas a esta patologia.

A partir dos valores da glicemia e da insulinemia calculou-se o índice HOMA-IR. Observamos aumento deste índice no grupo PA, T e T+PA em comparação aos demais grupos. E a associação destas variáveis (PA e T) promoveu aumento mais acentuado neste parâmetro. A MEL foi capaz de melhorar a RI no grupo de animais com PA, tabagistas e na associação destas variáveis (T+PA) quando comparado aos respectivos grupos sem a administração de MEL (grupos T, PA e T+PA). Parte destes resultados estão de acordo com os estudos conduzidos por Astolphi *et al.* (2013) e Pereira *et al.* (2017), nos quais verificaram que ratos com PA apresentam RI. Ademais, Tavares *et al.* (2021) mostraram que a MEL melhora a sensibilidade à insulina em ratos com PA. Adicionalmente, no estudo de Santos *et al.* (2018) foi constatado que ratos com doença periodontal (DP) e/ou pinealectomizados suplementados com MEL apresentaram redução da RI. Agil *et al.* (2011) demonstraram que a administração de MEL reduziu os índices de HOMA-IR e a insulinemia em ratos Zucker com diabetes Tipo 2. Adicionalmente, Kitagawa, Ohta e Ohashi (2012) evidenciaram que a MEL atenua a síndrome metabólica em ratos obesos induzidos por dieta hipercalórica composta por frutose.

Com o intuito de verificar os mecanismos envolvidos na RI, avaliamos o grau de fosforilação em tirosina da pp185 no MG antes (-) e após (+) o sinal insulínico. Houve uma redução significativa no grau de fosforilação da pp185 em tirosina, após o estímulo insulínico, nos grupos PA, T e T+PA quando comparados ao grupo CN. Evidenciamos que a MEL só conseguiu reverter essa diminuição do sinal insulínico somente no grupo PA (PA+MEL), corroborando os resultados anteriores do nosso laboratório (TAVARES *et al.*, 2021). Similarmente, estudos verificaram que o tratamento com MEL restaurou a atividade das proteínas envolvidas na via de sinalização insulínica em hipocampo de ratos diabéticos

(KAMSRIJAI *et al.*, 2020) e em hipotálamo, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo marrom de ratos idosos e obesos (ZANUTO *et al.*, 2013). Ademais, a MEL mostrou ser eficiente na melhora da RI e da esteatose hepática em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (HEO *et al.*, 2018).

Evidências sugerem que a MEL exerce efeitos sobre o metabolismo da glicose e na patogênese do diabetes mellitus tipo 2, tanto em ratos quanto em humanos (PESCHKE; MÜHLBAUER, 2010). Zanuto *et al.* (2013) verificou que há diminuição na produção de MEL em ratos idosos, nos quais a sinalização insulínica está prejudicada com o envelhecimento. Entretanto, a suplementação de MEL provocou um aumento na sensibilidade à insulina e preveniu a RI relacionada à idade.

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

Além dos fatores supracitados, estresse oxidativo tem sido reconhecido como um mecanismo chave para a RI (HURRELL; HSU 2017). Estudos têm demonstrado que a exposição dos miócitos ao estresse oxidativo de baixo grau induz o comprometimento da sinalização insulínica e reduz o transporte de glicose estimulado pela insulina (DOKKEN *et al.*, 2008; MADDUX *et al.*, 2001). A hiperglicemia gera a produção de radicais livres e disfunção dos antioxidantes endógenos, resultando em disfunção celular (NISHIDA, 2005). A produção constante de espécies reativas de oxigênio (EROs) acontece durante a auto-oxidação excessiva da glicose e glicosilação de proteínas em um estado de hiperglicemia (KANETO *et al.*, 2005). Esta condição gera uma diminuição da atividade antioxidante levando ao estresse oxidativo, o qual desempenha papel importante nas complicações micro e macrovasculares do diabetes (BANDEIRA *et al.*, 2013).

