

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**Efeitos da pinealectomia sobre o tecido ósseo de ratos
intactos e orquiectomizados**

Dernival Bertoncello

São Carlos

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**Efeitos da pinealectomia sobre o tecido ósseo de ratos
intactos e orquiectomizados**

Orientadora: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

Orientado: Dernival Bertoncello

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Carlos

2005

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

B547ep

Bertoncello, Dernival.

Efeitos da pinealectomia sobre o tecido ósseo de ratos intactos e orquiectomizados / Dernival Bertoncello. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

82 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Medicina experimental - rato. 2. Osteopenia. 3. Corpo pineal. 4. Orquiectomia. I. Título.

CDD: 619.93 (20^a)

Orientadora

Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

*“Os meus ossos não te foram encobertos, quando no oculto fui
formado.”*

Sálmo 139,15

Para minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus pais, pelo afeto, apoio e ensinamentos que nunca encontrei em livros.

Aos meus irmãos, pelo companheirismo e papel de pais em alguns momentos.

A alguns amigos de infância, que me fizeram acreditar em quanto é importante a amizade verdadeira e duradoura.

Aos meus amigos de graduação, pelos bons momentos, pelas farras e pela amizade construída em um mundo *quase* de adultos.

Aos meus amigos pós-graduandos, pelos momentos de farra *mais elaborada* e pelas tensões e alegrias vividas juntos.

Aos amigos do Laboratório de Neuroendocrinologia, tantos... que chegaram, ficaram, partiram...

Ao Sr. Sérgio, do Laboratório de Neuroendocrinologia, pela ajuda em vários momentos.

À Carmen e Selminha, pela ajuda em assuntos diversos.

Ao Militão e Helena, do DEMA, pela ajuda na microscopia eletrônica de varredura.

À Profa. Dra. Cecília Azevedo, USP, pela disponibilidade em utilizar o aparelho de densitometria.

Aos meus professores, da graduação e pós-graduação, que me deixaram exemplos importantes de vida profissional.

Aos meus amigos professores da UNIUBE, pelo companheirismo de sempre.

Aos meus alunos, que me dão a oportunidade de exercer o que gosto tanto.

À maninha Leida, ao mano Luco e ao amigo Haroldo por partilharem comigo problemas e alegrias semelhantes.

Aos amigos de tanto tempo, pelos conselhos, ajudas, risadas e afinidades, em especial a Alessandra, Lidiana, Jorge Léo, Luco (DW), Charles, Lidi, Nina, Lucélia, Valéria, Fabinho, Maria Fernanda.

Aos amigos de Indaiatuba, São Carlos, Uberaba e outras cidades, pela possibilidade de me considerar *da casa* em cada lugar.

A todos que estiveram ao meu lado nesses momentos...

“...mas, amigo, se em ti eu penso um momento,
Vão-se as penas e acaba o sofrimento.”
(Soneto 30 – Shakespeare)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka, minha sempre orientadora, pelo apoio, incentivo e exemplo profissional nesses quase dez anos...

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Resumo.....	iv
Abstract.....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Tecido Ósseo.....	3
1.2 Osteoporose.....	6
1.3 Melatonina.....	8
1.4 Modelo experimental.....	16
1.5 Métodos de análise óssea.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Animais.....	19
3.2 Protocolo experimental.....	19
3.3 Pinealectomia.....	20
3.4 Orquiectomia.....	20
3.5 Tratamento dos animais.....	20
3.6 Variáveis estudadas.....	21
3.6.1 Biométricas.....	21
3.6.2 Ensaio mecânico de flexão a três pontos do fêmur direito.....	21
3.6.3 Propriedades físicas do fêmur direito.....	23
3.6.4 Qualidade óssea do fêmur direito.....	24
3.6.5 Densitometria do fêmur esquerdo.....	24
3.6.6 Análise da Superfície Óssea Trabecular por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	25
3.7 Análise estatística.....	26
3.8 Norma metodológica.....	26

4 RESULTADOS.....	27
4.1 Massa Corporal.....	27
4.2 Análise do fêmur direito.....	28
4.3 Análise do fêmur esquerdo.....	34
5 DISCUSSÃO.....	54
5.1 Massa Corporal.....	54
5.2 Análise do fêmur direito.....	56
5.3 Análise do fêmur esquerdo.....	59
6 CONCLUSÕES.....	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
APÊNDICE	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Massa Corporal Inicial e Final e Ganho de Massa dos animais dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM).....	27
Tabela 2: Valores de parâmetros físicos e biométricos do fêmur direito de ratos dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM).....	29
Tabela 3: Valores de força máxima, deformação, rigidez e Índice de Seedor do fêmur direito de ratos dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM).....	32
Tabela 4: Conteúdo Mineral Ósseo (BMC), Área Óssea (BA) e Densidade Mineral Óssea (BDA) do fêmur esquerdo dos animais dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM).....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síntese de melatonina no pinealócito.....	10
Figura 2: Detalhe da máquina de ensaio universal (modelo Instron 4444) durante teste de flexão a três pontos.....	22
Figura 3: Massa corporal inicial e final dos animais dos diferentes grupos experimentais (MC = massa corporal).....	28
Figura 4: Ganho de massa corporal dos diferentes grupos experimentais.....	28
Figura 5: Comprimento do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	29
Figura 6: Espessura lateral e espessura sagital da diáfise do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	30
Figura 7: Volume ósseo femoral dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	30
Figura 8: Densidade Mineral Óssea do fêmur direito dos ratos dos diferentes grupos experimentais.....	31
Figura 9: Força Máxima suportada pelo fêmur de ratos dos diferentes grupos experimentais no teste biomecânico.....	33
Figura 10: Momento Máximo de Força do fêmur de ratos dos diferentes grupos experimentais no teste biomecânico.....	33
Figura 11: Força Máxima Normalizada do fêmur de ratos dos diferentes grupos experimentais.....	34
Figura 12: Valores de Rigidez do fêmur de ratos dos diferentes grupos experimentais obtidos com o teste biomecânico.....	34
Figura 13: Conteúdo mineral ósseo do fêmur esquerdo dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	35
Figura 14: Área do fêmur esquerdo dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	35
Figura 15: Densidade mineral do fêmur esquerdo dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	36
Figura 16: Micrografias do fêmur de rato do grupo de animais Basais.....	37
Figura 17: Micrografias do fêmur de rato do grupo de animais Basais.....	38
Figura 18: Micrografias do fêmur de rato do grupo de animais Sham.....	39

Figura 19: Micrografias do fêmur de rato do grupo de animais Sham.....	40
Figura 20: Micrografias do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e castrados.....	41
Figura 21: Micrografias do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e castrados.....	42
Figura 22: Micrografias do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e castrados tratados com salina.....	43
Figura 23: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e castrados tratados com salina.....	44
Figura 24: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e castrados tratados com melatonina.....	45
Figura 25: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e castrados tratados com melatonina.....	46
Figura 26: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e intactos.....	47
Figura 27: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e intactos.....	48
Figura 28: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e intactos tratados com salina.....	49
Figura 29: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e intactos tratados com salina.....	50
Figura 30: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e intactos tratados com melatonina.....	51
Figura 31: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e intactos tratados com melatonina.....	52
Figura 32: Micrografias dos fêmures dos ratos dos diferentes grupos experimentais.....	53

RESUMO

A osteoporose constitui importante problema de saúde pública mundial. A mortalidade e a morbidade que se segue ao diagnóstico de osteoporose é alarmante, visto ser um índice alto em pessoas idosas. Há uma relação direta entre o sistema endócrino e o metabolismo do tecido ósseo e há evidências em relação à atuação da melatonina sobre o mesmo. O objetivo deste trabalho foi verificar as possíveis decorrências da ausência de melatonina (pinelectomia) sobre o fêmur de ratos, a partir de diferentes parâmetros de análise óssea. Foram utilizados ratos Wistar adultos, com 4 meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos e mantidos no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia/DCF, em regime de luz e temperatura controlados. O protocolo experimental foi dividido em 8 grupos (cada grupo com n=7-8): Basal; Pinelectomizados-sham (Sham); Pinelectomizados e Intactos (não orquiectomizados) (Pin.intactos); Pinelectomizados e Orquiectomizados (Pin.orquiect.); Pinelectomizados, orquiectomizados tratados com melatonina (Pin.orq.melatonina); Pinelectomizados, orquiectomizados tratados com salina (Pin.orq.salina); Pinelectomizados e intactos tratados com melatonina (Pin.intacto melatonina); Pinelectomizados e intactos tratados com salina (Pin.intacto salina). Alguns grupos de animais tiveram reposição hormonal de injeções subcutâneas de melatonina com a dose de 200 µg/kg, durante 8 semanas (6 dias por semana). Após, foi realizada a análise biométrica, física e biomecânica do fêmur direito de cada animal. Foi analisado também o ganho de peso de cada rato e a qualidade óssea. O fêmur esquerdo foi analisado através de densitometria óssea e microscopia eletrônica de varredura. O ganho de peso variou em função do aumento de peso corporal final dos animais. Verificou-se menor ganho de peso corporal para os animais pinelectomizados intactos e castrados tratados com melatonina em comparação aos seus respectivos controles (tratados com salina). A pinelectomia associada à castração parece acentuar os valores indicadores da osteopenia, o que não foi corrigido realizando a reposição hormonal. Houve menores valores dos parâmetros analisados para os grupos de animais pinelectomizados e castrados, e somente pinelectomizados, em relação aos grupos Basal e Sham. A reposição hormonal para os animais pinelectomizados e não castrados é suficiente para permitir maiores valores de Força Máxima no teste de flexão do fêmur, também protege contra diminuição da densidade óssea e menor espaçamentos entre

as trabéculas. Este estudo mostra pela primeira vez que a pinealectomia parece acentuar os efeitos osteopênicos da orquiectomia em ratos.

Palavras-Chave: osteopenia, rato, pinealectomia, melatonina, orquiectomia

ABSTRACT

Osteoporosis is an important world's public health problem. The resulting fracture from this sickness becomes concerning, because it can start other problems. So, the mortality and morbidity that follow the osteoporosis diagnosis are concerning, once a high rate in old people can be seen. Based on evidences found in literature regarding the melatonin effects on bone tissue, the aim of this study was to check the possible consequences of the absence of melatonin, (pinealectomy) on body weight and femur of rats, from distinct bone analysis. It was used male rats of the Wistar strain (220-260g BW), bred at the Universidade Federal de São Carlos, were housed under conditions controlled for temperature ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) and light (lights on between 8 am and 6 pm daily). All rats were allowed free access to water and a pelleted standard commercial diet. The experimental protocol was divided in 8 groups (each group $n=7$): Basal; Pinealectomized-Sham; Pinealectomized and Intact (non-orchidectomized); Pinealectomized and Orchidectomized; Pinealectomized, Orchidectomized treated with Melatonin; Pinealectomized, Orchidectomized treated with Saline; Pinealectomized and Intact treated with Melatonin; Pinealectomized and Intact treated with Saline. Some groups of animals received hormonal replacement with subcutaneous melatonin injections at a dose of 200ug/kg, during 8 weeks (six days a week). Then, biometric, physical and biomechanical right femur analysis were done. It was also analyzed the body weight of each animal and bone quality. Bone mineral density was analysed on the left femur, as well as scanning electron microscopy of bone histomorphology. Pinealectomized animals treated with melatonin evoked a lower body weight increase in relation to their respective control groups. Pinealectomy associated with castration seems to enhance osteopeny indicators values, what isn't corrected by hormonal replacement. Results from different parameters were smallest to pinealectomized and orchidectomized rats, or only orchidectomized rats, in relation to Basal and Sham groups. Hormonal replacement is to pinealectomized and non-castrated animals enough to allow higher Maximum Force values in the flex test of the femur and protect from loss of bone density and avoid the formation of big spaces in cancellous bone. This study has shown for the first time that Pinealectomy seems to enhance the osteopeny effects of orchidectomy in rats.

Key words: Osteopeny, rat, pinealectomy, melatonin, orchidectomy

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose constitui importante problema de saúde pública mundial. A fratura de fêmur conseqüente a essa doença torna-se preocupante, pois a mesma pode disparar outros problemas como infecções generalizadas, pneumonias, trombose venosa profunda e embolias pulmonar e cardiovascular. Ressaltam-se os elevados custos demandados pela hospitalização, acompanhamento e tratamento da doença (DEMPSTER e LINDSAY, 1993; SARTORI e MAGGI, 1995).

Há uma relação direta entre o sistema endócrino e o metabolismo do tecido ósseo. Sabe-se que as concentrações de hormônios esteróides sexuais diminuem com a idade retirando, assim, o efeito protetor contra a reabsorção óssea (MAZESS, 1990; VANDERSCHUEREN e BOUILLON, 1995). O paratormônio promove a remoção de cálcio do osso, atuando como antagonista à ação de outro hormônio, a calcitonina, cujo papel dá-se na limitação da reabsorção do tecido ósseo (AZRIA, 1989; EINHORN, 1996; NORDIN, 1997; SØGAARD et al., 1997).

Além da indicação de outros hormônios e fatores atuantes sobre o tecido ósseo, como GH e IGF-I, há evidências em relação à atuação da melatonina sobre o mesmo. HAKANSON, PENNY e BERGSTROM (1987) verificaram diminuições das concentrações séricas de cálcio acompanhadas de diminuições dos níveis de melatonina em ratos recém-nascidos durante exposição à luz. Estudos mais recentes, *in vitro*, verificaram que a melatonina promove diferenciação osteoblástica e formação óssea (ROTH et al., 1999; NAKADE et al., 1999). Em humanos, foi verificada a diminuição significativa dos níveis séricos de melatonina em adolescentes com escoliose idiopática (SADAT-ALI, al-HABDAN e al-OTHMAN, 2000).

Um outro aspecto da atuação da melatonina é o citado por GILAD et al. (1997). Segundo eles, a melatonina teria papel antioxidante sobre o tecido ósseo, removendo o peroxinitrito. Este é um oxidante tóxico formado pela reação de superóxido e óxido nítrico, tendo efeito estimulante sobre a geração de osteoclastos, o que acelera a reabsorção óssea (RALSTON et al., 1995). OKATANI, MORIOKA e WAKATSUKI (2000) verificaram correlação negativa entre a secreção noturna de melatonina e a concentração de β -estradiol, em mulheres pós-menopausa, o que poderia influenciar o metabolismo ósseo.

Estes trabalhos são fortes indicativos de que a melatonina exerceria papel direto e indireto sobre o metabolismo ósseo.

Um trabalho realizado em nosso laboratório analisou o efeito do tratamento com melatonina sobre o tecido ósseo de ratos castrados (não pinealectomizados) e intactos, tratados com salina ou melatonina. Com a orquiectomia, houve diminuição da massa óssea, parâmetro verificado a partir da diminuição do momento máximo de força e da força máxima que, por sua vez, refletiu na diminuição da força máxima normalizada. A castração provocou, ainda, diminuição do volume ósseo e diminuição dos diâmetros da diáfise femoral. Quanto ao tratamento com melatonina para animais castrados não pinealectomizados, verificou-se que este hormônio promoveu menor ganho de peso nos animais castrados comparado ao grupo tratado com salina. O tratamento com melatonina não alterou a força máxima do osso no teste de flexão a 3 pontos e o hormônio protegeu o osso contra a diminuição de seu volume provocada pela castração, o que refletiu em maior força máxima normalizada para estes animais. Ainda, a melatonina promoveu menor diminuição das espessuras das paredes ósseas induzida pela orquiectomia (BERTONCELLO, 2001).

Para análise de tecido ósseo, a fim de acompanhar e determinar possíveis fatores causadores da osteoporose, suas conseqüências e tratamento, geralmente são utilizados ratos. A ovariectomia e a orquiectomia em ratas e ratos, respectivamente, constituem modelos de osteopenia experimental já bem estabelecidos, pois imitam a perda óssea trabecular que ocorre em humanos (HODGKINSON, 1979; KALU, 1991; PENG et al., 1994; MILLER, BOWMAN e JEE, 1995). Para análise das decorrências corporais referentes à glândula pineal, o rato pinealectomizado também constitui modelo experimental importante (CASTROVIEJO et al., 1986; WOLDEN-HANSON et al., 2000).

