



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Sofia Cardoso Göergen

**EFEITO DA MELATONINA NO OSSO ALVEOLAR DE RATOS COM
DOENÇA PERIODONTAL E PINEALECTOMIZADOS**

**Araçatuba
2020**

Sofia Cardoso Göergen

**EFEITO DA MELATONINA NO OSSO ALVEOLAR DE
RATOS COM DOENÇA PERIODONTAL E
PINEALECTOMIZADOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” UNESP, campus de Araçatuba-SP, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Titular Dóris Hissako Matsushita

**Araçatuba
2020**

*O sonho começou com a odontologia, depois de anos de preparo ingressei na universidade que sempre sonhei, a FOA, uma instituição mais que exemplar. Nada disso seria possível sem o apoio de minha família, em especial, minha mãe **Valéria Faria Cardoso**, a mulher mais incrível que conheço, sonhou comigo, me incentivou e me amparou em cada momento de dificuldade, meu irmão **João Vitor Cardoso Clementino**, que sempre foi a calma e serenidade em minha vida. Dedico esse trabalho a vocês.*

Dedico também à minha família materna e paterna, que mesmo longe sempre estiveram acreditando e torcendo por mim.

Aos meus amigos de Alto Araguaia que sempre estiveram ao meu lado mesmo não sendo fisicamente e aos amigos de Araçatuba que se tornaram minha família nesse período longe de casa.

E aos meus professores que me ampararam e promoveram a minha formação como profissional e como ser humano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia de Araçatuba** pelo exímio trabalho formador, sou muito grata por ter feito parte dessa história.

Agradeço também ao **Departamento de Ciências Básicas FOA – UNESP**.

À minha orientadora, professora Dr^a **Dóris Hissako Matsushita**, por todo conhecimento compartilhado durante o tempo de produção do trabalho de conclusão de curso que também ao ministrar a disciplina de Fisiologia Humana que me ajudou a realizar esse trabalho. Obrigada por tantos ensinamentos.

Ao professor Dr. **Fernando Chiba** e a Dr^a **Maria Sara de Lima Cutinho Mattera**, pelo apoio para a produção deste trabalho.

À professora Dr^a **Roberta Okamoto**, por aceitar a fazer parte da banca desse trabalho e por todos os conhecimentos compartilhados durante a graduação.

Aos professores da FOA-UNESP que sempre tiveram muito prazer em compartilhar conhecimento. Fizeram a diferença em minha vida acadêmica e me deixou mais apaixonada pela profissão.

Aos funcionários da **Sessão de Triagem da FOA – UNESP**, que muito me ajudaram em meus anseios durante a graduação, fizeram do meu período como estagiária muito feliz.

Aos meus orientadores na monitoria, Dr. **Renato Salviato Fajardo** e Dr^a **Débora Barros Barbosa**, vocês foram importantíssimos para o meu crescimento acadêmico-profissional.

À minha família e amigos que estiveram comigo ao longo dessa trajetória me dando muita força. Agradeço à minha mãe **Valéria**, ao meu irmão **João Vitor**, que estiveram 100% presente em todos os momentos em que passei por esta instituição, vocês foram o pilar de tudo, minha força e motivação. Aos meus tios **Fábio**, **Weliton**, **Fabrcio** e **Ana Gláucia**, à minha avó **Leila**, ao meu pai **Person**, ao meu irmão **Félix** e aos meus queridos avós *in memoriam* **Antônio**, **Luzia** e **Nelson**. Agradeço aos meus amigos **Marcelo**,

Mariana Barbosa, Maria Luiza, Mariana Garcia, Artur, Anne Carolyne, Milena, Ulisses, Alander, Walter, Vanilda e Conceição.

“UBUNTU. Eu sou porque nós somos.”

Filosofia Africana

Göergen, S.C. **Efeito da melatonina no osso alveolar de ratos com doença periodontal e pinealectomizados**. 2020. 35p. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

Pesquisas têm sido realizadas sobre a correlação entre inflamações crônicas da cavidade oral, como a doença periodontal (DP), e alterações sistêmicas. A DP tem como definição uma infecção e inflamação oral que afeta tecidos gengivais e de suporte e está ligada à produção de citocinas inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF- α), essa citocina aumenta a expressão de osteoclastos, os quais levam a um aumento na reabsorção óssea alveolar. Em geral, as pesquisas têm mostrado que a melatonina pode diminuir a reabsorção óssea devido a este hormônio possuir ações antioxidantes e imunomoduladoras, podendo desempenhar um importante papel no tratamento de doenças da cavidade bucal. Desse modo, o objetivo desse estudo foi analisar o efeito da suplementação da melatonina na reabsorção óssea alveolar em ratos com doença periodontal e pinealectomizados (PNX). Para tanto, 80 ratos Wistar machos com 40 dias de idade foram distribuídos aleatoriamente em 8 grupos (n=10); controle (CN), doença periodontal (DP), pinealectomizados (PNX), pinealectomizados com doença periodontal (PNXDP), controle com melatonina (CNMEL), doença periodontal com melatonina (DPMEL), pinealectomizados com melatonina (PNXMEL), pinealectomizados com doença periodontal e com melatonina (PNXDPMEL). Após 20 dias da pinealectomia, a doença periodontal foi induzida por fios de seda ao redor dos primeiros molares inferiores. Após 28 dias da indução, foram avaliadas as concentrações plasmáticas de TNF- α e histomorfometria da região com DP pelo escaneamento no microtomógrafo em 3D (Micro-CT) (modelo 1172 SkyScan®). As análises adotadas foram: análises estatísticas de variância Three-way (ANOVA), teste de Tukey. O nível de significância foi de 5% (alfa=5%). Todos os grupos com DP apresentaram maior perda óssea alveolar em relação aos grupos controle. A pinealectomia não promoveu uma maior reabsorção óssea em relação aos grupos controle. Ademais a

pinealectomia associada à doença periodontal não promoveu maior perda óssea alveolar em relação ao grupo com DP. Em relação à concentração plasmática de TNF- α , tanto a pinealectomia como a doença periodontal promoveram um aumento no valor desse parâmetro. Os grupos que foram suplementados com melatonina, não apresentaram perda óssea alveolar e valores plasmáticos de TNF- α semelhante ao grupo controle.