Sabe-se que o excesso de EROs pode causar danos às macromoléculas celulares (NITA; GRZYBOWSKI, 2016). Salienta-se que as EROs, em concentrações fisiológicas, desempenham um papel importante na sinalização insulínica, possivelmente por diminuir a atividade de proteínas como a tirosina-fosfatase. Assim, o grau de geração de EROs pode determinar aumento ou diminuição do sinal insulínico, ou seja, as EROs em concentrações fisiológicas podem ser benéficas, porém em concentrações elevadas podem ser maléficas (LOH *et al.*, 2009). Os mecanismos para compreender estas alterações envolvem diferentes proteínas, como por exemplo, a NADPH oxidase 4 (NOX4), sendo esta responsável pela produção de EROs. Em um estado de hiperinsulinemia ocorre mudança na via da sinalização da PI3-quinase, fosforilando Rac em vez de PIP2, aumentando a atividade da NOX4, resultando no incremento de EROs (CAMPA *et al.*, 2015). Com a elevação de EROs ativa-se a caseína quinase-2 (CK2) bem como o retrómero, o qual sinaliza a rede trans-golgi levando a degradação de GLUT4 pelos lisossomos em vez de translocá-los para a membrana plasmática. Sendo assim, a elevação da EROs prejudica a captação de glicose celular, contribuindo para a hiperglicemia e estresse oxidativo (HURRELL; HSU, 2017).

Uma das substâncias que pode induzir a produção de EROs é a nicotina, componente farmacologicamente ativo presente na fumaça do cigarro (KOVACIC; COOKSY, 2005). O estresse oxidativo causado pela ação do tabagismo pode ser mensurado de diversas maneiras, seja por medidas diretas da carga oxidativa, por meio da produção de EROs pelas células sanguíneas e pelo efeito que o estresse causa sobre as moléculas-alvo, por exemplo, na peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (MACNEE, 2005). A concentração de TBARS é um marcador importante referente à intensidade da peroxidação lipídica, o qual é um dos principais fatores relacionados ao desenvolvimento de dano endotelial vascular corresponde ao primeiro estágio de complicações vasculares decorrentes do diabetes (NAPIERALA *et al.*, 2019).

No presente estudo, a MEL foi eficiente em diminuir o dano lipídico nos grupos de animais com PA (PA+MEL) e T (T+MEL). Sabe-se que a MEL e seus metabolitos são importantes agentes antioxidantes exibindo propriedades anti-inflamatórias que protegem as mitocôndrias de danos por eliminar as EROs e espécies reativas de nitrogênio (NOS) (REITER *et al.*, 2018; TAN *et al.*, 2014, 2016). Sua ação ocorre por meio da estimulação de diversas enzimas antioxidantes, exibindo um importante papel na manutenção da homeostase redox celular (HACISEVSKI; BABA, 2018). No estudo de Yavuz *et al.* (2003) foi verificado que a administração de MEL (200 µg/kg/d, ip) em ratos diabéticos promoveu redução na produção

de malondialdeído (marcador de dano lipídico - MDA) e aumento na atividade da defesa antioxidante (glutathiona peroxidase – GSH).

Existem vários mecanismos pelo qual a MEL age sobre agentes oxidantes, como por exemplo, pela transferência de um único elétron, transferência de hidrogênio e formação de adutos radicais (GALANO; TAN; REITER, 2011, 2013). Além da eliminação direta de EROs e NOS, a MEL promove a estimulação de agentes antioxidantes, suprime a ação de enzimas pró-antioxidantes e melhora a função das mitocôndrias, reduzindo a formação de radicais livres.

Como citado acima, houve uma diminuição do dano lipídico nos grupos T+MEL e PA+MEL. Sabe-se que a MEL pode agir como um agente oxidante, mas é importante destacar o papel que a PA exerce sobre o processo de estresse oxidativo. Na presença de PA, observa-se a ação de agentes microbianos que desencadeiam resposta imunoinflamatória (NAIR, 2004), podendo se desenvolver em uma lesão apical osteolítica em decorrência da resposta imune à infecção endodôntica (DEZEREGA *et al.*, 2012). Nesse processo existe a formação de EROs, derivadas da ação fagocitária em resposta ao desafio bacteriano, as quais podem desregular o equilíbrio redox gerando danos teciduais (ZARAGOZA *et al.*, 2006). Estudos de Inchingolo *et al.* (2014) e de Minczykowski *et al.* (2001) demonstram que a presença de PA promove elevação do estresse oxidativo no sangue de pacientes com PA e o tratamento endodôntico diminuiu esse estresse. Ademais, Marton *et al.* (1993) observou um aumento de MDA e diminuição da atividade da GSH-PX em granulomas periapicais em comparação com o tecido gengival saudável, refletindo um desequilíbrio oxidativo. Santos *et al.* (2022) mostrou que a MEL diminui o dano lipídico (TBARS) em ratos com PA e alimentados com dieta hiperlipídica. Este dado corrobora nossos resultados que demonstraram que a MEL promoveu diminuição de TBARS em ratos com PA.