Os princípios mecânicos biológicos responsáveis pelo ganho e perda óssea durante o crescimento normal e vida adulta, e também na osteoporose, são os mesmos em humanos e ratos. Além disso, ratos e humanos respondem similarmente às influências mecânicas, hormonais, drogas e outros fatores, sendo conveniente para a avaliação do potencial do agente terapêutico para a prevenção da osteoporose (PENG et al., 1994; MILLER, BOWMAN e JEE, 1995).

1.1 Tecido Ósseo

O esqueleto é constituído por dois tipos principais de osso, cortical e trabecular. O primeiro predomina em ossos longos; já o segundo tipo está mais presente nas vértebras, pelve e extremidades dos ossos longos. Na literatura já estão bem elucidados os mecanismos de formação e reabsorção óssea, bem como a arquitetura do osso, seja macro ou microscopicamente (MUNDY e MARTIN, 1993; MARCUS, FELDMAN e KELSEY, 1996).

O tecido ósseo, caracterizado pela sua rigidez, apresenta funções importantes ao organismo, além da conhecida proteção aos órgãos vitais. Como reserva de minerais, participa do controle do metabolismo de alguns íons exercendo sincronia com os níveis sangüíneos destes minerais. O cálcio, principal mineral que compõe o tecido ósseo, tem papel importante em outros tecidos e sua concentração sangüínea pode ser indicativo de boa ou má reserva e do equilíbrio entre suas ações macroscópicas (arcabouço ósseo) e molecular.

Há necessidade do íon cálcio para formação de macromoléculas ou fosfolípidios localizados nas membranas celulares e tecidos conectivos, secreção e modulação de atividades enzimáticas, manutenção de potencial de ação e divisão celular. A faixa de concentração normal de cálcio no plasma varia entre 8,5 a 10,5 mg/dl, aproximadamente, em humanos. A maior parte do cálcio presente no corpo encontra-se nos ossos e nos dentes, o que constitui em torno de 2 kg desse mineral (MUNDY e MARTIN, 1993; PARFITT, 1993; MARCUS, FELDMAN e KELSEY, 1996).

Os níveis sangüíneos de cálcio são diretamente controlados pelo hormônio paratireoideano (PTH). Sintetizado pelas células principais das quatro glândulas paratireóides, este hormônio protéico é secretado quando os níveis plasmáticos de cálcio baixam a menos de 7 mg/dl, ocorrendo o inverso caso os níveis de cálcio estejam em torno ou acima de 11 mg/dl. No tecido ósseo, o PTH tem ação justamente de estimular a osteólise, ou seja, a remoção de cálcio. Os receptores, localizados nos osteoblastos, quando ativados, desencadeiam ações parácrinas sobre os osteoclastos e seus precursores. Assim, o resultado refere-se ao aumento da retirada de cálcio ósseo e manutenção de seus níveis sangüíneos (MUNDY e MARTIN, 1993).

Sabe-se que o paratormônio está presente em maiores concentrações em pessoas idosas, em pacientes com fraturas de quadril e pacientes com hiperparatireoidismo. No entanto, segundo DUAN, DE LUCA e SEEMAN (1999), o excesso de PTH pode exercer efeito anabólico sobre o osso trabecular e efeito catabólico sobre a região cortical óssea, o que reflete em maior, menor ou constante densidade mineral óssea dependendo do local analisado. Eles encontraram aumento de massa óssea no corpo vertebral e diminuição nos processos posteriores vertebrais em pacientes com hiperparatireoidismo primário.

Em relação ao exposto acima, SIMMONS et al. (1998) já haviam encontrado resultado semelhante administrando PTH a ratas ovariectomizadas. Estes autores verificaram aumento de densidade mineral óssea na porção trabecular de fêmur, tíbia e vértebra.

Além do importante papel do paratormônio sobre o tecido ósseo, outras substâncias têm participação sobre a formação e a reabsorção óssea. A vitamina D é uma delas. Não se trata de um hormônio originário de uma glândula endócrina, mas seu mecanismo de ação semelhante aos hormônios esteróides justifica sua classificação como hormônio (MARCUS, FELDMAN e KELSEY, 1996). Seja a produzida na pele pela irradiação ultravioleta, D₃, ou a ingerida pela dieta, D₃ e D₂, a vitamina D, na célula alvo, combina-se com o receptor e estimula a transcrição de molécula de DNA e RNA mensageiro. Sua ação principal é estimular a absorção de cálcio pelo intestino. Outro local de ação é o tecido ósseo, mais precisamente com receptores nos osteoblastos. Dessa forma, através de mecanismo parácrino, estimula a reabsorção óssea ativando os osteoclastos. Dependendo da concentração mais baixa, pode estimular diretamente a osteólise osteocítica. Por outro lado, a vitamina D também induz a síntese de osteocalcina e fibronectina e suprime a síntese de colágeno tipo I pelos osteoblastos (MUNDY e MARTIN, 1993).

Um hormônio com ação sobre a formação óssea é a calcitonina. Sintetizada pelas células parafoliculares da glândula tireóide, este hormônio protéico atua baixando a concentração plasmática de cálcio, cujo nível elevado exerce papel estimulante para a secreção do hormônio. Uma vez liberada, a calcitonina tem o osteoclasto como célula alvo. Via AMPc, desencadeia um processo ainda não bem estudado. Sabe-se que ocorre diminuição do efluxo de cálcio das células ósseas para o líquido extracelular. Os

osteoclastos têm atuação prejudicada, a partir da perda de suas bordas pregueadas, o que resulta em um osso mais denso (AZRIA, 1989; MUNDY e MARTIN, 1993; MARCUS, FELDMAN e KELSEY, 1996).

Os hormônios androgênicos também exercem ação importante sobre o tecido ósseo. Apesar da quantidade diminuída em relação a outros tecidos, a afinidade dos receptores androgênicos encontrados nos osteoblastos parece ser semelhante à dos localizados em tecidos mais especializados e dependente deles, como a próstata, por exemplo. Sabe-se que a testosterona pode influenciar direta e indiretamente a homeostase óssea (VANDERSCHUEREN e BOUILLON, 1995).

São encontradas ainda as citocinas, fatores locais com ação sobre o remodelamento ósseo. A interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF), linfotóxica têm papel importante na reabsorção óssea. A maioria dessas citocinas são produtos de células do sistema imune: as citadas acima, por exemplo, mais a interleucina-6 (IL-6) são produtos de séries de macrófagos-monócitos, responsáveis pela ativação de osteoclastos. Há, na literatura, estudos indicando relação entre os níveis de PTH e estas citocinas, causando hipercalcemia e até reabsorção óssea. KRUGER e HORROBIN (1997) indicam relação entre ácidos graxos essenciais e formação óssea, com indicadores de diminuição destes compostos quando há aumento da reabsorção óssea.

A sincronia entre os diferentes hormônios, enzimas e processos metabólicos que interagem com o tecido ósseo permite a homeostase local e sistêmica no que se refere ao depósito e às concentrações sanguíneas de cálcio. Assim sendo, o osso se renova durante toda a vida, com predominância da formação sobre a reabsorção até cerca de 30 anos de idade, quando é atingido o pico de massa óssea. Após aproximadamente os 40 anos de idade, a reabsorção supera a formação e pode haver perda de 0,3 a 0,5% da massa óssea por ano (NORDIN, 1997; KANIS, 1998).

No entanto, quando ocorre um desequilíbrio hormonal ou qualquer disfunção em uma das vias que controlam esse metabolismo, podem ocorrer modificações na estrutura do esqueleto. Algumas doenças estão relacionadas a estas alterações hormonais, como é o caso da osteoporose, que será discutida a seguir.

1.2 Osteoporose

A osteoporose é uma doença caracterizada por baixa massa óssea e pela deterioração da microarquitetura do tecido ósseo e que o predispõe a aumentado risco de fratura (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1993; JOHNSTON e SLEMENDA, 1995; WILLS, 1998). Esta definição, ainda que simples, não suprime a complexidade que envolve o desenvolvimento de tão elevada perda de massa óssea. Um quadro de osteopenia, ou seja, massa óssea reduzida, ocorre após cessação ou diminuição dos níveis de hormônios esteróides sexuais, o que caracteriza a menopausa e a andropausa, em humanos. Quando a densidade mineral óssea está em 2,5 desvios padrão abaixo da média normal para um indivíduo jovem, tem-se a osteoporose, uma situação que predispõe o tecido a produzir manifestações clínicas (FROST e JEE, 1992; RIGGS e MELTON, 1992; SMITH, 1993).

Segundo a literatura, há fatores de risco que podem resultar na osteoporose: baixa ingestão de cálcio na infância e juventude; consumo excessivo de álcool; fumo excessivo; sedentarismo; baixa massa corporal e baixa estatura; etnia caucasiana/asiática; menopausa precoce. O uso exagerado de corticosteróides e a presença de doenças como espondilite anquilosante e artrite reumatóide também podem ser indicativos de futura perda de massa óssea além dos limites normais para a idade e o sexo. A rápida perda de massa óssea que ocorre logo após a menopausa está associada ao aumento do *turnover*, em que a velocidade de reabsorção óssea torna-se maior que a formação, o que caracteriza aumento da atividade invasiva dos osteoclastos (FROST e JEE, 1992; RAISZ e SHOUKRI, 1993).

A osteoporose pode ser classificada em primária e secundária. A primária, que ocorre mais freqüentemente, pode ainda ser dividida em tipo I e tipo II. Na osteoporose primária tipo I, classificação da osteoporose pós-menopausal, ocorre alta reabsorção óssea, em estágio precoce, o que denota potente ação dos osteoclastos e atinge predominantemente osso trabecular. Já na osteoporose tipo II, classificação da osteoporose senil, relacionada ao envelhecimento, a perda óssea dá-se de forma mais gradual. Sugere-se, neste caso, que haja atividade diminuída dos osteoblastos, deficiência crônica de cálcio, entre outros fatores (MELTON e RIGGS, 1986).

A osteoporose secundária normalmente é decorrente de processos inflamatórios e doenças que podem ocasionar má absorção intestinal de cálcio ou hipoestrogenismo precoce. São exemplos: hipertireoidismo; mieloma múltiplo; câncer; doenças inflamatórias intestinais crônicas; síndrome de Cushing; diabetes mellitus; hipogonadismo; doenças renais crônicas.

Tem-se ainda a idéia de classificar a osteoporose tipo I e tipo II simplesmente por osteoporose primária, devido à dificuldade em separar causa e efeito, em se tratando de ação diminuída dos osteoblastos e exagerada dos osteoclastos na geração da doença (RIGGS, 1999 *in* MARQUES NETO, 2001).

Embora já esteja bem elucidado na literatura o papel de diferentes hormônios no controle do remodelamento ósseo, parece que suas ações sempre são determinantes na ativação ou inibição da formação óssea via estímulo aos esteróides sexuais. Estes hormônios gonadais medeiam e são mediados por outros fatores a fim de desempenhar seu papel na constituição do arcabouço ósseo (VÄÄNÄNEN, 1991).

Algumas citocinas, como já citadas anteriormente, principalmente a interleucina-6 (IL-6) aumentam com o processo de envelhecimento. São potentes ativadoras da reabsorção óssea. Sabe-se que o PTH e outras substâncias como bradicinina e proteína morfogenética-2 estimulam a produção desta citocina em células osteogênicas (ERSHLER, HARMAN e KELLER, 1997). RALSTON (1994) também encontrou, além de IL-6, níveis aumentados de IL-1a e IL-1b em amostras sanguíneas de mulheres em período pós-menopausa e com fraturas osteoporóticas. Este mesmo autor e cols. (1995) verificaram que o óxido nítrico, quando em baixas concentrações, poderia acentuar a reabsorção óssea induzida por interleucina-1.

A osteopenia, em maior ou menor grau, é inevitável com o envelhecimento do indivíduo e isto independe da etnia, sexo, fator ambiental ou tipo de alimentação. Assim, a prevenção ainda é o melhor método para se assegurar de uma menor perda de tecido ósseo com a idade. A prevenção de doenças que podem desencadear a espoliação óssea, uma dieta rica em cálcio no período infante-juvenil, atividade física periódica e orientada e reposição hormonal são exemplos de como prevenir-se o surgimento da doença (CHRISTIANSEN, 1994; KANIS, 1998).

Não há uma cura para a osteoporose. No entanto, há tratamentos que procuram amenizar as seqüelas desencadeadas pela perda excessiva de massa óssea. Na

terapêutica são utilizados suplementos de cálcio, reposição hormonal baseado em esteróides anabólicos, vitamina D, paratormônio e calcitonina (WOOLF e DIXON, 1988; VANDERSCHUEREN e BOUILLOON, 1995). Os bifosfonatos, análogos sintéticos do pirofosfato, um regulador natural da mineralização óssea, também têm sido indicados como inibidores da reabsorção e estimuladores da formação óssea (SKARE, 1999; ATTIE, 1991; ZERBINI, 1995).

Exercícios físicos com carga, mas de baixo impacto, são indicados para estimular a ação osteoblástica e, em uma fase precoce, prevenir acentuada perda de massa óssea e, com a doença instalada, diminuir os efeitos da espoliação óssea (MALMROS et al., 1998; MITCHELL, GRANT e AITCHISON, 1998).

Recentes trabalhos têm sido direcionados para o estudo da relação entre estatinas e o tecido ósseo, inclusive prevenindo a perda de massa óssea que ocorre na osteoporose. MAEDA, KAWANE e HORIUCHI (2003) encontraram efeito positivo da estatina sobre fator de crescimento endotelial em células osteoblásticas, o que promoveu diferenciação destas. STAAL et al. (2003) verificaram que a estatina inibe a reabsorção óssea *in vitro*.

Há indicativos de que a melatonina exerce efeito protetor sobre o tecido ósseo, diminuindo a reabsorção de cálcio, direta e indiretamente. Esta ação do hormônio produzido pela glândula pineal será discutida a seguir.

1.3 Melatonina

A glândula pineal, em humanos, ocupa a região central cerebral, entre os dois hemisférios, à frente do cerebelo e na região pósterodorsal do diencéfalo. Trata-se de um órgão pequeno com massa de 150 mg. Embora seja citada pelos livros históricos como já descrita pelos anos 200 anos a.C., foi somente por volta da década de 1950 que o hormônio melatonina foi identificado quimicamente (LERNER et al., 1958; YU, TSIN e REITER, 1993).

O tipo celular específico da glândula é o pinealócito, responsável pela síntese e liberação de melatonina, mas há também um percentual pequeno (5%) compreendido por células de origem glial, os astrócitos. A glândula contém receptores que participam

diretamente ou não na síntese do hormônio. São eles: β -adrenérgico, α -adrenérgico, dopaminérgico (RALPH, 1978; EBADI, 1993).

A melatonina é uma indolamina sintetizada e secretada pela glândula pineal. Formada a partir do aminoácido triptofano, trata-se de um hormônio lipofílico, que atravessa facilmente a membrana plasmática por difusão passiva. Uma vez sintetizada, a melatonina é liberada à corrente sangüínea, não havendo armazenamento de seu conteúdo. É considerado um hormônio bastante versátil, com acesso a diferentes células em todo o organismo (VANECEK, 1998).

Para formação de melatonina, ocorre, inicialmente, a captação do aminoácido triptofano da circulação sangüínea através de um sistema de transporte de aminoácidos neutros. No pinealócito, o triptofano é hidrolisado a 5-hidroxitriptofano (5-HTP), no interior da matriz mitocondrial, por ação da enzima triptofano-hidroxilase. A seguir, 5-HTP é oxidado a serotonina pela ação da enzima descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos (AAAD), no citosol. Esta enzima, por si só, não varia conforme ritmo circadiano, sua atividade depende da concentração de seu substrato.