Palavras-chave: Melatonina. Doença periodontal. Inflamação. Reabsorção óssea.

Göergen, S.C. **Effect of melatonin on the alveolar bone of rats with periodontal disease and pinealectomized.** 2020. 35p. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

Research has been carried out on the correlation between chronic inflammation of the oral cavity, such as periodontal disease (PD), and systemic changes. PD is defined as an infection and oral inflammation that affects gingival and support tissues and is linked to the production of inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF- α), this cytokine increases the expression of osteoclasts, which lead to an increase in alveolar bone resorption. In general, research has shown that melatonin can decrease bone resorption due to this hormone and has antioxidant and immunomodulatory actions, which can perform an important role in the treatment of diseases of the oral cavity. Thus, the aim of this study was to analyze the effect of melatonin supplementation on alveolar bone resorption in rats with periodontal disease and pinealectomized (PNX). For this purpose, 80 male Wistar rats aged 40 days were randomly assigned to 8 groups (n = 10); control (CN), periodontal disease (PD), pinealectomized (PNX), pinealectomized with periodontal disease (PNXDP), melatonin control (CNMEL), periodontal disease with melatonin (DPMEL), pinealectomized with melatonin (PNXMEL), pinealectomized with periodontal disease and with melatonin (PNXDPMEL). After 20 days of pinealectomy, periodontal disease was induced by silk threads around the lower first molars. After 28 days of induction, plasma TNF- α concentrations and histomorphometry of the PD region were evaluated by scanning on the 3D microtomograph (Micro-CT) (model 1172 SkyScan®). The analyzes adopted were the statistical analysis of variance Three-way (ANOVA), Tukey's test. The level of significance was 5% (alpha = 5%). All groups with PD had greater alveolar bone loss compared to the control groups. Pinealectomy did not promote greater bone resorption compared to control groups. In addition, pinealectomy associated with periodontal disease did not promote greater alveolar bone loss compared to the PD group. Regarding the plasma concentration of TNF- α , both pinealectomy and

periodontal disease promoted an increase in the value of this parameter. The groups that were supplemented with melatonin, didn't present alveolar bone loss and the plasma TNF- α values similar to the control group.

Keywords: Melatonin. Periodontal disease. Inflammation. Bone resorption.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Concentração plasmática de TNF- α	23
Figura 2 - Medidas volumétricas.....	24
Figura 3 - Medidas lineares.....	26
Figura 4 - Imagens representativas do primeiro molar, bidireccionalmente, de todos os grupos.....	27
Figura 5 - Imagem 3D de reconstrução representativa dos primeiros molares de todos os grupos.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa (letra grega)
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celcius
m	Micro
μg	Micro grama
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
ANOVA	Análise de Variância
DP	Doença periodontal
g	Gramma
h	Hora
IML	Coluna Intermédio Lateral da Medula Espinhal
i.v	Intra Venoso
L	Litro
LPS	Lipopolissacarídeo Bacteriano
MEL	Melatonina
NF-Kb	Fator Nuclear Kappa B
Nm	Nanômetro
PNX	Pinealectomizados
RANK	Receptor Ativador de NF-Kb
RANK-L	Ligante de RANK
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
U.I.	Unidade Internacional

SUMÁRIO

1	Introdução.....	14
2	Hipótese.....	17
3	Objetivos.....	18
4	Materiais e métodos.....	19
4.1	Animais.....	19
4.2	Delineamento experimental.....	19
4.3	Avaliação do consumo de ração e evolução da massa corporal dos animais.....	20
4.4	Pinealectomia.....	20
4.5	Doença periodontal.....	20
4.6	Administração de melatonina.....	21
4.7	Coleta de sangue e tecidos.....	21
4.8	Concentrações plasmáticas de TNF- α	21
4.9	Análise histomorfométrica por Micro-CT.....	21
4.10	Análise estatística.....	22
5	Resultados.....	23
5.1	Avaliação da massa corpórea.....	23
5.2	Avaliação de ingestão alimentar.....	23
5.3	Avaliação das concentrações plasmáticas de TNF- α	23
5.4	Análise histomorfométrica em Micro-CT.....	24
6	Discussão.....	29
7	Conclusão.....	32
	Referências.....	33

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é responsável por grande parte da perda dentária em adultos (ASSUMA et al., 1998), sendo caracterizada por infecções locais e condições inflamatórias envolvendo bactérias gram negativas que afetam diretamente as estruturas de suporte dentário como osso alveolar, ligamento periodontal, gengiva e cemento (SOUMYA et al., 2014). A destruição óssea causada pela DP é progressiva e dependente de uma resposta do hospedeiro perante o biofilme dentário subgengival (PARVEEN, 2013).

A etiologia da DP vem principalmente de bactérias anaeróbias gram negativas dos gêneros *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia*, que liberam endotoxinas de suas paredes bacterianas, como o LPS (lipopolisacarídeos) (RASLAN et al., 2011), com isso, geram uma resposta imune no hospedeiro que começa a produzir citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas, elaborando enzimas líticas ativando os osteoclastos. (ASSUMA et al., 1998). Por meio da resposta antigênica do hospedeiro células T-CD4 são ativadas, proliferadas e diferenciadas em células efetoras distintas e específicas para cada função, bem como para a produção de citocinas. Uma dessas células são os linfócitos TH1 que são caracterizados principalmente pela produção de interferon e TNF- α , envolvidos na erradicação de patógenos intracelulares e destruição nos tecidos de suporte dentário, respectivamente. (HERNADÉZ, et al., 2011).

Deve-se destacar que por meio de citocinas inflamatórias originadas a partir do lipopolisacarídeo (LPS) bacteriano, ocorre o processo de reabsorção óssea na DP. Esses mediadores têm interação entre o ativador do receptor do fator nuclear kB (RANK) e o seu ligante RANKL, os quais são membros da família fator necrose tumoral (TNF). O RANKL é expresso pelas células B e T osteoblásticas, as quais se ligam diretamente ao RANK localizado em precursores de osteoclastos (ARABACI et al., 2015). Assim, tem-se que a melatonina, a qual controla os fatores inflamatórios e oxidativos, ocasiona uma menor perda óssea devido a menor quantidade de osteoclastos. (AMSTRUP et al. 2013). Além da influência do TNF- α na perda de suporte dentário, estudos têm apontado que a falta de melatonina também pode contribuir para uma maior reabsorção óssea (EGERMANN et al., 2011).