Estudos demonstram que na presença de inflamação ocorre aumento de TBARS (HONG *et al.*, 2022; BORGES *et al.*, 2015), mas no presente estudo, tanto no grupo PA como no grupo T não houve aumento. Além do mais, a associação destas duas variáveis promoveu a diminuição do dano lipídico. Este resultado paradoxal pode ser decorrente de grau inflamatório expressivo que resultou em uma acentuada atividade antioxidante. Isso pode ser constatado devido a inalteração da SOD nos grupos com periodontite apical e tabagista, provavelmente por ter sido utilizada em larga escala para mitigar o estresse oxidativo.

Considerando que as moléculas antioxidantes podem ser divididas em diferentes linhas de defesa, da primeira à quarta linha, a SOD encontra-se na primeira linha de defesa

(IGHODARO *et al.*, 2013). Esta linha de defesa age para suprimir ou prevenir a formação de radicais livres ou EROs nas células, agindo de maneira rápida para neutralizar moléculas com potencial de se tornar um radical livre ou potencializar a produção de outros radicais (IGHODARO *et al.*, 2013). Cai *et al.* (2021) descreve que os sistemas oxidantes e antioxidantes mantêm um equilíbrio dinâmico em condições fisiológicas, mas que com o aumento nos níveis de EROs há um descontrole deste dinamismo, levando à danos decorrentes do estresse oxidativo. Para entender melhor este resultado é necessário analisar outras fontes de defesas enzimáticas e não enzimáticas, sabendo que o processo de estresse oxidativo é dinâmico. Em vista disto, temos que analisar outras linhas de defesa que podem estar reduzidas e/ou elevadas, que permitirá uma maior compreensão desse resultado.

Com base nesses resultados, observamos os efeitos deletérios da PA e do tabagismo em parâmetros sistêmicos (HOMA-IR) e teciduais. Por outro lado, observamos que a MEL promove efeitos benéficos nestes parâmetros, demonstrando seu potencial como agente terapêutico e/ou preventivo em alterações sistêmicas decorrentes da PA e do tabagismo.

6. RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

Frente aos resultados encontrados pode-se observar que:

- a glicemina aumentou somente no grupo T+PA em relação ao controle;
- tanto a insulinemia e a RI foram maiores na presença de PA e tabagismo, sendo que a MEL reverteu este aumento;
- a associação da PA e do tabagismo promoveu exacerbação tanto da insulinemia como da RI, com diminuição desta alteração na presença de MEL;
- os grupos T, AP e T+PA apresentaram redução no grau de fosforilação da pp185 em tirosina, sendo que a MEL só conseguiu reverter essa alteração no grupo PA, demonstrando que o T promove uma alteração mais intensa, dificultando a ação da MEL;
- a MEL melhorou o dano lipídico nos grupos T+MEL e PA+MEL;
- não houve alteração da SOD entre os grupos estudados.

7. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a PA e T promoveram RI. A associação destas variáveis exacerbou a RI e a melatonina conseguiu reverter esta alteração. Além disso, a MEL conseguiu diminuir o dano lipídico somente nos grupos PA e T individualmente. Estes resultados demonstram a ação benéfica da MEL na sensibilidade insulínica e no estresse oxidativo, podendo ser utilizada como agente terapêutico e/ou preventivo em alterações sistêmicas e locais decorrentes da PA e do tabagismo.