Há necessidade de quatro enzimas importantes, três delas reguláveis, para a secreção de melatonina, e estas são influenciadas por informação luminosa e sinal circadiano. No período escuro, a noradrenalina é liberada das terminações simpáticas da glândula pineal e liga-se a receptores α e β -adrenérgicos presentes na membrana dos pinealócitos. A seguir, ocorre ativação da enzima N-acetil-transferase (NAT), que transfere um grupo acetil da acetilcoenzima A para a serotonina. Forma-se, assim, a N-acetil-serotonina (NAS). Uma outra enzima, a hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), converte a NAS em melatonina (WURTMAN e OZAKI, 1978; REITER, 1984, 1988; YU, TSIN e REITER, 1993). A seqüência de formação de melatonina, a partir do triptofano, é esquematizada na Figura 1.

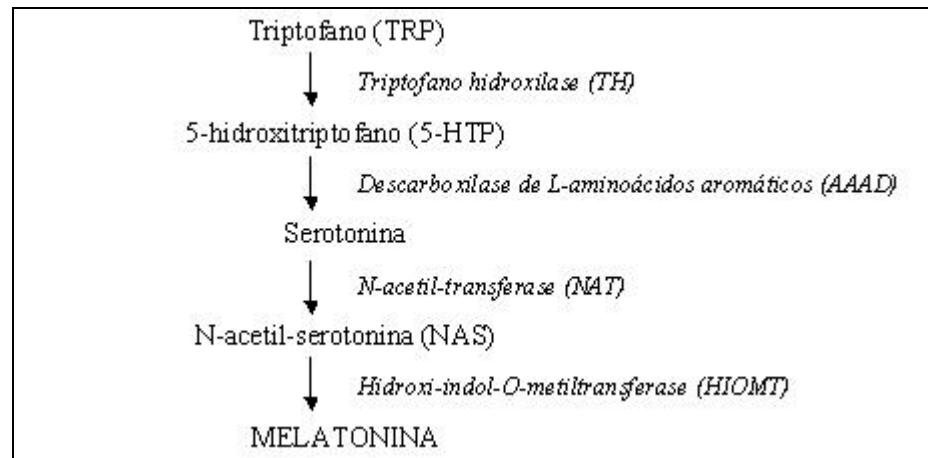


Figura 1: Síntese de melatonina no pinealócito

O processo de liberação da melatonina depende da inexistência de um estímulo luminoso captado pelas células ganglionares da retina. Através da via retino-hipotalâmica, projeta-se aos núcleos supraquiasmáticos, os quais, por sua vez, projetam-se sobre os neurônios pré-ganglionares simpáticos, passando pelo núcleo paraventricular. Estes enviam seus axônios aos gânglios cervicais superiores que se projetam sobre a glândula pineal. O neurotransmissor presente no terminal nervoso pós-ganglionar simpático é a noradrenalina, que age nos receptores α_1 e β -adrenérgico dos pinealócitos (WURTMAN e OZAKI, 1978; CIPOLLA-NETO e AFECHE, 1992; YU, TSIN e REITER, 1993).

O receptor β -adrenérgico ativado estimula uma proteína-G que, por sua vez, ativa o sistema adenilato ciclase. Assim, molécula de ATP é hidrolisada a AMPc. O nível aumentado de AMPc (mais cálcio) intracelular acentua a atividade de proteína quinase A e esta ativa a expressão de RNAm para a síntese ou regulação da enzima NAT. O estímulo via receptor α -adrenérgico ativa uma cascata de reações, via fosfatidilinositol, e envolve atividades da fosfolipase, diacilglicerol e proteína quinase. A proteína quinase ativa adenilato ciclase e resulta no aumento da atividade da NAT e síntese de melatonina (YU, TSIN e REITER, 1993).

A metabolização da melatonina ocorre principalmente no fígado e rins, onde é convertida a 6-hidroxi-melatonina. Também pode ser conjugada a sulfato, formar a 6-sulfatoxi-melatonina e ser eliminada na urina. Os níveis de secreção de melatonina variam de espécie para espécie e, em humanos, de indivíduo para indivíduo e com o decorrer da idade. Apresenta o seu pico máximo de produção aos 3 anos de idade, e

declina de forma importante entre os 60 e 70 anos. Tem uma variação entre 40 e 200 pg/ml em homens adultos jovens e saudáveis; já em pessoas idosas, pode atingir níveis mais baixos que 40 pg/ml (YU, TSIN e REITER, 1993, MORÁBITO, 1995). Em adultos após 60 anos de idade, exames morfológicos da glândula pineal mostram amplas formações de concreções calcárias locais (PROSENC e CERVÓS-NAVARRO, 1994).

São encontrados receptores para melatonina na membrana plasmática dos pinealócitos, núcleo supraquiasmático, gânglio cervical superior, hipotálamo, tronco cerebral, adenohipófise, gônadas, células do sistema imune, células ósseas. Em roedores, ainda são encontrados receptores na área postrema. Há ainda receptores nucleares em algumas células específicas (DUBOCOVICH, 1988; LAITINEN e SAAVEDRA, 1990; KRAUSE e DUBOCOVICH, 1991; STANKOV, FRASCHINI e REITER, 1993).

A produção de melatonina tem ritmo diário e pico noturno e sua liberação, portanto, é inibida por estímulos luminosos. Em mamíferos, suas ações comprovadamente estão relacionadas ao controle de ritmos biológicos, coordenação de funções reprodutivas a mudanças de fotoperíodos, e resposta imunológica (MORÁBITO, 1995). Apesar de menos evidente na regulação de ritmo circadiano, em mamíferos de modo geral, controla os ritmos sazonais pelo fotoperíodo, especificamente em roedores e ovinos. Verifica-se que a administração de melatonina, em dias curtos, induz a involução das gônadas e diminuição das concentrações plasmáticas de hormônios sexuais em hamsters pinealectomizados (REITER, 1984).

São bem consolidados na literatura estudos sobre os efeitos hipnóticos e sedativos da melatonina em doses farmacológicas aplicadas a gatos e humanos (LERNER e CASE, 1960; ARUTYUNYAN et al., 1963; CRAMER et al., 1974). MORÁBITO (1995) mostrou que a indução do sono pela melatonina é possível através de doses próximas da fisiológica.

Há dois possíveis mecanismos de modulação do sono, em humanos. O primeiro versa sobre a idéia de que a melatonina alteraria o ritmo circadiano mudando o tempo em que normalmente se adormece para o período mais desejável do dia. Outra hipótese prediz que a melatonina teria efeito direto sobre a indução de sono, o que pode ser considerada pelo fato de que a amplitude e a duração da secreção noturna de melatonina

estão correlacionadas com a redução da temperatura corporal interna, que também tem um ritmo circadiano (MORÁBITO, 1995, RASMUSSEN et al., 1999).

Um outro papel importante da melatonina é em relação ao sistema imune e como anti-oxidante. MAESTRONI, VONTI e PIERPAOLI (1988) realizaram experimento com ratos portadores de encefalomiocardite induzida associada ao estresse. Houve alto índice de sobrevivência (82%) dos animais que receberam melatonina como terapêutica, comparados aos que não tiveram administração do hormônio (6%).

Em humanos, estudos têm sido direcionados às análises da melatonina como fator estimulante de macrófagos, através da liberação de interleucina-4, que atuaria aumentando a quantidade de células de defesa (REITER e ROBINSON, 1995). Também há estudos procurando correlacionar índices baixos de liberação de melatonina com aumento do índice de tumores, inclusive ósseos (LISSONI et al., 1996; PANZER, 1997).

Alguns trabalhos têm identificado a melatonina como um removedor de radicais livres. Metabólitos provenientes de processos químicos, e que poderiam ser danosos às células, têm sua ação minimizada quando se combina ao hormônio da pineal. GILAD et al. (1997), partindo do pressuposto que a melatonina seria um removedor de radicais livres, analisaram a ação do hormônio em um preparado celular contendo peroxinitrito. Verificaram que a melatonina causou uma inibição dose-dependente da oxidação de dehidrorodamina¹²³ e pelo peroxinitrito, ou seja, inibiu uma reação oxidativa induzida por este composto, que é formado por óxido nítrico e superóxido e considerado um dos mais reativos e danosos às células.

NODA et al. (1999) analisaram o efeito da melatonina e seus precursores sobre a remoção de óxido nítrico *in vitro*. Verificaram que a melatonina atua como removedor de óxido nítrico de modo dose-dependente. Eles analisaram as concentrações variando entre 25 µM e 1,8 nM. Ainda, verificaram que a melatonina foi mais eficaz que seus precursores, na ordem seguinte: melatonina com efeito maior do que a serotonina, 5-hidroxitriptofano, N-acetil-5-hidroxitriptamina e L-triptofano.

REITER et al. (1999) analisaram ratos pinealectomizados aos 2 meses e compararam esta idade a quando eles apresentaram 25 meses de idade, a fim de verificar os efeitos da ausência de melatonina sobre os níveis corporais de antioxidantes. Eles verificaram aumento da concentração de diferentes marcadores de danos às células

(produtos de peroxidação lipídica em vários órgãos) em animais que sofreram a cirurgia de retirada da glândula pineal. Supõe-se que a dessincronização do ritmo corporal interno pode acelerar os sinais de aumento da idade.

É sabido também a relação entre melatonina e o sistema reprodutor, principalmente em animais com ciclo de reprodução sazonal. Na década de 70, estudos indicaram receptores para esteróides gonadais na glândula pineal, bem como variações dos níveis de LH (hormônio luteinizante) em ratos após pinealectomia ou administração de melatonina (DEBELJUK, FEDER e PAULUCCI, 1970; LUTTGE e WALLIS, 1973; ALONSO et al., 1978). DEBELJUK, FEDER e PAULUCCI (1970) verificaram que o tratamento com melatonina em ratos castrados resultou em significativa diminuição de peso da glândula hipófise, diminuindo a hipertrofia glandular esperada pós-castração. Também houve diminuição de peso da próstata e vesícula seminal com a administração do hormônio.

ALONSO et al. (1978) verificaram o efeito oposto ao realizarem pinealectomia em animais intactos. Houve aumento dos níveis séricos de LH provocados pela pinealectomia, que também acentuou o crescimento das vesículas seminais nos ratos, mas não alterou o peso da próstata.

OKATANI, MORIOKA e WAKATSUKI (2000) procuraram estudar o papel do estrógeno sobre o controle da síntese noturna de melatonina em mulheres pós-menopausadas. Verificaram que as concentrações séricas noturnas de melatonina aumentam durante a menopausa. No entanto, não se sabe exatamente o efeito do estrógeno sobre a glândula pineal.

Na literatura, há evidências ainda da atuação da melatonina sobre o controle de mecanismos metabólicos gerais.

A fim de verificar o efeito da melatonina sobre a gordura visceral, RASMUSSEN et al. (1999) utilizaram altas e baixas doses do hormônio em ratos jovens e idosos. Verificaram que os animais idosos que receberam alta concentração de melatonina (4µg/ml) apresentaram valores menores de peso corporal do que os animais que receberam tratamento com veículo. A quantidade de gordura retroperitoneal apresentou valores 171% maiores em ratos tratados com veículo do que os que receberam melatonina, após 10 semanas de tratamento. O mesmo ocorreu com a medida de gordura epididimal.

WOLDEN-HANSON et al. (2000) analisaram os efeitos da administração de melatonina, durante 12 semanas, sobre o peso corporal, gordura intra-abdominal, leptina plasmática e consumo de alimento. Houve diminuição em 3% do peso corporal para os animais que receberam melatonina, comparados com um aumento em 3,6% do peso para os animais sem tratamento. No entanto, não houve alteração quanto ao consumo de alimento. Em relação à gordura intra-abdominal, os animais tratados com melatonina tiveram 20% a menos de gordura, apesar de não haver diferença significativa quanto à gordura corporal total. Estes achados sugerem que mudanças dos níveis plasmáticos de melatonina devido ao envelhecimento alteram o metabolismo corporal.

Em se tratando de tecido ósseo, surgem hipóteses relacionando a ação direta e indireta da melatonina no sentido de controlar o metabolismo do cálcio, como já citado na introdução deste trabalho.

Há estudos verificando as concentrações séricas de cálcio após exposição de animais à luz. Quando houve administração de melatonina, não ocorreu resposta hipocalcêmica, que seria provocada pela exposição luminosa ou por administração conjunta de corticosterona (HAKANSON, PENNY e BERGSTROM, 1987; HAKANSON e BERGSTROM, 1990).

Alguns trabalhos encontrados na literatura evidenciam o papel da melatonina no controle do desenvolvimento de escoliose idiopática. O'KELLY, et al. (1999) verificaram formação de escoliose em frangos após cirurgia de pinealectomia, mas não encontraram os mesmos resultados em ratos ou hamsters. Sugeriram que a posição bípede seria um diferencial para geração de tal situação.

FAGAN, KENNAWAY e SUTHERLAND (1998), anteriormente, não tinham encontrado diferenças significativas dos níveis de metabólitos de melatonina em pacientes com escoliose idiopática, comparados com grupo controle de mesma idade e gênero. No entanto, MACHIDA et al. (1996) já haviam realizado um trabalho em que encontraram diminuição das concentrações plasmáticas de melatonina em pacientes adolescentes com escoliose idiopática, surgindo daí a hipótese da melatonina ter um papel importante na regulação do crescimento normal da coluna vertebral. Este resultado foi corroborado por SADAT-ALI, al-HABDAN e al-OTHMAN (2000), que encontraram valores séricos, significativamente mais baixos, de melatonina em adolescentes com escoliose.

Ainda, ABDEL-WANIS e KAWAHARA (2003) procuraram relacionar a ausência de melatonina com situações clínicas caracterizadas por doenças ósseas e má pigmentação de pele. Estes mesmos autores, anteriormente (2002), já haviam proposto uma hipótese em que relacionavam a deficiência de melatonina ao desenvolvimento de pseudoartrose após fusão espinal por escoliose neurofibromatosa.

Alguns trabalhos importantes, realizados com cultura de células, *in vitro* portanto, encontraram ação da melatonina sobre a diferenciação de células ósseas. ROTH et al. (1999) mostraram que mesmo valores baixos de melatonina podem induzir a expressão gênica de proteínas marcadoras ósseas, como fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina. Isto seria uma evidência da melatonina atuando diretamente sobre osteoblastos. Em estudo realizado na mesma época, NAKADE et al. (1999) mostraram que a melatonina aumentou a produção de pré-colágeno tipo I em células ósseas humanas.

LADIZESKI et al. (2003) analisaram densitometria óssea e valores séricos e urinários de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina em ratas ovariectomizadas divididas em grupos distintos, as que receberam melatonina (em água) e as que permaneceram em grupo controle. O tratamento com melatonina não alterou a densidade mineral óssea para os diferentes grupos de animais. No entanto, após 15 dias da ovariectomia, verificaram aumento significativo dos níveis séricos de fósforo e fosfatase alcalina em animais que receberam melatonina. Sugeriram, assim, que a melatonina em concentrações farmacológicas (25µg/ml), pode prevenir a perda óssea provocada pela ovariectomia.

KOYAMA et al. (2002) analisaram o tecido ósseo de camundongos tratados com diferentes doses de melatonina. Verificaram aumento da massa óssea, da densidade mineral óssea e da espessura trabecular nos animais tratados com 5 ou 50 mg/kg de melatonina por dia, durante quatro semanas.

Os estudos têm sido direcionados no sentido de procurar a via principal de ação da melatonina com o tecido ósseo, bem como as variações corporais que sejam decorrentes desta relação. Tal fato é primordial para que se tenha uma perspectiva futura positiva quanto à prevenção de doenças ósseas ou de outras estruturas.

1.4 Modelo Experimental

A utilização de modelos animais experimentais é importante para antecipar a eficácia e segurança de novas terapias e analisar a atuação de determinada substância para o desenvolvimento de novos medicamentos, o que não pode ser obtido com pacientes que participam de experimentos clínicos.