A melatonina é uma indolamina sintetizada, principalmente, pela glândula pineal. Os panielócitos são os responsáveis pela produção da MEL, captam triptofano do sangue e transformam em serotonina por meio dos processos de descarboxilação e hidroxilação. O período noturno é o mais importante para a síntese de MEL, pois é nesse momento que enzima N-acetiltransferase transforma a serotonina em N-acetil-serotonina e esta é transformada em melatonina pela enzima hidroxiindol-O-metiltransferase. A MEL é liberada durante o ciclo noturno por meio de ativação pós-sináptica com receptores beta-adrenérgicos. (CUTANDO, 2014).

A melatonina não é produzida exclusivamente pela glândula pineal, segundo Acuña-Castroviejo (2014), outros tecidos como retina, cerebelo, mucosa intestinal, coração, músculo esquelético, placenta, também sintetizam MEL, porém em quantidades menores. Markus, Cecon e Pires-Lapa (2013) também correlacionaram a produção de melatonina pelas células inflamatórias via eixo imune-pineal por meio do NF-kB, o qual media a mudança de produção de MEL pelos panielócitos por células imunocompetentes. Estima-se que esta melatonina nos tecidos é produzida para controlar o estresse oxidativo com espécies reativas de oxigênio e danos inflamatórios. A sua produção por pinealócitos é inibida na presença de luz que também são sensíveis a variações de intensidade, alterando assim a formação de melatonina. (CUTANDO, 2014). Desta forma, volta-se a atenção para trabalhadores noturnos, os quais têm a secreção de melatonina pela glândula pineal diminuída, afetando assim a qualidade de vida dos mesmos (BURCH et al., 2005). Além de atuar no controle do estresse oxidativo e anti-inflamatórios (CUTANDO, 2014), a literatura nos mostra que a melatonina também atua na temperatura corpórea, ciclo circadiano (FOLKARD, 2008), formação óssea, (AMSTRUP, 2013), propriedade imunomoduladoras (GUERRERO, REITER, 2002) e antitumorais (DAWSON, ARMSTRONG, 1996).

Portanto, a melatonina pode influenciar o processo de desenvolvimento da doença periodontal pelo fato de apresentar atuação no controle de processos como: estresse oxidativo, antiinflamatórios, imunomoduladores e de formação óssea, podendo diminuir os efeitos inflamatórios da infecção, gerando uma redução na perda de tecidos de suporte dentário e ajudando na formação óssea local. (ARABACI et al., 2015)

Com o exposto entende-se que a MEL tem grande importância no processo de reabsorção e remodelação óssea. Quando há DP, a redução desse hormônio proporciona um desequilíbrio nos processos, aumentando assim a reabsorção óssea. Contudo, é importante avaliar melhor os efeitos da redução e da suplementação da melatonina em associação a DP no metabolismo ósseo, citocinas e mediadores inflamatórios.

2. HIPÓTESE

Devido à deficiência de melatonina, a pinealectomia poderia ocasionar maior perda do osso alveolar com ou sem a indução da doença periodontal.

A pinealectomia associada à doença periodontal poderia ocasionar um efeito sinérgico na perda óssea alveolar.

A melatonina pode reverter as alterações no osso alveolar nos grupos com doença periodontal e pinealectomizados.

3. OBJETIVOS

Analisar o efeito da suplementação de melatonina na concentração plasmática de citocina inflamatória TNF- α e no metabolismo ósseo em ratos pialectomizados com ou sem doença periodontal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 80 ratos Wistar machos, pesando aproximadamente 200g, com 40 dias de idade, originários do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA – UNESP. Os mesmos foram mantidos em ciclos de 12/12 horas de claro e escuro, com temperatura de 23°C com diferença de mais ou menos 2°C, acesso à água e comida a vontade, exceto nas 14 horas precedidas do procedimento experimental.

No experimento, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália, Itapira, Brasil, 3%, 50mg/kg, intraperitoneal) antecedido pela aplicação de anestésico bloqueador regional (Lidocaína, Cristália, Itapira, Brasil, 4mg/kg, intraperitoneal), 10 minutos antes da aplicação com barbitúrico. Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética local de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e foi aprovada pelo CEUA – Protocolo FOA n00544-2016.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os ratos foram separados em 8 grupos (n=10) sendo:

- 1- controle (CN);
- 2- com doença periodontal (DP);
- 3- pinealectomizados (PNX);
- 4- pinealectomizados e com doença periodontal (PNXDP);
- 5- controle suplementados com melatonina (CNMEL);
- 6- com doença periodontal e suplementados com melatonina (DPMEL);
- 7- pinealectomizados e suplementados com MEL (PNXMEL), e
- 8- pinealectomizados com doença periodontal suplementados com melatonina (PNXDPMEL).

Os animais pinealectomizados (grupos PNX, PNXDP, PNXMEL e PNXDPMEL) foram submetidos à cirurgia aos 40 dias de idade. Os animais com doença periodontal (grupos DP, PNXDP, DPMEL e PNXDPMEL) foram submetidos à indução da doença aos 60 dias de idade. A suplementação com melatonina dos grupos CNMEL, DPMEL, PNXMEL e PNXDPMEL foi iniciada juntamente com a indução da doença periodontal aos 60 dias de idade com

duração de 28 dias. A eutanásia dos animais ocorreu entre 14h e 16h. Foram coletadas amostras de sangue para avaliar as concentrações de TNF- α .

4.3 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO E EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS

A avaliação foi realizada três vezes por semana, utilizando uma balança digital (0 a 5 kg, Filizola®), calculando a média semanal. O consumo de ração foi analisado pelo o quanto foi oferecido e quanto sobrou, a média foi extraída e transformada em gramas por 100g de peso corporal.