REFERÊNCIAS

- AGIL, A.; NAVARRO-ALARCÓN, M.; RUIZ, R.; ABUHAMADAH, S.; EL-MIR, M. Y.; VÁZQUEZ, G. F. Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 2, p. 207-212, 2011.
- ALMEIDA, J. M.; PAZMINO, V. F. C.; NOVAES, V. C. N.; BOMFIM, S. R. M.; NAGATA, M. J. H.; OLIVEIRA, F. L. P.; MATHEUS, H. R.; ERVOLINO, E. Chronic consumption of alcohol increases alveolar bone loss. **PLoS One**, v. 15, n. 8, p. e0232731, 2020.
- AMARANATH, B. J.; DAS, N.; GRUPTA, I.; GRUPTA, R.; JOHN, B.; DEVI, M. P. Types of bone destruction and its severity in chronic periodontitis patients with tobacco smoking habit using periapical radiographs and transgingival probing: A cross-sectional study. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 24, n. 1, p.20-25, 2020.
- AMSTRUP, A. K.; SIKJAER, T., MOSEKILDE, L.; REJNMARK, L. Melatonin and skeleton. **Osteoporos International**, v. 24, p. 2919-2927, 2013.
- ASTOLPHI, R. D.; CURBETE, M. M.; COLOMBO, N. H.; SHIRAKASHI, D. J.; CHIBA, F. Y.; PRIETO, A. K.; CINTRA, L. T.; BOMFIM, S. R.; ERVOLINO, R.; SUMIDA, D. H. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. **Journal of Endodontics**, 39, n. 5, p. 648-652, 2013.
- AZUMA, M. M.; GOMES-FILHO, J. E.; ERVOLINO, E.; CARDOSO, C. B. M.; PIPA, C. B.; KAWAI, T.; CONTI, L. C.; CINTRA, L. T. A. Omega-3 fatty acids reduce inflammation in rat apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v.44, n. 11, p. 604-608, 2018.
- AZZALINI, L.; FERRER, E.; RAMALHO, L. N.; MORENO, M.; DOMÍNGUEZ, M.; COLMENERO, J.; PEINADO, V. I.; BARBERÀ, J. A.; ARROYO, V.; GINÈS, P.; CABALLERÍA, J.; BATALLER, R. Cigarette smoking exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in obese rats. **Hepatology**, v. 51, n. 5, p. 1567-1576, 2010.
- BALAJI, T. M.; RAO, S. R. Salivary, plasma, and gingival levels of melatonin and TNF- α in nonsmokers and current smokers with and without periodontal disease. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 21, n. 8, p. 897-904, 2020.
- BANDEIRA, S.; DA FONSECA, L. J.; DA S GUEDES, G.; RABELO, L. A.; GOULART, M. O.; VASCONCELOS, S. M. Oxidative stress as an underlying contributor in the development

of chronic complications in diabetes mellitus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3265-3284, 2013.

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

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

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

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

BLOCH-DAMTI, A.; BASHAN, N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 11-12, p. 1553-1567, 2005.

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

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

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

BRAINARD, G. C.; RICHARDSON, B. A.; KING, T. S.; REITER, R. J. The influence of different light spectra on the suppression of pineal melatonin content in the Syrian hamster. **Brain Research**, v. 294, n. 2, p. 333-339, 1984.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HACIŞEVKI, A.; BABA, B. An overview of melatonin as an antioxidant molecule: a biochemical approach. *In*: DRĂGOI, C. M.; NICOLAE, A. C. (Eds). **Melatonin: molecular biology, clinical and pharmaceutical approaches**. London: IntechOpen, 2018. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/62672>. Acesso em: 30 nov. 2022.

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

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

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

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

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

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

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

- KARASEK, M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. **Experimental Gerontology**, v. 39, n. 11-12, p. 1723-1729, 2004.
- KIRKEVANG, L. L.; WENZEL, A. Risk indicators for apical periodontitis. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 31, n. 1, p. 59-67, 2003.
- KITAGAWA, A.; OHTA, Y.; OHASHI, K. Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rats. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 4, p. 403-413, 2012.
- KOPA, P. N.; PAWLICZAK, R. IQOS - a heat-not-burn (HnB) tobacco product - chemical composition and possible impact on oxidative stress and inflammatory response. A systematic review. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 30, n. 2, p. 81-87, 2020.
- KOSE, O.; ARABACI, T.; KARA, A.; YEMENOGLU, H.; KERMEN, E.; KIZILDAG, A.; GEDIKLI, S.; OZKANLAR, S. Effects of melatonin on oxidative stress index and alveolar bone loss in diabetic rats with periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 5, p. e82-e90, 2016.
- KOVACIC, P.; COOKSY, A. Iminium metabolite mechanism for nicotine toxicity and addiction: Oxidative stress and electron transfer. **Medical Hypotheses**, v.64, n. 1, p. 104-111, 2005.
- KRUGER, N. J.; HAMMOND, J. B. W. Immunodetection of proteins on "Western" blots using 125 I-labeled protein A. **Methods in Molecular Biology**, v. 3, p. 409-417, 1988.
- LAN, M.; ZHANG, Y.; WAN, X.; PAN, M. H.; XU, Y.; SUN, S. C. Melatonin ameliorates ochratoxin A-induced oxidative stress and apoptosis in porcine oocytes. **Environmental Pollution**, v. 256, p. 113374, 2020.
- LEE, J. S.; CUA, D. J. Melatonin lulling Th17 cells to sleep. **Cell**, v. 162, n. 6, p. 1212-1214, 2015.
- LIMA, F. B.; MACHADO, U. F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; MORAES, S. M.; HELL, N. S.; OKAMOTO, M. M.; SAAD, M. J.; CARVALHO, C. R.; CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 6, p. e934-e941, 1998.
- LOH, K.; DENG, H.; FUKUSHIMA, A.; CAI, X.; BOIVIN, B.; GALIC, S.; BRUCE, C.; SHIELDS, B. J.; SKIBA, B.; OOMS, L. M.; STEPTO, N.; WU, B.; MITCHELL, C. A.;