O rato constitui um modelo de estudo para verificar a incidência de perda de massa óssea já bem consolidado na literatura (HODGKINSON, 1979; DANIELSEN, MOSEKILDE e ANDREASSEN, 1992; PENG et al., 1994; MILLER, BOWMAN e JEE, 1995). Os principais mecanismos biológicos responsáveis pelo ganho e perda de massa óssea durante o crescimento normal e na vida adulta, bem como na osteoporose, são os mesmos em humanos e ratos. Ainda, o custo com experimentos com ratos é menor que 10% das despesas com experimentos realizados com cães ou primatas (FROST e JEE, 1992).

KALU (1991) indica a rata idosa, a partir dos 12 meses de idade, como modelo ideal de osteoporose, com resultados semelhantes àqueles observados quando se realiza a ovariectomia nesses animais. Segundo ele, o efeito da ovariectomia sobre o esqueleto do animal se manifesta em um mês, ou menos, após a cirurgia, podendo ser realizada no animal a partir dos 3 meses de idade.

Há ainda indicativos de outros modelos de osteopenia experimental, como a induzida por glicocorticóide, deficiências de vitaminas e cálcio, imobilização das patas dos animais e envelhecimento. Ratos machos orquiectomizados também têm diminuição de massa óssea trabecular, o que parece ser devido à diminuição do crescimento e reduzida taxa de *turnover* ósseo (MILLER, BOWMAN e JEE, 1995).

Existem diferentes linhagens de animais utilizados em experimentos. Alguns indicam ratos Wistar orquiectomizados como modelos de osteopenia experimental (DEBELJUK, FEDER e PAULUCCI, 1970; HODGKINSON, 1979; DANIELSEN, MOSEKILDE e ANDREASSEN, 1992). Outros trabalharam com ratos Sprague-Dawley orquiectomizados (HOCK et al., 1988; GUNNESS e ORWOLL, 1995; LI et al., 1995).

Para estudos sobre efeitos da pinealectomia ou reposição de melatonina também são comumente utilizados ratos. HOFFMAN e REITER (1965) descreveram o

procedimento cirúrgico para retirada da glândula pineal em hamsters e pequenos roedores utilizando um pequeno disco denteado, para abertura e exposição do local, e uma pinça para captura da pineal. A glândula, nestes animais, está localizada logo abaixo do seio venoso, sob a calota craniana na altura da referência anatômica lâmbda (confluência entre sutura sagital e sutura lambdóide).

Apesar dos aspectos serem diferenciados quanto ao ciclo de sono e vigília em roedores e humanos, uma vez que os animais são mantidos em regime ideal de claro e escuro, as respostas fisiológicas são muito semelhantes em ambos. Assim, os estudos têm sido embasados na retirada da glândula ou na reposição hormonal, quando se deseja analisar os efeitos ou as relações da glândula pineal com outros aspectos corporais (ALONSO et al., 1978; HAKANSON e BERGSTROM, 1990; CASTROVIEJO et al., 1986; REITER et al., 1999; BARASSIN et al., 1999; WOLDEN-HANSON et al., 2000; CASTRO et al., 2002).

1.5 Métodos de Análise Óssea

Existem métodos importantes para detecção da osteoporose, *in vivo* ou não. A radiologia convencional proporciona informações sobre a estrutura, qualidade e quantidade óssea. Em homens e mulheres, um exame de radiogrametria do metacarpo, fotodensitometria radiográfica, absorciometria por fóton (único ou duplo), tomografia computadorizada quantitativa dão uma mostra da arquitetura óssea e mensuram as estruturas que a compõem. Mensurações corporais, análise ultra-sônica e biópsia óssea são outros exemplos de análise para verificação do tecido (WOOLF e DIXON, 1988). Alguns marcadores também indicam o grau, aumento ou diminuição, da espoliação óssea. Níveis sanguíneos alterados de cálcio e fosfato são indicativos de diversas doenças, embora não sejam tão conclusivos em se tratando de osteoporose.

Verifica-se que há aumento da síntese de fosfatase alcalina na osteoporose, mas níveis séricos de osteocalcina e pró-colágeno tipo I parecem não ser alterados durante a doença. A hidroxiprolina, um resíduo de aminoácido da proteína do colágeno pode ser utilizada como medida da reabsorção óssea a partir da verificação de sua excreção urinária (DELMAS e MALAVAL, 1993; GARNERO e DELMAS, 1996). A

piridinolina, um marcador que se liga ao colágeno, tem seus níveis urinários também aumentados durante a osteoporose (ERIKSEN, BRIXEN e CHARLES, 1995).

Um outro marcador que possibilita o estudo do metabolismo ósseo normal ou em condições patológicas, é o ácido 3-carboxiglutâmico (Gla), cuja concentração urinária diminui em pacientes com hiperparatireoidismo (PARVIAINEN et al., 1991).

É possível analisar as estruturas ósseas através de parâmetros que quantifiquem os minerais presentes, bem como as cargas suportadas pelo osso. Assim, dosagem de cálcio e fosfato podem ser úteis no sentido de indicar a quantidade de material mineral. Quando se realiza pesagem óssea, seja com o osso intacto ou já desidratado ou incinerado, pode-se inferir o percentual de material orgânico e de água presentes.

Estas medidas citadas, já identificadas na literatura, podem se associar aos parâmetros biomecânicos, que avaliam a resistência do material a uma força externa aplicada à estrutura óssea. Parâmetros como *carga máxima* (carga máxima aplicada no momento da fratura óssea), *deformação* (distância movida pela carga até chegar à fratura), *rigidez* (curva relacionando a carga com a deformação) e *capacidade de absorção de energia* (área sobre a curva) são importantes para especificar as propriedades elásticas e rígidas ósseas (ENGESAETER, EKELAND e LANGELAND, 1978; PENG et al., 1994; SØGAARD et al., 1994; MOSEKILDE, THOMSEN e McOSKER, 1997).

MONTEAGUDO et al. (1997) compararam densitometria óssea e histomorfometria com dois índices de análise morfométrica do osso: índice de robusticidade e índice de peso/comprimento ósseo. O primeiro refere-se à relação entre o comprimento ósseo e a raiz cúbica do peso ósseo. Assim, quanto menor o índice, mais denso seria o osso. Isto difere do índice de Seedor (peso/comprimento ósseo) que indica relação diretamente proporcional quanto à densidade óssea.

Faz-se importante que distintos trabalhos utilizem parâmetros diferenciados para análise óssea. Quanto mais correlações são encontradas, mais evidências serão descritas sobre o que se deseja avaliar e, portanto, em se tratando de tecido ósseo, melhores serão as perspectivas quanto à prevenção ou tratamento de doenças.

2 OBJETIVOS

Baseando-se nos resultados obtidos anteriormente no laboratório e do que a literatura já afirma sobre os efeitos da melatonina sobre o tecido ósseo, o objetivo deste trabalho foi verificar as possíveis decorrências da ausência de melatonina (pinealectomia) sobre o fêmur de ratos, bem como os efeitos da reposição hormonal, a partir de diferentes parâmetros de análise óssea.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados ratos Wistar adultos, com 4 meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos e mantidos no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia/DCF, em um regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro) e temperatura controlados ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

3.2 Protocolo experimental

Os animais foram divididos em 8 grupos (cada grupo contendo $n = 7$ ou 8 ratos):

- 1) Basal (sacrificados no início do experimento - 4 meses de idade - Basal);
- 2) Pinealectomizados-sham (cirurgia fictícia) (Sham);
- 3) Pinealectomizados e Intactos (não orquiectomizados) (Px.Controle);
- 4) Pinealectomizados e Orquiectomizados (Px.Orq.);
- 5) Pinealectomizados, orquiectomizados tratados com melatonina (Px.Orq.Mel.);
- 6) Pinealectomizados, orquiectomizados tratados com salina (Px.Orq.Sal.);
- 7) Pinealectomizados e intactos tratados com melatonina (Px.Controle Mel.);
- 8) Pinealectomizados e intactos tratados com salina (Px.Controle Sal.);

Os grupos de número 2 a 8 finalizaram o período de experimento com aproximadamente 6 meses de idade.

3.3 Pinealectomia

A pinealectomia foi realizada conforme técnica descrita por HOFFMAN e REITER (1965). Após sacrifício dos animais, foi retirada a calota craniana para confirmação de dissecação total da glândula pineal.

Para o grupo Sham, o procedimento realizado foi o mesmo, exceto que não houve a retirada da glândula.

3.4 Orquiectomia

A orquiectomia foi realizada conforme técnica descrita por ZARROW, YOCHIM e McCARTHY (1964), um dia após a realização da pinealectomia. Após sacrifício dos animais, foi verificada a atrofia das vesículas seminais e próstata ventral para confirmação da castração.

3.5 Tratamento dos animais

O tratamento com melatonina iniciou-se 24 horas após a castração, com injeções subcutâneas uma vez ao dia, entre 17-18 horas. A dose utilizada foi de 200 µg/kg e a melatonina foi diluída em água e etanol (CASTROVIEJO et al., 1986; BERTONCELLO, 2001). O tratamento foi estabelecido durante 8 semanas (6 dias por semana), período em que os animais tiveram comida (ração comercial) e água à vontade.

A dose de solução salina (0,9%) utilizada foi de 0,1 ml/100g PC, com injeções subcutâneas também diariamente, entre 17-18h.

3.6 Variáveis estudadas

3.6.1 Biométricas

Massa Corporal

No decorrer das 8 semanas de tratamento, semanalmente, foram verificados os valores de massa corpórea dos animais a fim de preparar a solução a ser injetada, de acordo com a massa de cada animal. No final do experimento, os animais foram pesados e sacrificados por decapitação. A variação de massa corporal, desde início e fim de experimento, foi analisada.

Medida de comprimento do fêmur direito

Foram medidos os comprimentos dos fêmures direitos com um paquímetro (precisão 0,05 mm), tomando como referência a região distal dos côndilos femorais (região articular com a tibia) e saliência óssea mais proximal do trocanter maior.

Medida das espessuras das diáfises femorais

Os diâmetros interno e externo das diáfises femorais foram medidos, a fim de verificar as espessuras das paredes látero-lateral e ântero-posterior do osso.

Após o teste de fratura, cada segmento distal ósseo foi separado. A seguir, padronizou-se um ponto de referência próximo à diáfise óssea (porção próxima ao local de fratura) e realizou-se um corte de aproximadamente 1 mm de espessura de todo o anel ósseo, no sentido transversal ao eixo longitudinal do osso. O mesmo foi colocado, na posição de proximal para distal, sob uma lupa ZEISS STEMI SV 6. Utilizou-se um aumento de 1,0 – 0,100 mm/traço.

3.6.2 Ensaio mecânico de flexão a três pontos do fêmur direito

Foi realizado o teste biomecânico (flexão óssea) com o fêmur direito. Os ensaios mecânicos foram realizados numa máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444, em temperatura ambiente. As extremidades do fêmur ficaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3,0 mm, suportados por apoios distanciados de 21,70 mm (Figura 2).

A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido pósterio-anterior, no meio da distância entre os dois apoios, por uma haste cilíndrica com um rolete de 3,00 mm fixada na sua extremidade, numa velocidade constante de 0,5 cm/min até a fratura do osso. Foi utilizada a célula de carga Instron, modelo CM, de capacidade máxima de 100 kgf.



Figura 2: Detalhe da máquina de ensaio universal (modelo Instron 4444) durante teste de flexão a três pontos. A, osso; B, haste cilíndrica para aplicação da carga; C, célula de carga acoplada à ponte de extensimetria; D, suporte para o material analisado; E, painel de controle dos parâmetros analisados

Dos gráficos força por deslocamento, foram obtidos os valores de carga máxima suportada pelas amostras até a fratura. A partir desses dados, foi analisado o Momento Máximo de Força.

$$M = \frac{PL}{4} \text{ (kgf.mm)}$$

onde: M = maior momento de força (kgf.mm); P = maior carga suportada (kgf);

L = distância dos apoios (mm).

Também analisou-se a deformação do tecido ósseo durante o teste de flexão a três pontos. A força máxima e a deformação foram relacionadas a fim de se verificar a rigidez (SØGAARD et al., 1994).

3.6.3 Propriedades físicas do fêmur direito

Após fratura óssea em teste de flexão a três pontos do fêmur, os ossos foram submersos em água destilada e colocados no dessecador durante 24 horas a fim de ser retirado o ar dos poros ósseos. Foram verificadas as seguintes medidas de peso do osso: peso imerso (P_i) e peso úmido (P). A seguir, os ossos foram colocados em estufa a 100° C durante 24 horas para serem desidratados. Obteve-se, em seguida, o peso seco (P_s). No passo seguinte, os ossos foram colocados em uma mufla a 800° C durante 24 horas a fim de se obter somente o material mineral, do qual também se verificou o peso (P_m) (CANOTILHO, 1996). Para obtenção de todas as medidas citadas, foi utilizada balança eletrônica (marca Chyo).

Por meio de fórmulas seguindo o Princípio de Arquimedes, calculou-se a densidade óssea e mineral dos fêmures direitos, a partir da verificação também de outros parâmetros, conforme abaixo (MARTIN, 1990):

$$\text{Volume Ósseo} = \frac{P - P_i}{\rho} \text{ (cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade Óssea} = \frac{P}{\text{Volume Ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade Mineral} = \frac{P_m}{\text{Volume Ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Percentual Ósseo de Água} = 100 \times \frac{(P - P_s)}{P}$$

$$\text{Percentual Ósseo de Material Orgânico} = 100 \times \frac{(P_s - P_m)}{P}$$

$$\text{Percentual de Material Mineral} = 100 \times \frac{P_m}{P}$$

Onde:

P_m - Peso do Material Mineral

P_s - Peso Ósseo da Amostra Desidratada

P - Peso Úmido do Osso

P_i - Peso do Osso Imerso

ρ - Densidade da Água

3.6.4 Qualidade óssea do fêmur direito

Após a obtenção dos resultados referentes à densidade mineral e ao teste de flexão do fêmur direito, estes dados foram relacionados entre si a fim de se verificar a qualidade óssea (SØGAARD et al., 1997). Para isso foi utilizada a seguinte fórmula:

$$S = \frac{F \text{ máx}}{\rho_m}$$

onde: S = força máxima normalizada (Qualidade Óssea)[N/(mg/cm³)]; F = máxima carga aplicada até provocar fratura óssea (N); ρ_m = densidade mineral (mg/mm³).

O Índice de Seedor, relacionando peso úmido do osso com seu comprimento, também foi verificado.

3.6.5 Densitometria do fêmur esquerdo

Foram verificados o conteúdo mineral ósseo (BMC), a área óssea (BA) e a densidade mineral óssea (BMD) do fêmur esquerdo de cada animal, através de densitometria de duplo fóton (DEXA), em um equipamento pDEXA®SABRE™ X-Ray BONE DENSITOMETER (Norland Medical System, INC., Fort Atkinson, WI, EUA), no Laboratório de Estrutura e Função Celular – ICB III – Universidade de São Paulo – São Paulo.

O método baseia-se na análise computadorizada da atenuação de um feixe puntiforme de raios-X emitidos por uma fonte móvel constituída por fótons de duas energias distintas, 38 ou 70 KeV. Durante a realização do exame, um detector, movendo-se juntamente com a fonte de raios-x, faz a amostragem dos fótons que

passam através de qualquer estrutura colocada entre a fonte e o detector. Um software, especialmente desenvolvido para isso, calcula a densidade de cada amostra a partir da equação de transmissão de fótons. A utilização dos níveis de energia permite a distinção entre a densidade de tecidos mineralizados e tecidos moles, minimizando erros que resultam da irregularidade da distribuição dos tecidos moles na amostra. Os resultados apresentados são utilizados para a construção de uma imagem que permite a identificação e análise das regiões de interesse.

3.6.6 Análise da Superfície Óssea Trabecular por Microscopia Eletrônica de Varredura

Foi analisada, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a porção distal das amostras de fêmur esquerdo.

Realizou-se criofratura da porção distal do fêmur esquerdo, após a amostra ser mantida em nitrogênio líquido por 2 minutos. A fratura foi feita entre os côndilos femorais no plano sagital, com auxílio de um martelo e bisturi e as amostras foram submersas imediatamente em álcool absoluto.