4.4 PINEALECTOMIA

Os grupos que sofreram a pinealectomia (grupos PNX, PNXDP, PNXMEL e PNXDPMEL) foram anestesiados com Cloridrato de Quetamina (10%, 80mg/kg, intraperitoneal) e Xilazina (2%, mg/kg, intraperitoneal) e submetidos à cirurgia seguindo os parâmetros de (HOFFMAN; REITER, 1965), em seguida, realizou-se uma trocotomia no topo da cabeça dos animais, que foram fixados em um aparelho estereotáxico. Após a retirada do pêlo sobre o escalpo e assepsia com álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal e o tecido subcutâneo foi afastado para visualizar o lãmbda, realizando raspagem das articulações fibrosas entre os ossos parietais e os interparietais expostos, neste local foi realizada osteotomia de 4,5mm de diâmetro. Em seguida, o seio venoso foi identificado. Com o auxílio de uma pinça, foi retirada a glândula pineal encontrada logo abaixo desse seio. Posteriormente o fragmento de osso foi reposicionado, e o animal retirado do aparelho esteotáxico. A pele foi suturada com fio de seda 4-0. Após a cirurgia foi injetado 0,2mL de antibiótico (associação de penicilina com estreptomicina 1.200.000 UI) por via intramuscular. Depois da cirurgia os ratos voltaram às situações normais de experimento.

4.5 DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal foi induzida aos 60 dias de idade, 20 dias após a realização da pinealectomia nos grupos DP, PNXDP, DPMEL, PNXDPMEL. Os ratos foram anestesiados com Ketamina (10%, 80mg/kg) e Xilazina (2%, 10mg/kg) via intraperitoneal e a DP foi induzida por um fio de seda 4-0 (Seda

Silk Trancada Ethicon-Johnson & Johnson®) em seu sulco gengival, nos molares inferiores, bilateralmente, conforme descrito por Rodini et al., (2008).

4.6 ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA

Os ratos dos grupos CNMEL, DPMEL, PNXMEL E PNXDPMEL receberam melatonina (Melatonin®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) via oral solubilizado em água no período escuro, iniciado às 19h e encerrado às 07h na dosagem de 5 mg/kg durante 28 dias. A MEL foi diluída 1g em 20ml de etanol absoluto (2%) com mais 980 ml de água resultando um volume final de 1L, a mesma foi solubilizada nos bebedouros, quantificadas por cada animal com referido peso. Considerando o consumo de água durante o período escuro, obteve-se a equação: peso x quantidade de água / consumo de água x dose de melatonina (5mg/kg). Nos animais que não receberam o tratamento com MEL, apenas foi inserido 20ml de etanol absoluto diluído com 980 ml de água em seus bebedouros.

4.7 COLETA DE SANGUE E TECIDOS (MANDÍBULAS)

Anestesiados (Thiopentaz® – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/100g, intraperitoneal), após 29 dias da indução da DP e tratamento com MEL, realizou-se lapatomia media, coletando sangue pela cava inferior, as amostras foram transferidas para tubos heparinizados e mantidas à 4°C até o dia das análises da concentração plasmática de TNF- α . Após eutanásia, foi retirado o tecido mole das hemimandíbulas que estavam desarticuladas e preparadas. As hemimandíbulas foram fixadas em solução salina (9%) e mantidas a 4°C para o processamento histomorfométrico.

4.8 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE TNF- α

Foram determinadas as concentrações de TNF- α pelo método de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*®) com a utilização de kit (Biosource® International, Camarillo, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.9 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA POR MICRO-CT

Após a eutanásia, as hemimandíbulas, que estavam fixadas em solução salina a 9% e matidas a 4°C, foram submetidas à microtomografia óssea, feita por um microtomógrafo Skyscan 1172 (Skyscan®, Aartselaar, Bélgica, 2003), usado para observar estruturas ósseas tridimensionais. O escaneamento foi feito com 6µm pixel de tamanho, 70kV e 200µA para configuração de fonte, filtro de alumínio de 0.5mm, 185 graus de rotação e 0.4 graus de passo. Foram analisadas as áreas dos molares de interesse, sendo elas: 1 cm anteriormente ao primeiro molar inferior e 1 cm após ao último molar inferior.

Posteriormente, realizou-se a reconstrução com o software NRecon (Skyscan®, Bélgica), do ápice da coroa até o processo ósseo alveolar para análise tridimensional (3D), utilizando-se do software CTAN v.1.5.0 (Skyscan®). Analisaram-se, no eixo sagital, as áreas de interesse, com 80 slices que foram interpolados por uma figura geométrica de um retângulo, permitindo o cálculo 3D dos índices volumétricos. Os parâmetros foram: Medidas volumétricas = BV/TV (%) (volume ósseo pelo volume tecidual); BS/BV (1/mm) (razão entre superfície óssea com volume ósseo); Tb.Th (mm) (espessura trabecular); Tb.N(mm-1) (número de trabéculas por mm de tecido); Tb.Sp (mm) (separação trabecular); Po total (%) (porosidade total).

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

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas por variância Three-way (ANOVA), em seguida por Turkey quando houve variância significativa nos grupos ($p < 0,05$). O programa estatístico usado foi Graph Pad Prism (versão 7.0.). Os resultados apresentando tiveram uma média EPM e o nível de significância foi de 5% ($\alpha = 5\%$).

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA MASSA CORPÓREA

A massa corpórea de todos os ratos foi analisada semanalmente, durante os 28 dias de tratamento, a partir da indução da doença periodontal. Os resultados mostraram que não houve diferenças estatísticas significativas durante todo o período experimental entre os grupos avaliados. Os valores foram feitos como média \pm EPM de cada grupo (n=10), ANOVA (Three-way) com pós-teste de Tukey.

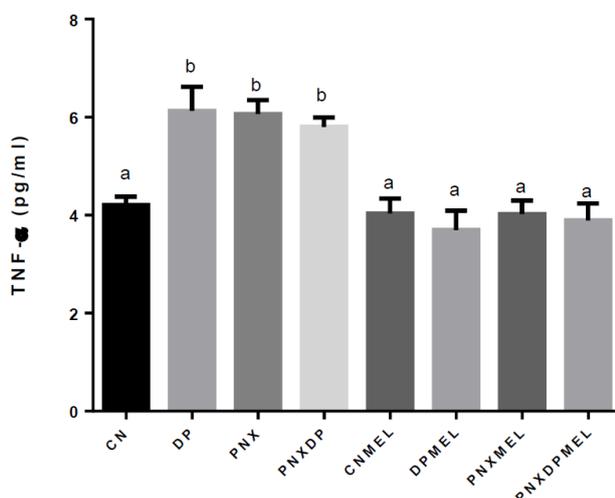
5.2 AVALIAÇÃO DE INGESTÃO ALIMENTAR

Semanalmente a ingestão alimentar dos grupos (n=10) foi avaliada, durante os 28 dias de tratamento a partir da indução da DP. Os resultados demonstraram que não houve diferenças significativas nos valores desse parâmetro entre os grupos avaliados. Os valores foram feitos como média \pm EPM de cada grupo (n=10), ANOVA (Three-way) com pós-teste de Tukey.