TONKS, N. K.; WATT, M. J.; FEBBRAIO, M. A.; CRACK, P. J.; ANDRIKOPOULOS, S.; TIGANIS, T. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. **Cell Metabolism**, v. 10, n. 4, p. 260-272, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- PRADHAN, S.; GOEL, K. Interrelationship between diabetes and periodontitis: a review. **JNMA Journal of the Nepal Medical Association**, v. 51, n. 183, p. 144-153, 2011.
- QUAN, X.; WANG, J.; LIANG, C.; ZHENG, H.; ZHANG, L. Melatonin inhibits tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in skeletal muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 463, n. 4, p. 1102-1107, 2015.
- RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, n. 5, p. 567-575, 2011.
- RASMUSSEN, D. D.; MARCK, B. T.; BOLDT, B. M.; YELLON, S. M.; MATSUMOTO, A. M. Suppression of hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) gene expression by daily melatonin supplementation in aging rats. **Journal of Pineal Research**, v. 34, n. 2, p. 127-133, 2003.
- REHMAN, K.; AKASH, M. S. Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance: how are they interlinked? **Journal of Biomedical Science**, v. 23, n. 1, p. 87, 2016.
- REITER, R. J.; TAN, D. X.; ROSALES-CORRAL, S.; GALANO, A.; ZHOU, X. J.; XU, B. Mitochondria: central organelles for melatonin's antioxidant and anti-aging actions. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 509, 2018.
- REPINE, J. E.; BAST, A.; LANKHORST, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, n. 2 Pt 1, p. 341-357, 1997.
- ROBERTS, C. K.; HEVENER, A. L.; BARNARD, R. J. Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 1, p. 1-58, 2013.
- RÔÇAS, S. I. N.; SIQUEIRA, J. F.; DEL AGUILA, C. A.; PROVENZANO, J. C.; GUILHERME, B. P.; GONÇALVES, L. S. Polymorphism of the CD14 and TLR4 genes and post-treatment apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 2, p. 168-172, 2014.
- RODRIGUEZ, F. R.; TANER, B.; WEIGER, R.; WALTER, C. Is smoking a predictor of apical periodontitis? **Clinical Oral Investigations**, v. 17, n. 8, p. 1957-1959, 2013.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WANG, X.; LIANG, T.; ZHU, Y.; QIU, J.; QIU, X.; LIAN, C.; GAO, B.; PENG, Y.; LIANG, A.; ZHOU, H.; YANG, X.; LIAO, Z.; LI, Y.; XU, C.; SU, P.; HUANG, D. Melatonin prevents bone destruction in mice with retinoic acid-induced osteoporosis. **Molecular Medicine**, v. 25, n. 1, p. 43, 2019.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXOS

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação do efeito da melatonina sobre a sensibilidade insulínica, via de sinalização da insulina e estresse oxidativo em ratos com periodontite apical submetidos à inalação passiva de tabaco**", Processo FOA nº 0204-2021, 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 29 de Abril de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 15 de Maio de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 15 de Junho de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of the melatonina effects on insulin sensitivity, insulin signaling pathway and oxidative stress in rats with apical periodontitis submitted to passive inhalation of tobacco**", Protocol FOA nº 0204-2021, 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 April 29, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 15, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 15, 2023.

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 b1 ou superior (CBII)

01/03/2022 13:21 ScholarOne Manuscripts

Journal of Periodontology

Home

Author

Review

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to
Journal of Periodontology

Manuscript ID
JOP-22-0139

Title
Effect of maternal true combined endodontic-periodontal lesion on insulin and inflammatory pathway in adult offspring

Authors
Belardi, Bianca Elvira
Matters, Maria Sara de Lima Coutinho
Tsosura, Thaís Verônica Saori
Santos, Rodrigo
Cantiga da Silva, Cristiane
Tavares A Cintra, Luciano
Yamamoto Chiba, Fernando
Teschi Bravo, Lara
Ramos Carvalho, Nubia
Carnevali, Ana Carolina
Akira Fujii de Oliveira, Renan
Ervolino, Edilson
Matsushita, Doris

Date Submitted
01-Mar-2022

<https://mc.manuscriptcentral.com/jperio> 1/2