Após a criofratura os espécimes ficaram mantidos em estufa à 50°C por 3 horas, fixados em solução formaldeído 4%, glutaraldeído 1%, tampão fosfato 0,1 M durante 24 horas à -5°C e lavadas em solução tampão 0,1 M, pH 7,4, de 4 a 5 vezes.

Para remoção do material orgânico, as amostras foram mantidas em água destilada à 37°C, trocada diariamente, durante 2 dias; e depois mantidas em solução de hipoclorito de sódio (5%) à 37°C por 48 horas, sendo então lavadas várias vezes em água destilada para remoção da solução de hipoclorito de sódio.

Após este procedimento inicial, os espécimes foram desidratados em soluções crescentes de álcool, permanecendo 20 minutos em cada solução (70°, 80°, 90°, 95° e 100°). A seguir o material secou em estufa à 100°C por 3 dias.

Em seguida, os espécimes ficaram mantidos em solução HMDS (1,1,1,3,3,3-Hexamethyldizilazane) para completar o processo de desidratação.

As amostras foram então coladas em suportes de alumínio e uma tinta à base de prata foi passada em volta das amostras para facilitar o fluxo dos elétrons e, a seguir, as mesmas foram recobertas com uma fina camada de ouro (Sputter Coater – Balzers

ISCD004, Bal-Tec), tornando-as condutoras para serem observadas ao microscópio eletrônico de varredura (Philips FEG XL30).

Foi utilizado o aumento de aproximadamente 40 vezes da amostra para caracterização da região dos côndilos femorais (epífise óssea), sendo possível a observação da região de metáfise central. Com o aumento de 80 vezes na região da metáfise central observou-se qualitativamente o volume medular, a conectividade entre as trabéculas e as alterações de arquitetura trabecular (CLARK, 1991; ZHOU, CHERNECKY e DAVIES, 1994; CANOTILHO, 1996).

Após a captação das fotos ósseas pelo MEV, as mesmas foram transferidas para o programa de análise digital Image Pro Plus 4.0 e software Picasa. As fotos receberam tratamento de acordo com os recursos disponíveis nos *software*.

3.7 Análise estatística

Os dados obtidos em cada grupo (Média \pm EPM), para cada parâmetro analisado, foram comparados entre si através do *Teste não paramétrico de Mann-Whitney*, utilizando um coeficiente de variação menor que 0,05.

Os resultados de cada grupo, para cada parâmetro analisado, são apresentados no APÊNDICE.

3.8 Norma metodológica

As citações, referências bibliográficas, estrutura e composição desse trabalho seguiram a Norma 14724/2002 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As referências estão conforme a NBR 6023 e as citações seguindo a NBR 10520 (DUPAS, 2004).

4 RESULTADOS

4.1 Massa Corporal

Em relação à Massa Corporal, os grupos não diferiram estatisticamente, entre si, no início do experimento (Tabela 1). Houve aumento significativo de ganho de peso corporal para o grupo de ratos pinealectomizados. No entanto, a pinealectomia associada à orquiectomia não promoveu alteração do ganho de peso corporal dos animais, em relação ao grupo Sham, mas foi significativamente menor do que o grupo de animais somente pinealectomizados.

Tabela 1: Massa Corporal Inicial e Final e Ganho de Massa dos animais dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)

	Massa Corporal Inicial (g)	Massa Corporal Final (g)	Ganho de Massa Corporal (g)
Basal	342,90 \pm 8,91		
Sham	334,57 \pm 4,17	394,43 \pm 6,13	59,86 \pm 3,22
Px.Controle	331,00 \pm 7,47	404,86 \pm 9,93	73,86 \pm 6,78 [#]
Px.Orq.	338,86 \pm 3,32	385,71 \pm 3,79	46,86 \pm 6,81 ⁺
Px.Orq.Sal.	348,14 \pm 3,49	370,43 \pm 4,69	22,29 \pm 4,47 ⁺
Px.Orq.Mel.	341,57 \pm 3,78	361,71 \pm 3,96	20,14 \pm 3,62 ^{+b}
Px.Controle Sal.	347,38 \pm 6,36	402,25 \pm 12,89	54,88 \pm 8,44 ⁺
Px.Controle Mel.	349,13 \pm 2,77	382,25 \pm 3,42	33,13 \pm 4,38 ⁺ⁱ

[#] p<0,05 vs Sham; ⁺ p<0,05 vs Px.Controle; ^b p<0,05 vs Px.Orq.Sal.; ⁱ p<0,05 vs Px.Controle Sal.

Os valores relacionando a massa corporal inicial e final dos animais são apresentados na Figura 3. Já os valores de ganho de massa corporal, para cada grupo, são mostrados na Figura 4.

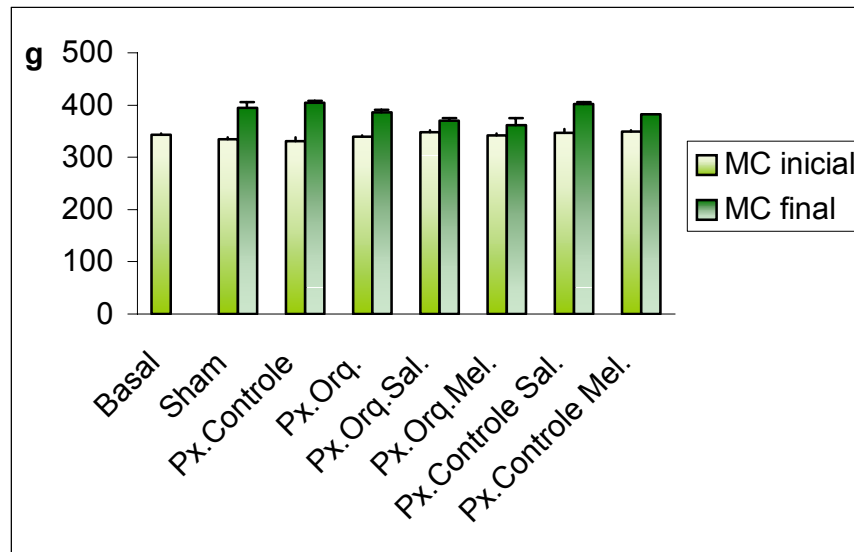


Figura 3: Massa corporal inicial e final dos animais dos diferentes grupos experimentais (MC = massa corporal)

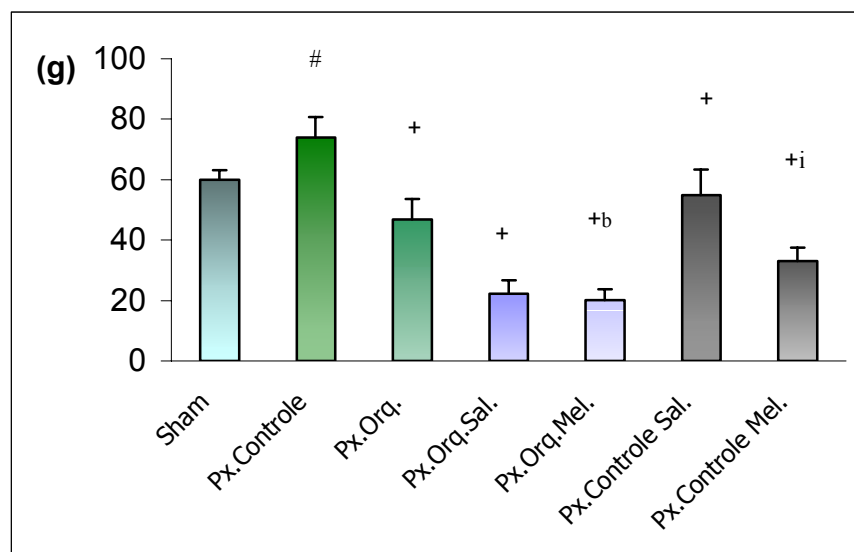


Figura 4: Ganho de massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais (# $p < 0,05$ vs Sham; + $p < 0,05$ vs Px.Controle; ^b $p < 0,05$ vs Px.Orq.Sal.; ⁱ $p < 0,05$ vs Px.Controle Sal.)

4.2 Análise do fêmur direito

A Tabela 2 apresenta os resultados referentes ao comprimento do fêmur e espessuras das diáfises nos sentidos látero-lateral e ântero-posterior, bem como parâmetros referentes às propriedades físicas (volume e densidade mineral).

Não houve diferenças entre os grupos, quanto ao comprimento do fêmur, quando comparados entre si, com exceção dos mesmos comparados ao grupo Basal (Figura 5).

Tabela 2: Valores de parâmetros físicos e biométricos do fêmur direito de ratos dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)

	Comprimento do fêmur (mm)	Espessura Lateral (mm)	Espessura Sagital (mm)	Volume (cm ³)	Densidade Mineral (mg/cm ³)
Basal	37,54 \pm 0,420	1,836 \pm 0,051	1,414 \pm 0,015	0,470 \pm 0,020	701,00 \pm 10,0
Sham	39,33 \pm 0,176*	1,771 \pm 0,061	1,478 \pm 0,053	0,541 \pm 0,010*	764,78 \pm 11,7
Px.Controle	39,40 \pm 0,580*	1,779 \pm 0,080	1,600 \pm 0,050* [#]	0,551 \pm 0,033*	741,31 \pm 10,8
Px.Orq.	39,31 \pm 0,121*	1,707 \pm 0,146	1,657 \pm 0,072* [#]	0,533 \pm 0,009*	712,80 \pm 14,6
Px.Orq.Sal.	38,54 \pm 0,358*	1,779 \pm 0,136	1,450 \pm 0,041	0,541 \pm 0,011*	700,29 \pm 4,64
Px.Orq.Mel.	38,38 \pm 0,240*	1,750 \pm 0,091	1,529 \pm 0,066	0,556 \pm 0,012*	705,66 \pm 9,75
Px.Controle Sal.	39,72 \pm 0,339*	1,736 \pm 0,051	1,507 \pm 0,049	0,608 \pm 0,019*	646,77 \pm 12,7 ⁺
Px.Controle Mel.	39,00 \pm 0,155*	1,879 \pm 0,113	1,479 \pm 0,046	0,575 \pm 0,011*	696,24 \pm 9,84 ⁱ⁺

* p<0,05 vs Basal; [#] p<0,05 vs Sham; ⁺ p<0,05 vs Px. Controle; ⁱ p<0,05 vs Px.Controle Sal.;

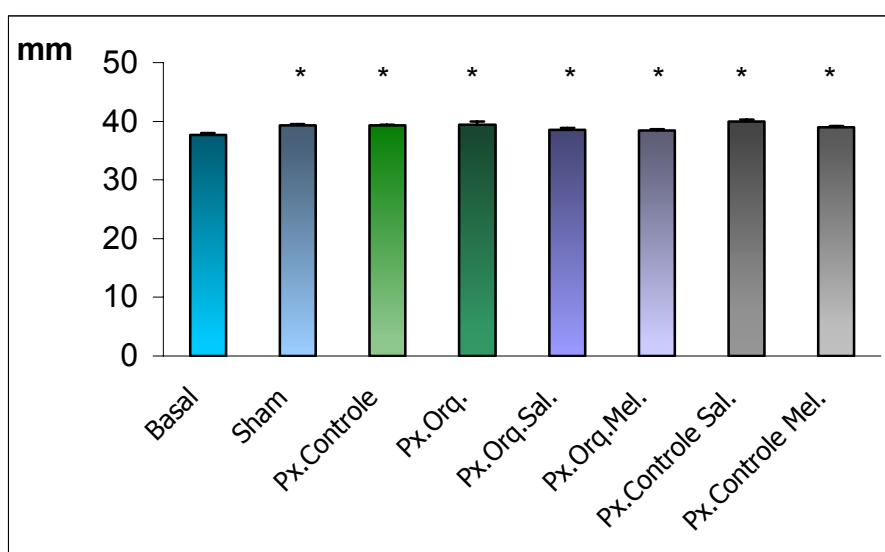


Figura 5: Comprimento do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais (* p<0,05 vs Basal)

Em se tratando das medidas de espessuras, não houve diferenças para as espessuras laterais. No entanto, verificou-se valores maiores de espessura ântero-posterior da diáfise óssea para os grupos de animais pinealectomizados castrados e pinealectomizados não castrados quando comparados aos grupos Basal e Sham (Figura 6).

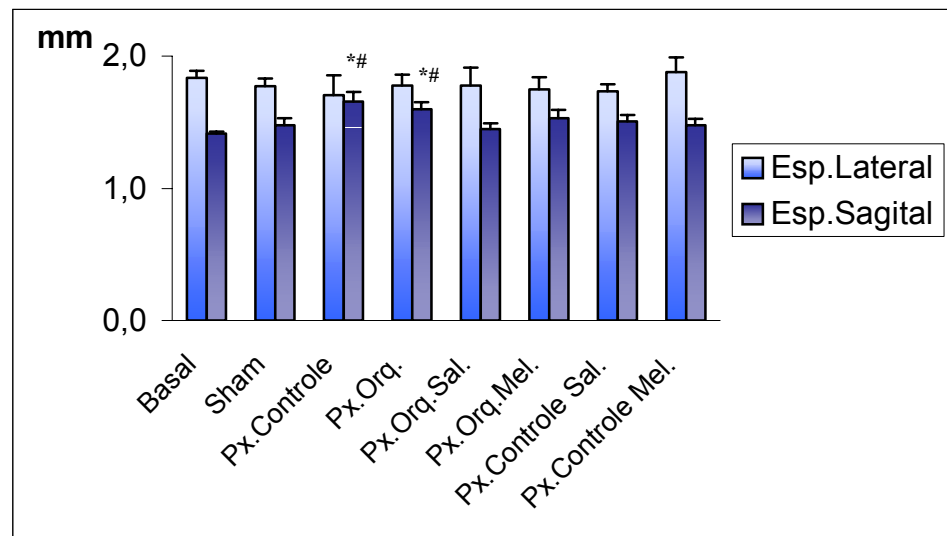


Figura 6: Espessura lateral e espessura sagital da diáfise do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais (Espessura sagital: * $p < 0,05$ vs Basal; # $p < 0,05$ vs Sham)

Quanto aos valores referentes a parâmetros físicos do fêmur, o volume ósseo não diferiu entre os grupos, com exceção dos mesmos em relação ao grupo Basal (Figura 7).

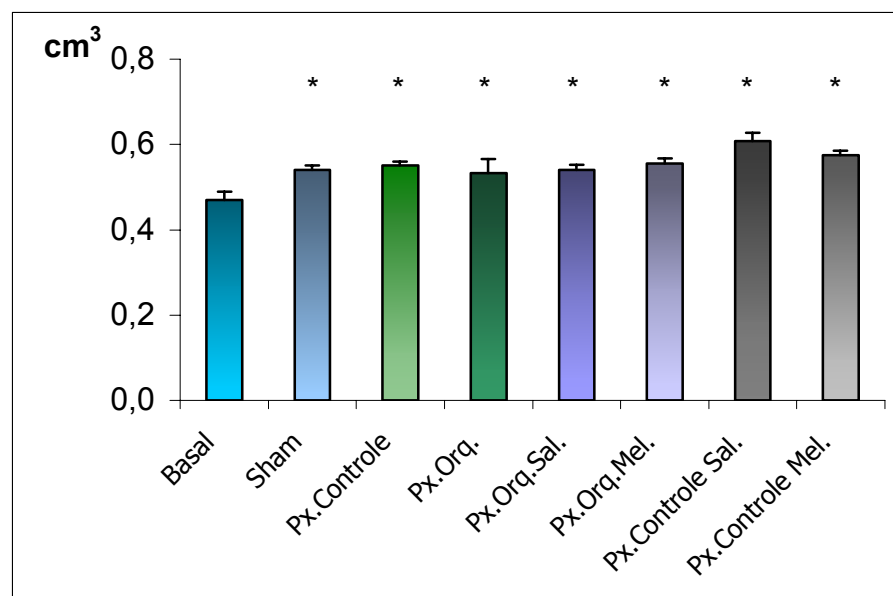


Figura 7: Volume ósseo femoral dos animais dos diferentes grupos experimentais

A densidade mineral variou entre os grupos de animais Pinealectomizados não castrados tratados ou com salina ou com melatonina e o grupo de animais Pinealectomizados não castrados sem tratamento. Quando se comparou os grupos de animais Pinealectomizados castrados tratados com salina e Pinealectomizados castrados tratados com melatonina, verificou-se maior resultado para este último grupo (Figura 8).