5.3 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE TNF- α

Observou-se que nos grupos, DP, PNx, e PNxDP houve um aumento significativo quando comparado com os demais grupos ($p < 0.05$). Os valores foram feitos como média \pm EPM de cada grupo (n=10), ANOVA (Three-way) com pós-teste de Tukey.

FIGURA 1- Tabela concentração plasmática de TNF- α



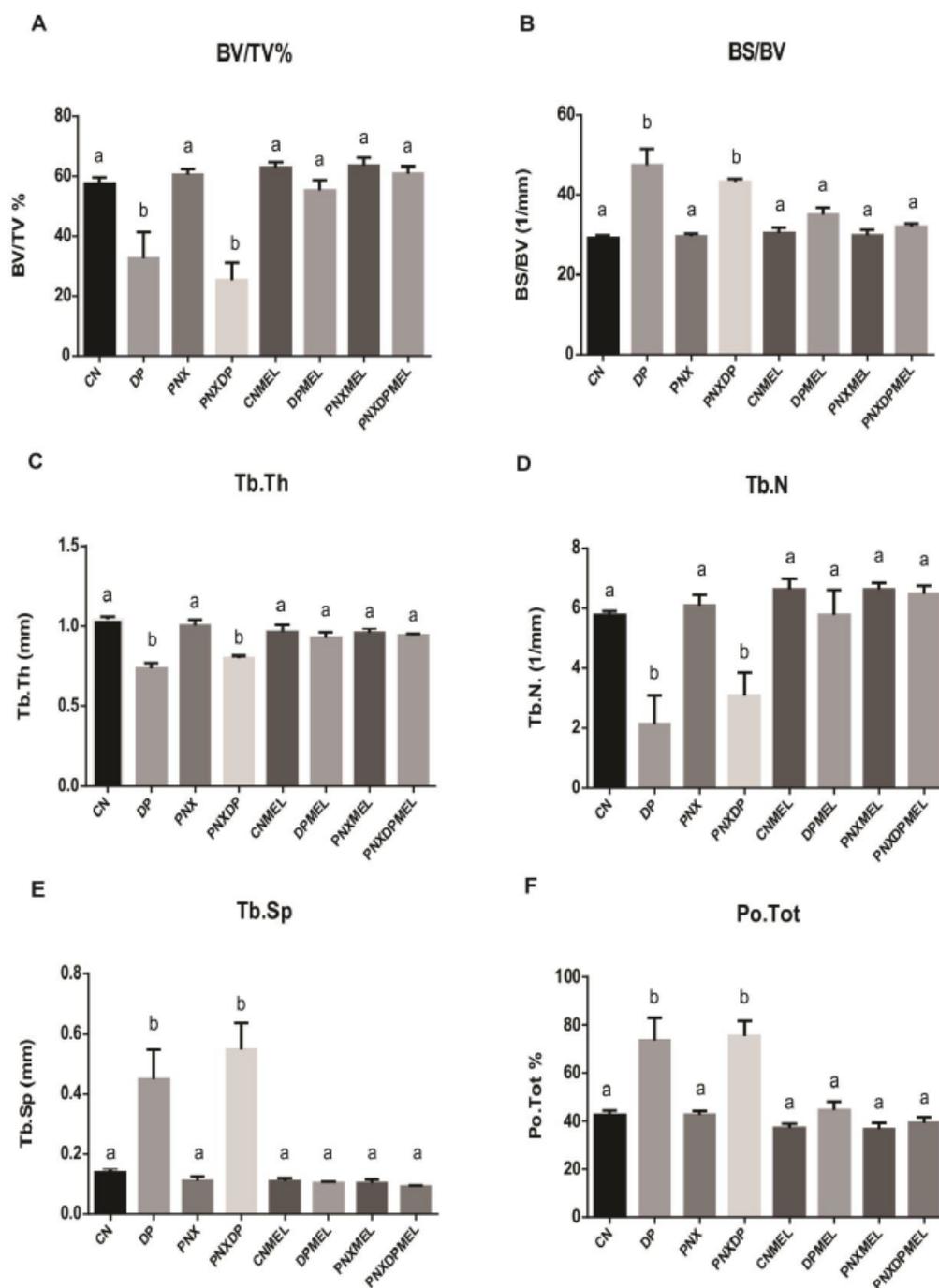
Grupo controle (CN), com Doença Periodontal (DP), Pinealectomizados (PNX), Pinealectomizados com Doença Periodontal (PNXDP), controle suplementados com MEL (CNMEL), com doença Periodontal suplementados com MEL (DPMEL), Pinealectomizados suplementados com MEL (PNXMEL) e Pinealectomizados com Doença Periodontal suplementados com MEL (PNXDPMEL). Os valores são apresentados como média e \pm EPM de cada grupo (n=06), ANOVA (Three-way) com pós-teste de Tukey. Resultados com a letra mostraram diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

5.4 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA EM MICRO-CT

Segundo as análises de medidas volumétricas pelo micro-CT (Figura 2), os grupos DP e PNXDP apresentaram uma diferença estatística considerável em relação aos demais grupos em todas as variáveis (Volume ósseo percentual – BV/TV, razão entre superfície óssea e volume – BS/BV, espessura trabecular – Tb.Th, número de trabéculas – Tb.N, separação trabecular – Tb.Sp e porosidade total – Po.Tot.) Nas análises BV/TV, Tb.Th, Tb.N, esses grupos (DP e PNXDP) tiveram valores reduzidos em comparação aos demais. Por outro lado, esses mesmos grupos (DP e PNXDP) apresentaram valores superiores aos outros nas variáveis BS/BV, Tb.Sp, Po.Tot, corroborando assim com as imagens (Figuras 3 e 4) de perda óssea alveolar.