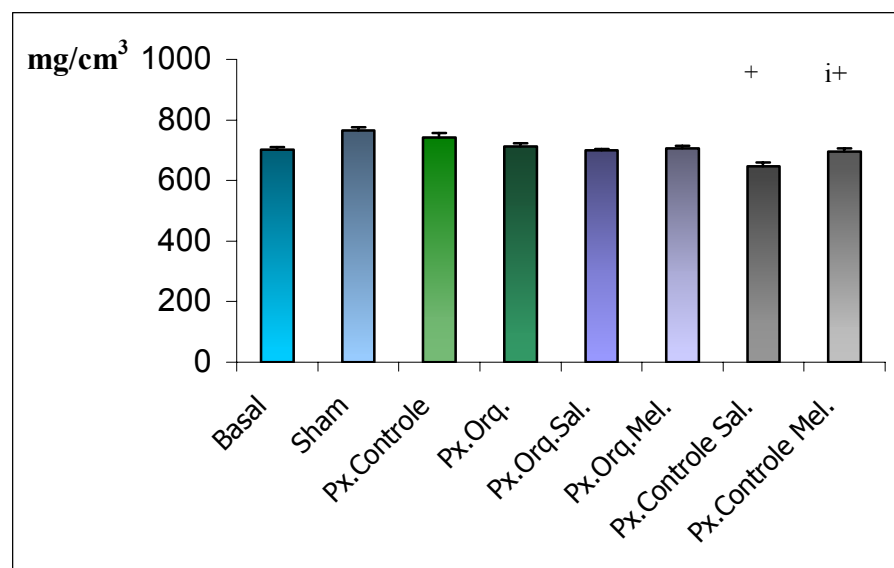


Figura 8: Densidade Mineral Óssea do fêmur direito dos ratos dos diferentes grupos experimentais ([†] p<0,05 vs Px. Controle; ⁱ p<0,05 vs Px.Controle Sal.)

Na Tabela 3 são apresentados os valores de força máxima e deformação do fêmur, obtidos no teste de flexão a três pontos. A partir destes valores, obteve-se também a rigidez, que é a relação entre eles. Também, nesta tabela encontra-se o índice de Seedor, relacionando valores de peso ósseo com seu comprimento. Não houve diferenças deste índice para qualquer um dos grupos experimentais. No entanto, valores de deformação foram significativamente maiores para os grupos Sham e Px. Controle comparados ao grupo Basal. Houve menores valores para os grupos Px.Controle Sal. e Px.Controle Mel. em relação ao grupo Px.Controle.

Tabela 3: Valores de força máxima, deformação, rigidez e Índice de Seedor do fêmur direito de ratos dos diferentes grupos experimentais (Média ± EPM)

	Força Máxima (N)	Deformação (mm)	Rigidez (N/mm)	Índice de Seedor (g/mm)
Basal	97,99 ± 3,45	0,66 ± 0,02	132,33 ± 5,25	0,022 ± 0,0005
Sham	105,66 ± 3,79 *	1,52 ± 0,84*	144,36 ± 4,79	0,024 ± 0,0003
Px.Controle	100,8 ± 5,97	1,57 ± 0,83*	128,02 ± 6,96 #	0,024 ± 0,0008
Px.Orq.	95,49 ± 3,88	0,77 ± 0,023	123,34 ± 3,71	0,023 ± 0,0002
Px.Orq.Sal.	95,34 ± 2,44	0,74 ± 0,017	129,04 ± 4,65	0,024 ± 0,0003
Px.Orq.Mel.	98,01 ± 2,97	0,69 ± 0,044	143,33 ± 6,11 ^{ab}	0,024 ± 0,0004
Px.Controle Sal.	87,31 ± 3,09 ⁺	0,63 ± 0,055 ⁺	144,35 ± 10,08	0,025 ± 0,0005
Px.Controle Mel.	100,00 ± 3,46 ⁱ	0,69 ± 0,068 ⁺	151,88 ± 10,47 ^{*+}	0,024 ± 0,0003

*p<0,05 vs Basal; # p<0,05 vs Sham; ⁺ p<0,05 vs Px.Controle; ⁱ p<0,05 vs Px.Controle Sal.; ^a p<0,05 vs Px.Orq.; ^b p<0,05 vs Px.Orq.Sal.

Em relação à Rigidez, foram encontrados valores significativamente menores para o grupo Px.Controle em relação ao grupo Sham. Para o grupo de animais Pinealectomizados e castrados tratados com Meltonina, a rigidez foi significativamente maior quando comparada aos grupos de ratos Pinealectomizados castrados e também de ratos Pinealectomizados castrados mas tratados com salina. O grupo Pinealectomizado Controle tratado com Melatonina apresentou valores de rigidez também significativamente mais elevados do que os grupos Basal e Pinealectomizados Controle sem tratamento (Figura 12).

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos quanto à Força Máxima suportada pelo fêmur durante teste de flexão a três pontos. Verificaram-se valores maiores para o grupo de animais Pinealectomizados intactos tratados com Melatonina comparados ao grupo de animais Pinealectomizados intactos tratados com salina. O mesmo resultado repetiu-se quanto ao parâmetro Momento Máximo de Força (Figura 10). Em relação a este último parâmetro, observa-se valores maiores para todos os grupos quando comparados ao grupo Basal.

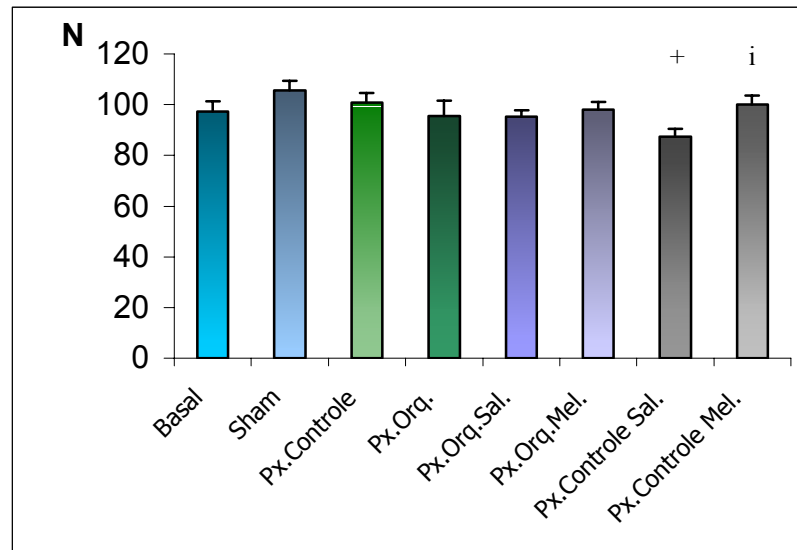


Figura 9: Força Máxima suportada pelo fêmur de ratos dos diferentes grupos experimentais no teste biomecânico (+ vs Px.Controle; ⁱ vs Px.Controle Sal.)

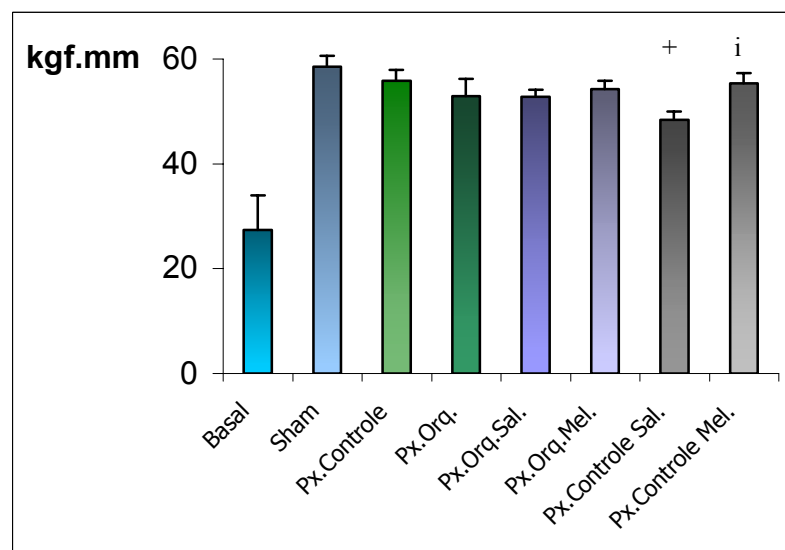


Figura 10: Momento Máximo de Força do fêmur de ratos dos diferentes grupos experimentais no teste biomecânico (+ vs Px.Controle; ⁱ vs Px.Controle Sal.)

Através da Figura 11, pode-se verificar os resultados referentes à Força Máxima Normalizada. Trata-se da relação entre a Força Máxima e a Densidade Mineral do fêmur. Não houve diferenças entre os grupos, mas é possível notar a tendência para maior valor de qualidade óssea dos fêmures dos animais do grupo Pinealectomizados não castrados tratados com Melatonina comparado aos animais de grupo semelhante mas tratados com salina.

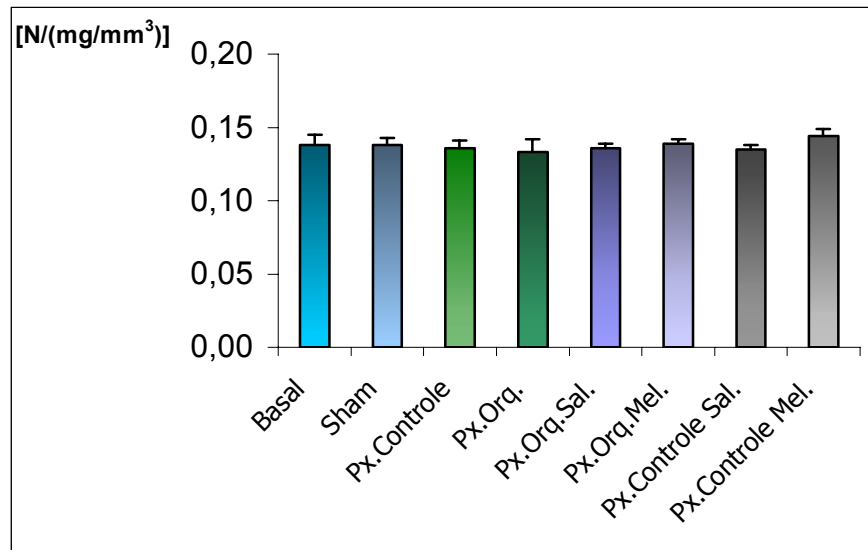


Figura 11: Força Máxima Normalizada do fêmur de ratos dos diferentes grupos experimentais

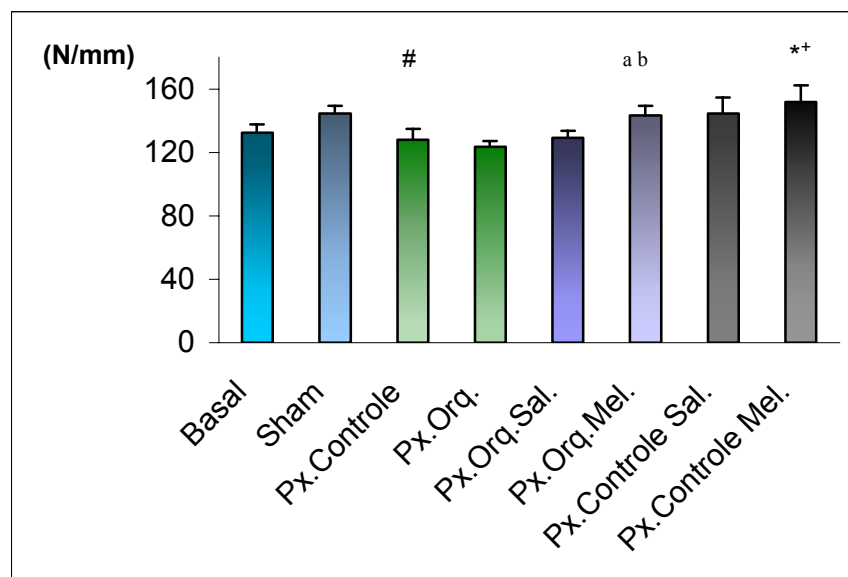


Figura 12: Valores de Rigidez do fêmur de ratos dos diferentes grupos experimentais obtidos com o teste biomecânico

(* p<0,05 vs Basal; # p<0,05 vs Sham; + p<0,05 vs Px.Controle;
^a p<0,05 vs Px.Orq.; ^b p<0,05 vs Px.Orq.Sal.)

4.3 Análise do fêmur esquerdo

O fêmur esquerdo de cada animal foi analisado a partir da densitometria de duplo fóton. A Tabela 4 demonstra os valores médios referentes às análises de densitometria óssea realizada com o fêmur esquerdo dos animais.

Tabela 4: Conteúdo Mineral Ósseo (BMC), Área Óssea (BA) e Densidade Mineral Óssea (BDA) do fêmur esquerdo dos animais dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)

	BMC (g)	BA (cm ²)	BMD (g/cm ²)
Basal	0,360 \pm 0,01	2,380 \pm 0,05	0,151 \pm 0,002
Sham	0,443 \pm 0,05	2,549 \pm 0,02	0,174 \pm 0,001
Px.Controle	0,430 \pm 0,02	2,536 \pm 0,06	0,169 \pm 0,003
Px.Orq.	0,398 \pm 0,01	2,504 \pm 0,04	0,158 \pm 0,001 #
Px.Orq.Sal.	0,415 \pm 0,01	2,511 \pm 0,05	0,165 \pm 0,001 #a
Px.Orq.Mel.	0,424 \pm 0,06	2,495 \pm 0,03	0,170 \pm 0,001 ab
Px.Controle Sal.	0,426 \pm 0,01	2,622 \pm 0,04	0,162 \pm 0,002 #
Px.Controle Mel.	0,443 \pm 0,01	2,618 \pm 0,02	0,169 \pm 0,003

p<0,05 vs Sham; ^a p<0,05 vs Px.Orq.; ^b p<0,05 vs Px.Orq.Sal.