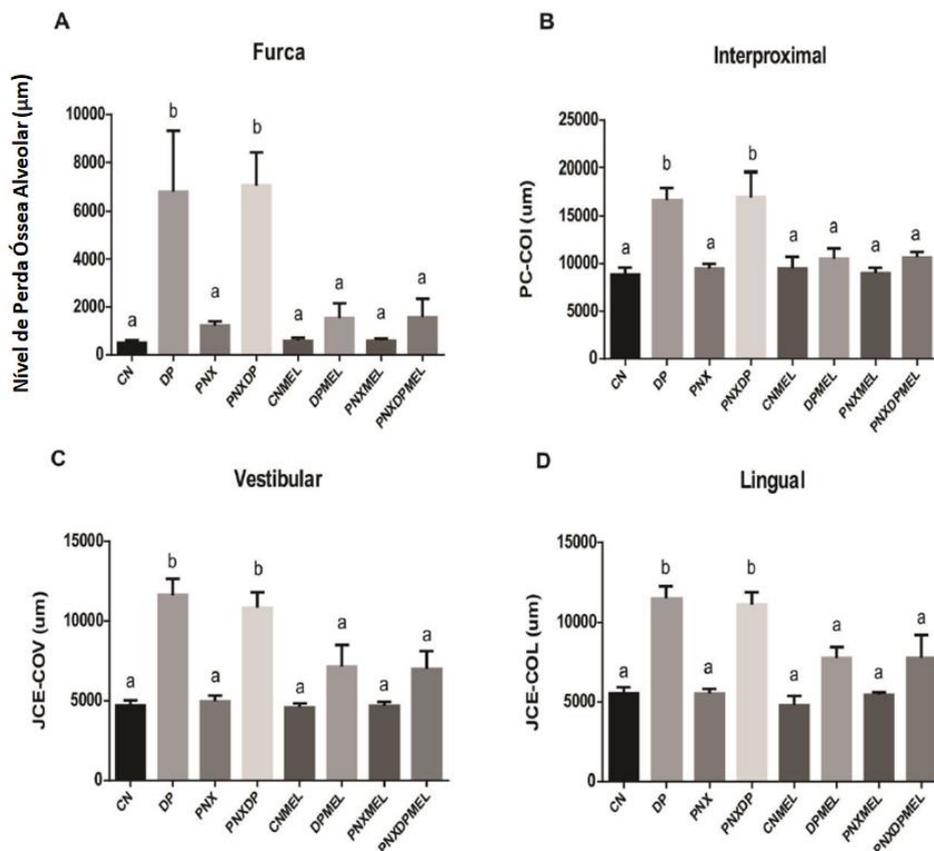
Já nas análises de medidas lineares, as imagens confirmam mais uma vez (Figura 3) que houve perda óssea em todos os locais medidos nos grupamentos DP e PNXDP, como furca, ponto de contato entre primeiro e segundo molar à crista óssea alveolar, distância da junção cimento esmalte à crista óssea alveolar por vestibular e por lingual. Todos os resultados corroboram as imagens (Figura 3 e 4) de perda óssea.

FIGURA 2. Medidas volumétricas



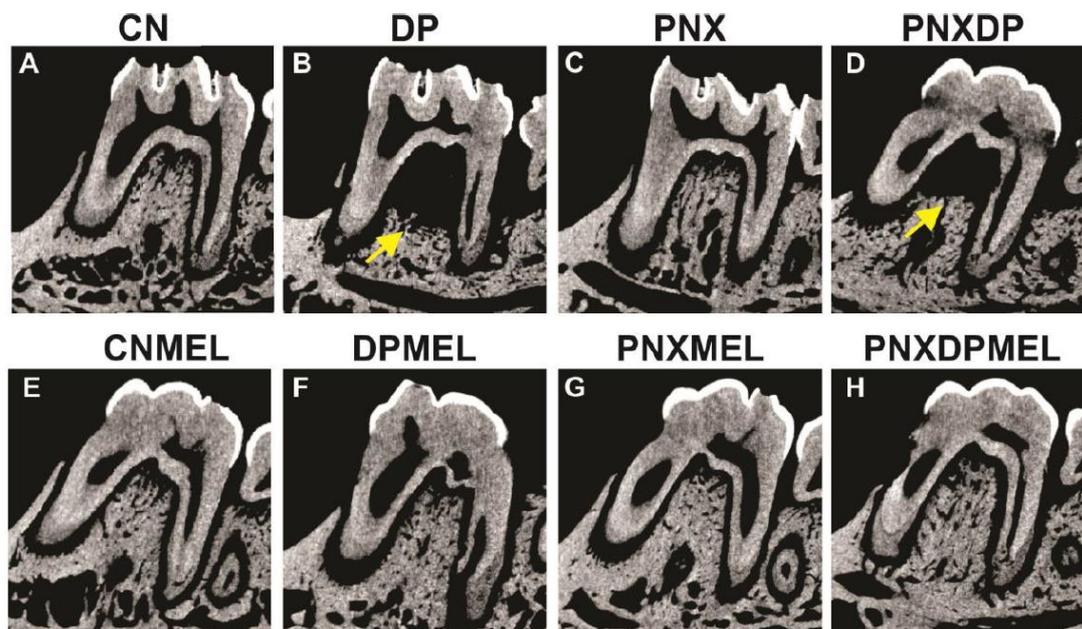
Grupo controle (CN), com Doença Periodontal (DP), Pinealectomizados (PNX), Pinealectomizados com Doença Periodontal (PNXDP) controle suplementados com MEL (CNMEL), com doença Periodontal suplementados com MEL (DPMEL), Pinealectomizados suplementados com MEL (PNXMEL) e Pinealectomizados com Doença Periodontal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