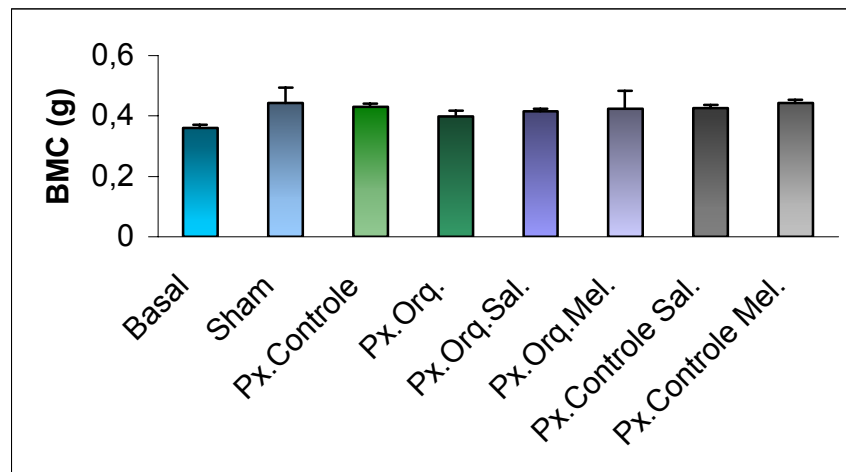


Figura 13: Conteúdo mineral ósseo do fêmur esquerdo dos animais dos diferentes grupos experimentais

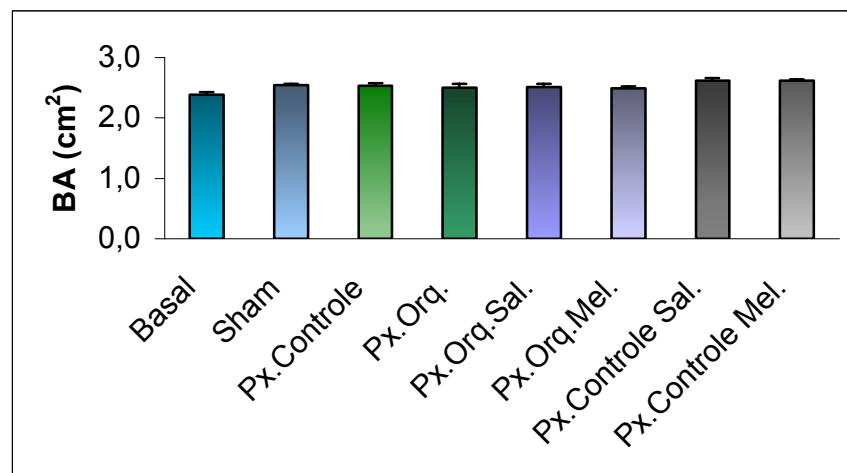


Figura 14: Área do fêmur esquerdo dos animais dos diferentes grupos experimentais

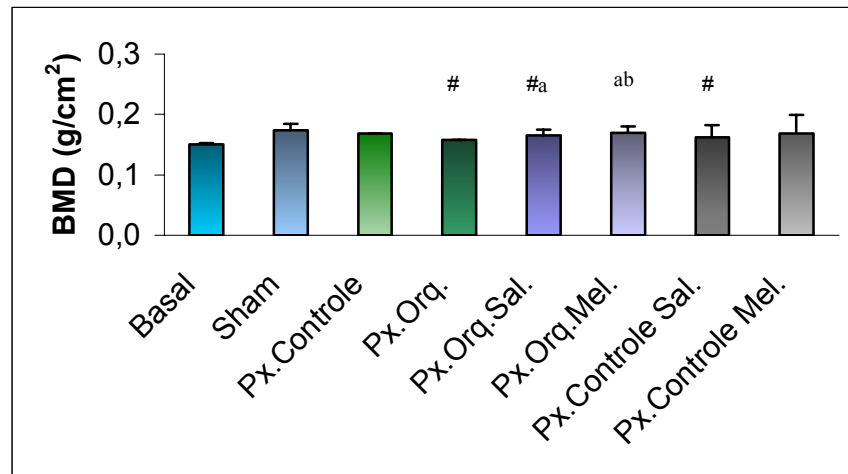


Figura 15: Densidade mineral do fêmur esquerdo dos animais dos diferentes grupos experimentais (# $p < 0,05$ vs Sham; ^a $p < 0,05$ vs Px.Orq.; ^b $p < 0,05$ vs Px.Orq.Sal.)

Não houve diferenças significativas, entre os grupos, quanto ao parâmetros conteúdo mineral ósseo. No entanto, verifica-se uma tendência de manutenção da massa óssea comparando o grupo pinealectomizado intacto e tratado com melatonina e o grupo sham (Figura 13). Também não se verificaram diferenças significativas, entre os grupos, para o parâmetro área óssea (Figura 14).

Quanto à densidade mineral óssea do fêmur esquerdo, houve significativamente maiores valores para o grupo Sham, comparados aos Px.Orq. e Px.Orq.Sal. Os grupos pinealectomizados castrados e tratados com salina ou melatonina também diferiram estatisticamente do grupo pinealectomizado castrado. Verifica-se, ainda, que o grupo de animais pinealectomizados castrados tratados com melatonina não diferiu do grupo Sham e ainda obteve maiores valores de BMD quando comparado aos animais do grupo pinealectomizados castrados tratados com salina (Figura 15).

Ainda, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura da região distal (côndilos femorais) dos ossos dos animais (Figuras 16 a 32).

Os animais que não sofreram cirurgia, nem orquiectomia nem pinealectomia, grupos Basal e Sham, apresentaram predominância de estruturas trabeculares em forma de platôs longitudinais, interconectados com trabéculas transversais, sem escavações evidentes (Figuras 16, 17, 18 e 19).

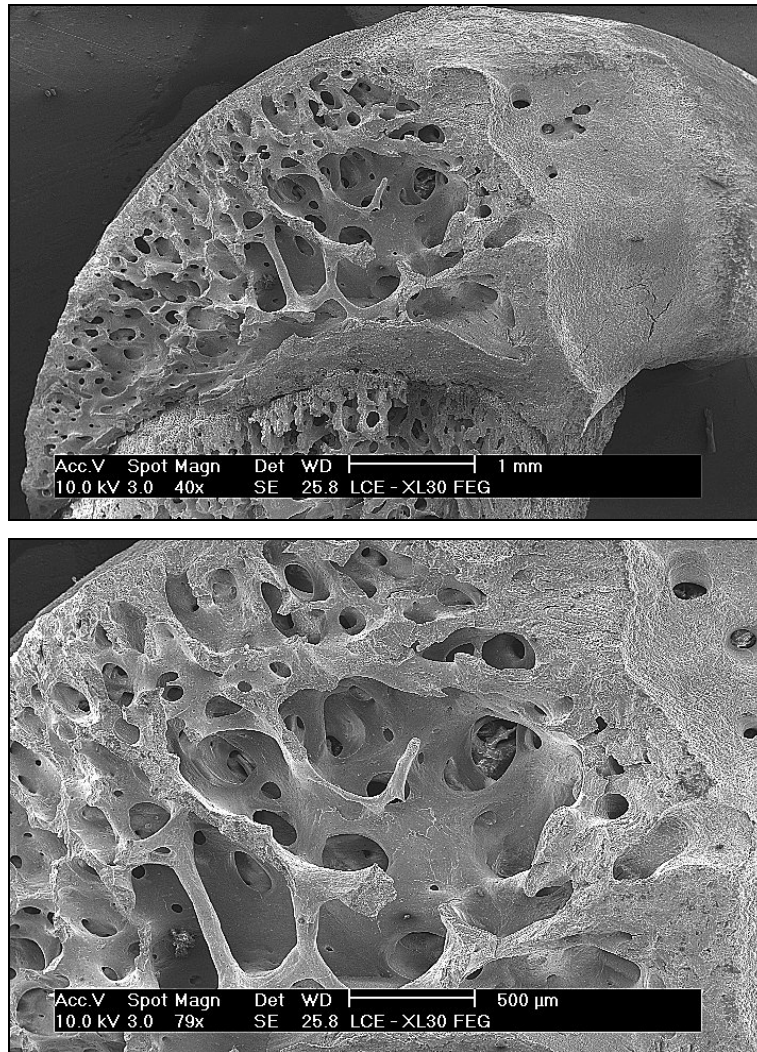


Figura 16: Micrografias do fêmur de rato do grupo de animais Basais

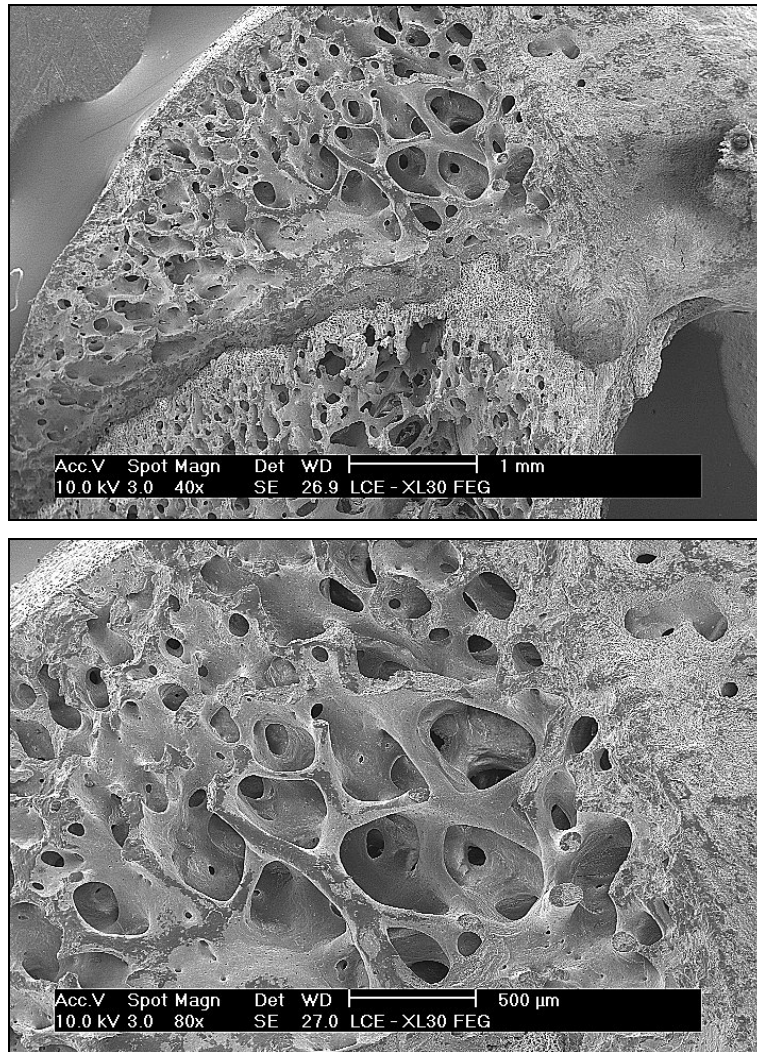


Figura 17: Micrografias do fêmur de rato do grupo de animais Basais

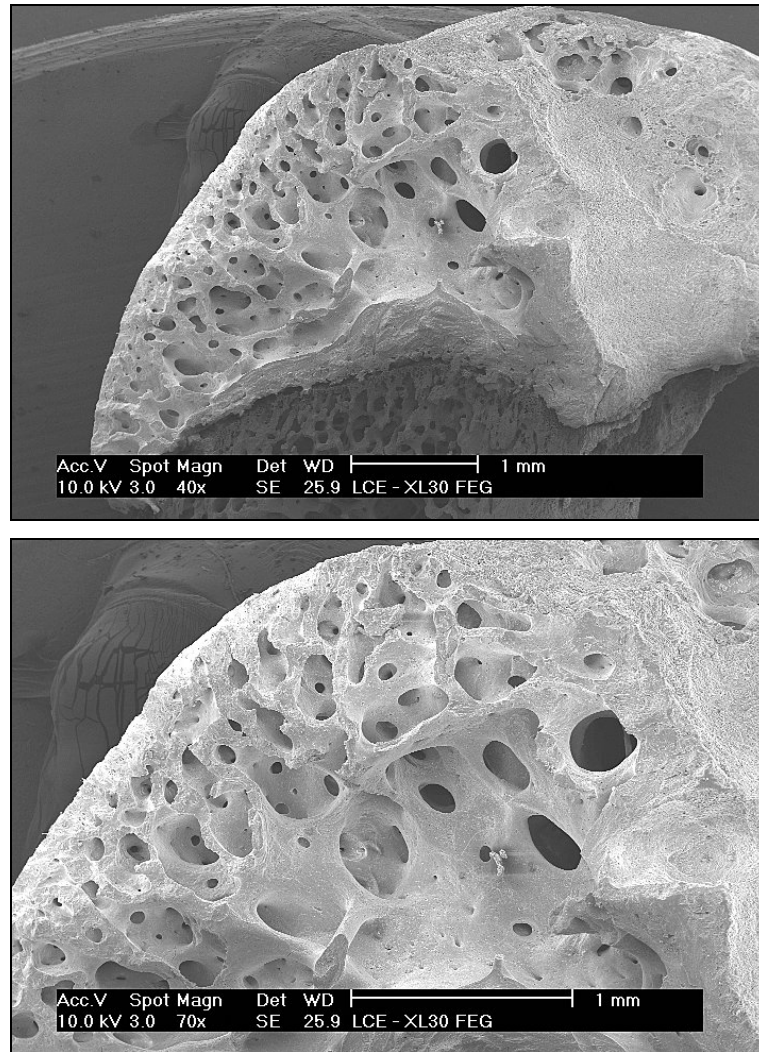


Figura 18: Micrografias do fêmur de rato do grupo de animais Sham

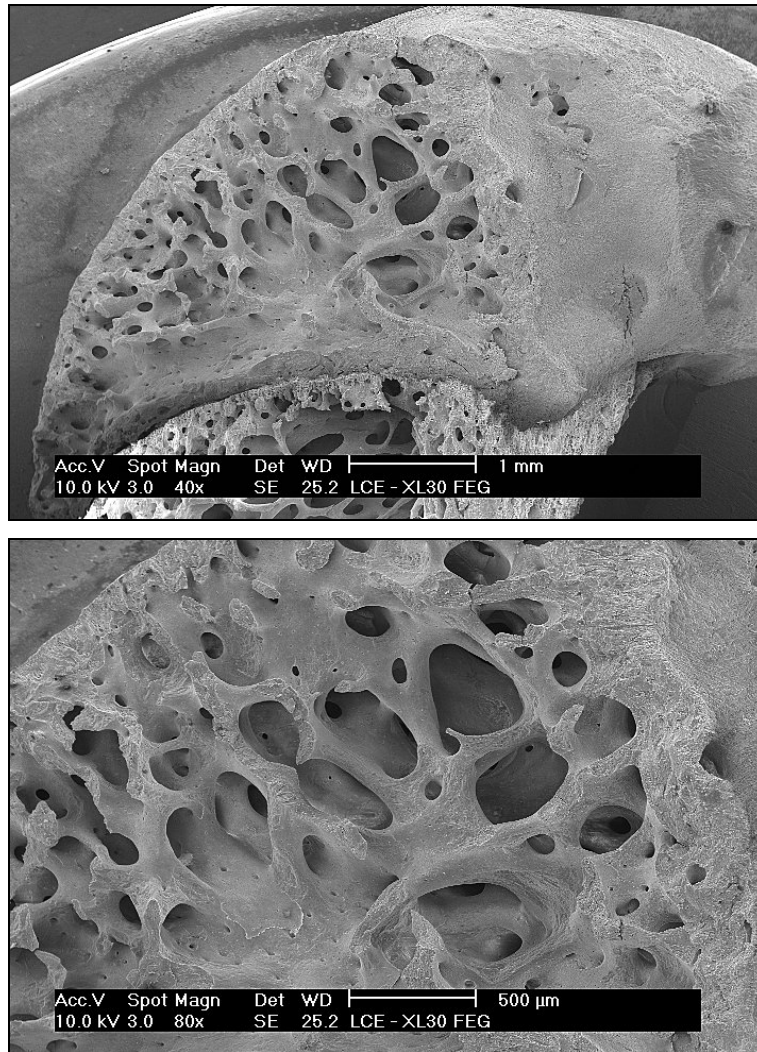


Figura 19: Micrografias do fêmur de rato do grupo de animais Sham

Verificou-se que houve alterações estruturais no arranjo trabecular dos côndilos femorais do animais que sofreram pinealectomia (Figuras 26 e 27), o que foi acentuado para os animais com dupla cirurgia, ou seja, pinealectomia associada à orquiectomia (Figuras 20 e 21). Houve maior espaçamento entre as trabéculas e os platôs trabeculares parecem substituídos por trabéculas mais finas, que apresentam perda de conectividade com as trabéculas vizinhas.