FIGURA 3. Medidas lineares



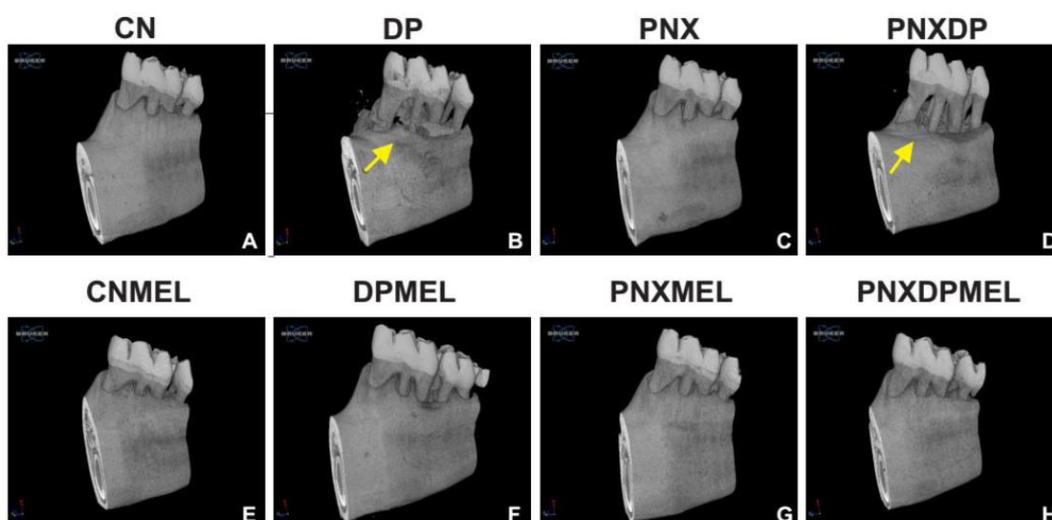
Grupo controle (CN), com Doença Periodontal (DP), Pinealectomizados (PNX), Pinealectomizados com Doença Periodontal (PNXDP) controle suplementados com MEL (CNMEL), com doença Periodontal suplementados com MEL (DPMEL), Pinealectomizados suplementados com MEL (PNXMEL) e Pinealectomizados com Doença Periodontal suplementados com MEL (PNXDPMEL). Os valores são apresentados como média e \pm EPM de cada grupo (n=06), ANOVA (Three-way) com pós-teste de Tukey. (A) Região da furca; (B) PC-COI= ponto de contato entre 1º molar (M1) e 2º molar (M2) à crista óssea alveolar interproximal; (C) JCE-COV= distância da junção cimento-esmalte à crista óssea por vestibular e (D) JCE-COL= distância da junção cimento-esmalte à crista óssea por lingual. As letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos ($p < 0,05$).

FIGURA 4. Imagens representativas do primeiro molar, bidireccionalmente, de todos os grupos.



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

FIGURA 5. Imagem 3D de reconstrução representativa dos primeiros molares de todos os grupos.



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

6. DISCUSSÃO

Todos os grupos com DP apresentaram maior perda óssea alveolar em relação aos grupos controle. A pinealectomia não promoveu uma maior reabsorção óssea em relação aos grupos controle. Ademais, a pinealectomia associada à doença periodontal não promoveu maior perda óssea alveolar em relação ao grupo com DP. Em relação à concentração plasmática de TNF- α , tanto a pinealectomia como a doença periodontal promoveram um aumento no valor desse parâmetro. Os grupos que foram suplementados com melatonina não apresentaram perda óssea alveolar e valores plasmáticos de TNF- α semelhante ao grupo controle.

Todos os grupos, ao longo do experimento, não apresentaram alteração significativa no peso corpóreo, corroborando o estudo de Alonso-Vale et al. (2004), o qual demonstrou que a pinealectomia dos ratos não altera o peso corpóreo.

A ingestão alimentar dos ratos pinealectomizados também se manteve sem alterações significativas. Entretanto, estudos apontam que a MEL pode influenciar na quantidade de ingestão de alimentos por mamíferos. No trabalho de Montano et al. (2010) verificou-se que a suplementação com melatonina, após 4 semanas, os ratos tiveram sua frequência alimentar diminuída, devido a este hormônio promover uma sensação de saciedade.

O presente estudo mostrou que houve o aumento do mediador inflamatório TNF- α , tanto nos grupos pinealectomizados (PNX) como nos grupos com doença periodontal (DP, PNXDP), corroborando assim com os estudos de Hernández et al. (2011).

O TNF- α é induzido pela via de sinalização RANKL, está envolvida na produção e maturação dos osteoclastos e também na reabsorção óssea. Esse sistema é controlado por citocinas pró-inflamatórias e produtos das espécies reativas de oxigênio, o qual se inclui o TNF- α . Em grupos com doença periodontal e suplementados com MEL, mostrou níveis reduzidos de RANKL, conseqüentemente de TNF- α e ausência de perda óssea alveolar (ARABACI et al., 2015). A partir dos resultados, a MEL mostrou-se efetiva como redutora de TNF- α , ajudando assim na diminuição da perda óssea alveolar, impedindo a osteoclastogênese.

Em um estudo de Willians, Bernstein e Prager (1998), o qual utilizaram ratos Wistar para avaliar a ativação de TNF- α na presença de melatonina, as células alveolares foram retiradas por meio de lavagem e no meio de cultura celular acrescentou-se melatonina, posteriormente, adicionou-se o fator de LPS bacteriano; os resultados demonstraram que houve a redução de TNF- α nessas células na presença de melatonina. Em outro estudo randômico realizado em humanos com doença periodontal, que receberam 10mg de melatonina (uma vez por dia, à noite, por 2 meses), demonstrou que a suplementação com MEL promoveu uma diminuição tanto dos níveis salivares de TNF- α como da doença periodontal (EL-SHARKAWY et al., 2018).

Segundo Reiter et al. (2000), a MEL tem vias para diminuir os danos da inflamação, como o impedimento da translocação do fator-kappa B (NF-B) até o seu ligante no DNA, gerando uma regulação na liberação de citocinas pró inflamatórias como IL e TNF- α e também a inibição da produção de moléculas indutoras de aderência dos leucócito às células endoteliais, diminuindo a migração de células e, conseqüentemente o edema, os quais são responsáveis pelo danos aos tecidos no processo inflamatório.

No presente estudo, o grupo PNX não mostrou alterações significativas em relação à perda óssea alveolar, contudo se esperava resultado diferente, pois a falta de MEL endógena via glândula pineal, deveria resultar em reabsorção já que o hormônio é responsável por amenizar o processo inflamatório. Deste modo, não havendo o processo de reabsorção neste grupo, reafirma-se o trabalho do pesquisador Acuña-Castroviejo (2014), que em células inflamatórias e outros órgãos também são capazes de sintetizar melatonina, não conferindo à glândula pineal exclusividade. Porém, essa inalteração na reabsorção óssea, encontrada no presente estudo pode ser em decorrência do período avaliado, pois uma pesquisa de Turgut et al. (2006) em frangos pinealectomizados, notou-se que quanto maior o tempo de pinealectomia mais significantes eram as perdas ósseas. Ostrowska et al. (2003) analisando a urina de ratos pinealectomizados, observou maior presença de biomarcadores de reabsorção óssea.

Considerando que a melatonina preveniu a reabsorção óssea nos grupos DPME e PNXDPME, podemos inferir que este hormônio é necessário para a regulação do processo inflamatório e conseqüentemente para a modulação da

reabsorção óssea. A MEL atua na diferenciação osteoblástica, favorecendo a formação óssea, além de atuar como antioxidante, agindo como captador de radicais livres (REITER, 2011; MARIA; WITT-ENDERBY, 2014). Para Najeeb et al. (2016), este hormônio mostrou-se efetivo no tratamento de doença periodontal, na osteointegração de implantes dentários, na citotoxicidade de drogas e materiais dentários, em pós-operatório de extrações dentárias e em câncer oral.

Por fim, o presente estudo demonstrou o importante papel da melatonina na diminuição da reabsorção óssea na doença periodontal tanto em ratos controle quanto pinealectomizados. A mesma mostrou relevância no processo terapêutico e protetivos em relação à reabsorção óssea decorrente da doença periodontal.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados do presente estudo, verificou-se que os animais PNX não apresentaram uma maior reabsorção óssea em relação ao grupo controle como também, não houve diferenças nesse parâmetro entre os grupos PNXDP e DP. A suplementação com melatonina em ratos pinealectomizado e com doença periodontal ocasionou em uma redução dos níveis plasmáticos de TNF- α . Em todos os grupos que foram induzidos com doença periodontal a melatonina protegeu da reabsorção óssea. Por fim, pode-se dizer que a melatonina é importante para a diminuição da concentração plasmática de TNF- α , bem como no controle de reabsorção óssea alveolar.

REFERÊNCIAS

ALONSO-VALE, M. I.; BORGES-SILVA, C. N.; ANHE, G. F.; ANDREOTTI, S.; MACHADO, M. A.; CIPOLLA-NETO, J.; LIMA, F. B. Light/dark cycle-dependent metabolic changes in adipose tissue of pinealectomized rats. **Horm Metab Res**, v. 36, n. 7, p. 474-9, Jul, 2004.

AMSTRUP, A et al., Melatonin and the skeleton. **Osteoporosis international**. 2013.

ARABACI, T; KERMEN, E; ÖZKANLAR, S; et al. Therapeutic Effects of Melatonin on Alveolar Bone Resorption After Experimental Periodontitis in Rats: A Biochemical and Immunohistochemical Study. **Journal Periodontol**. 86(7):874-881, 2015.

ASSUMA, R. et al. IL-1 and TNF Antagonists Inhibit the Inflammatory Response and Bone Loss in Experimental Periodontitis. **The Journal of Immunology**. v. 160, p. 403-409, 1998.

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

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cell Mol Life Sci**. v.71 p.16, 2014.

CUTANDO, A et al. Melatonin: Potential functions in the oral cavity. **Journal of Periodontology**. v. 75, p. 7, 2014.

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

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

EL-SHARKAWY, H. et al. Is dietary melatonin supplementation a viable adjunctive therapy for chronic periodontitis?-A randomized controlled clinical trial. **Journal of Periodontal**, 2018.

FOLKARD, S. Do Permanent Night Workers Show Circadian Adjustment? A Review Based on the Endogenous Melatonin Rhythm. **Chronobiology International**, V.25:2, p.215-224, 2008.

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

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

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

MARKUS, R.P.; CECON, E.; PIRES-LAPA, M.A. Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. **Int. J. Mol. Sci.** 14, 10979-10997, 2013.

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

NAJEEB S., KHURSHID Z., ZOHAIB S., ZAFAR M.S. Therapeutic potential of melatonin in oral medicine and periodontology. **Kaohsiung J Med Sci.** 32(8):391-396, 2016.

OSTROWSKA Z., KOS-KUDLA B., NOWAK M., et al. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats. **Endocr Regul.** 37(4):211-224, 2003.

PARVEEN, D et al. Reactive oxygen species in periodontitis. **Journal of Indian Society of Periodontology.** v. 17, p. 4, 2013.

RASLAN, S. A.; ALENCAR, C. O.; CORTELLI, J. R.; et al. Presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em associação a *Prophyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em pacientes periodontais. **Revista Odontologia UNESP.** V.40, p.304-309, 2011.

REITER, J. R. et al. Melatonin and Its relation to the immune system and inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences.** V. 917, p.376-386, 2000.

ROTH J.A., KIM B.G., LIN W.L., CHO M.I. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. **J Biol Chem.** 274(31):22041-22047, 1999.

SOUMYA, N. et al. Role of autoimmune responses in periodontal disease. **Autoimmune Diseases.** V.2014, p. 1-7, 2014.

TURGUT, M.; BASALOGLU, H. K.; YENISEY, C.; OZSUNAR, Y. Surgical pinealectomy accelerates intervertebral disc degeneration process in chicken. **Eur Spine J.** v.15, p. 605-612, 2006.

WILLIAMS, J. G., BERNSTEIN S., PRAGER M. Effect of melatonina on activated macrophage TNF, IL-6 and reactive oxygen intermediates. **Shock**. V.9, p.406-411, 1998.

ANEXO A – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeitos da reposição hormonal com melatonina na remodelação óssea alveolar em ratos pinealectomizados com doença periodontal", Processo FOA nº 00544-2016, sob responsabilidade de Dóris Hissako Sumida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Dezembro de 2016.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 14 de Dezembro de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 14 de Janeiro de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Effects of hormone replacement with melatonin in alveolar bone remodeling in pinealectomized rats with periodontal disease", Protocol FOA nº 00544-2016, under the supervision of Dóris Hissako Sumida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 14, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 14, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 14, 2019.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador de CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Aracatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (16) 3638-3234 Email: CEUA: ceua@fos.unesp.br