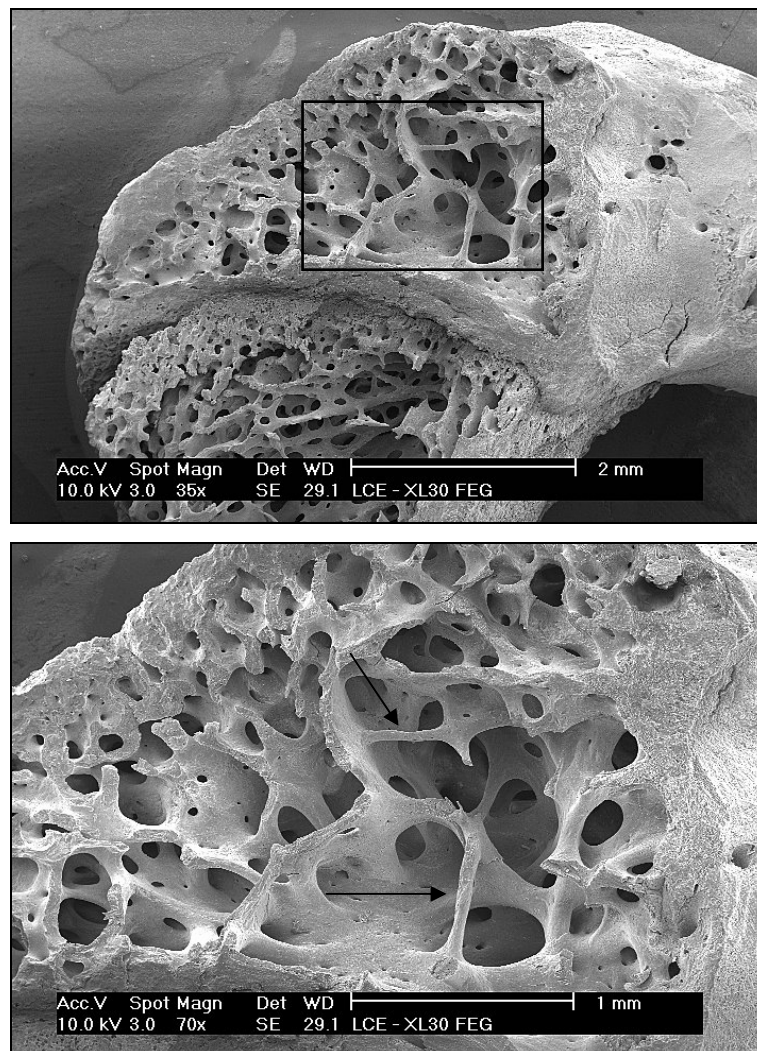


Figura 20: Micrografias do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e castrados. Notar evidente espaçamento entre as trabéculas (quadrado) e trabéculas mais finas (setas).

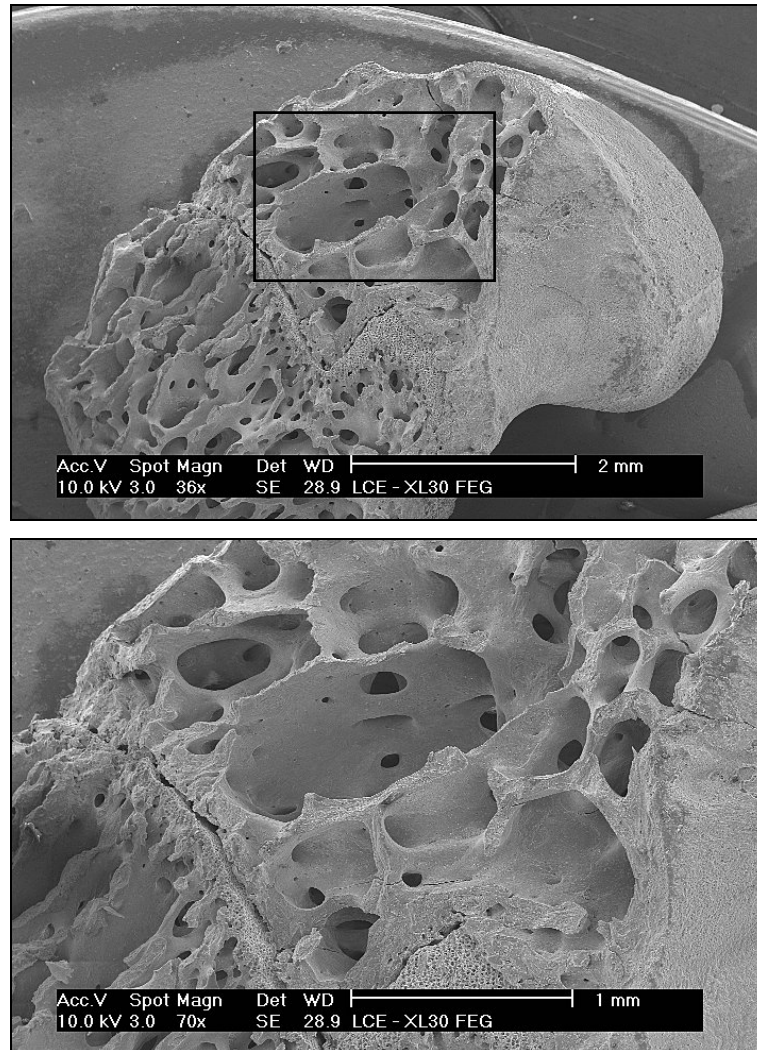


Figura 21: Micrografias do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e castrados.
Notar grande espaçamento entre as trabéculas (quadrado).

Para os animais castrados e pinealectomizados tratados ou com salina ou com melatonina, não houve alterações muito evidentes no que se refere à arquitetura trabecular. No entanto, os ossos dos animais que receberam salina apresentaram escavações maiores do que os dos animais que receberam melatonina. Porém, ambos têm trabéculas mais afinadas, persistindo o achado para o grupo de animais castrados e pinealectomizados (Figuras 22, 23, 24 e 25).

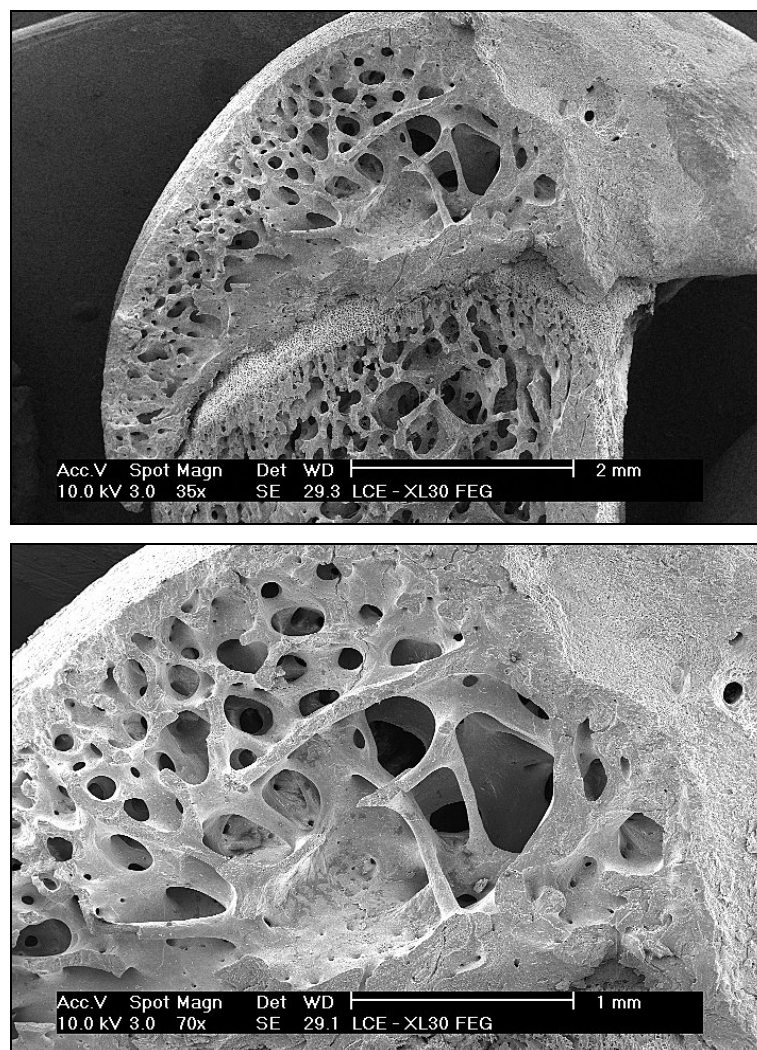


Figura 22: Micrografias do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e castrados tratados com salina

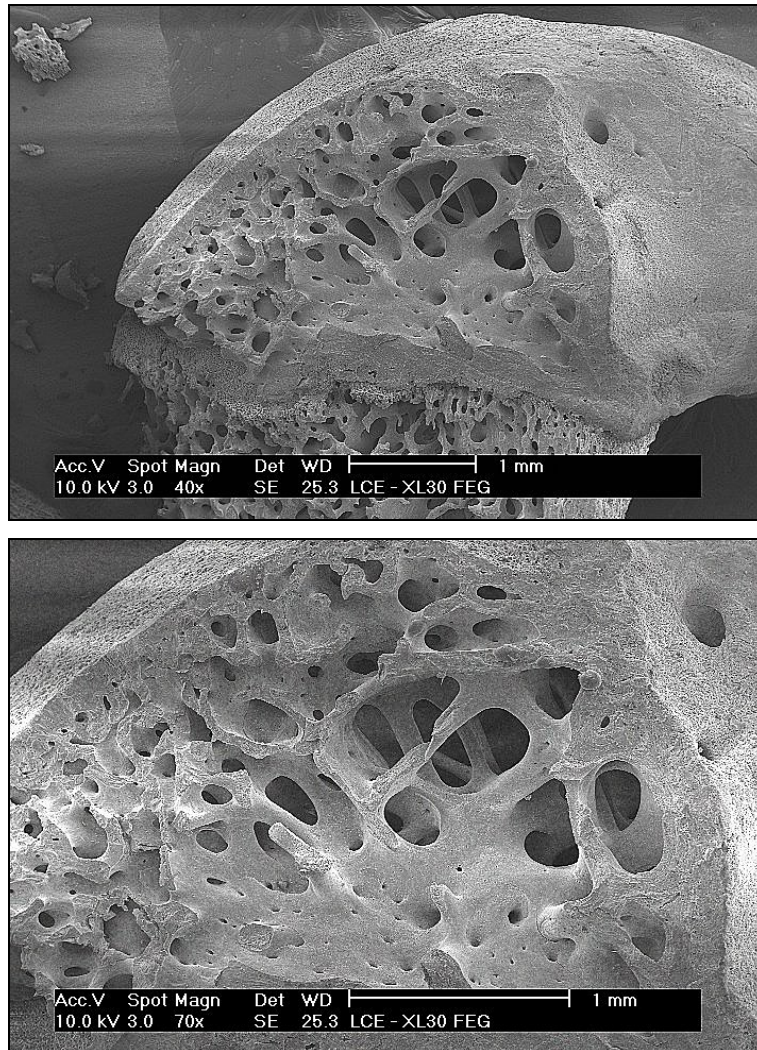


Figura 23: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e castrados tratados com salina

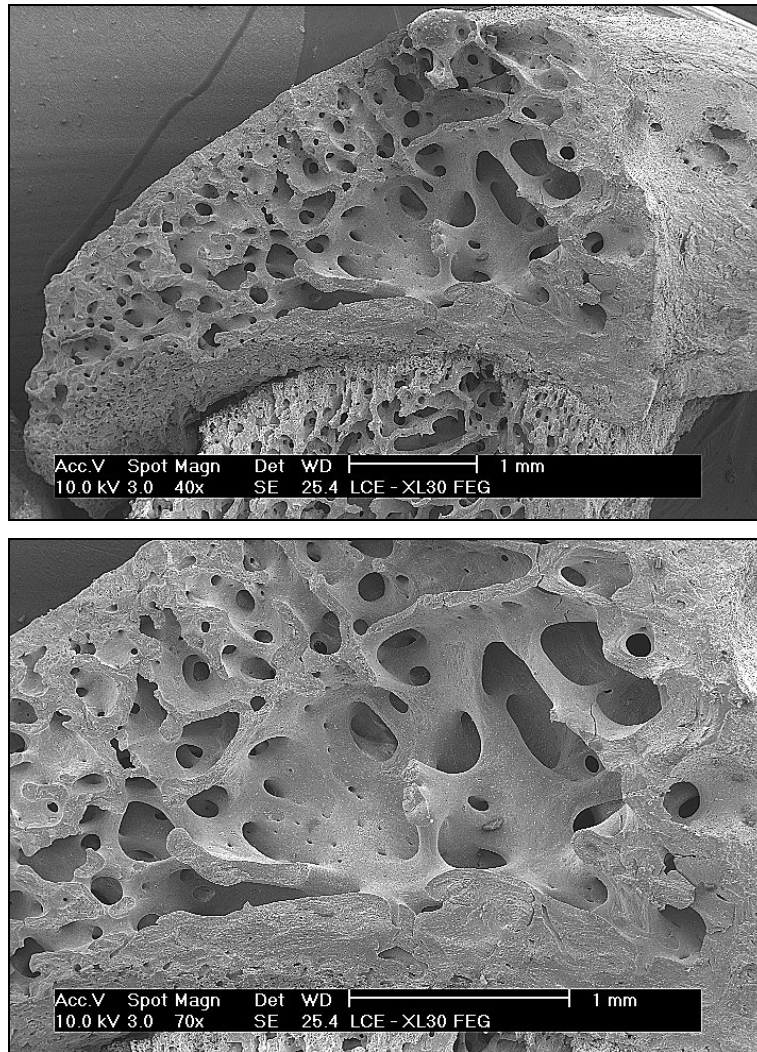


Figura 24: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e castrados tratados com melatonina

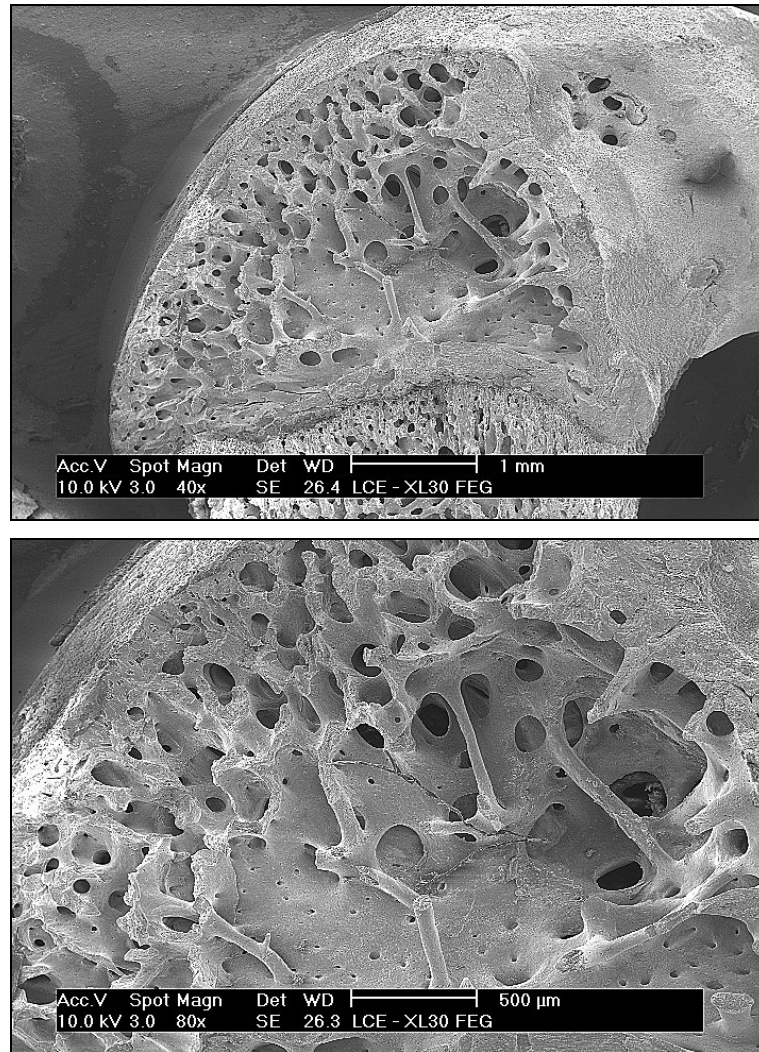


Figura 25: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e castrados tratados com melatonina

Quando se analisa as trabéculas dos fêmures dos animais pinealectomizados mas não orquiectomizados, encontram-se menores escavações e trabéculas não tão finas, em uma observação qualitativa. Mas ao comparar com a rede trabecular dos cêndilos dos animais dos grupos Basal e Sham, nota-se o efeito da pinealectomia provocando formação de trabéculas menores (Figuras 26 e 27).

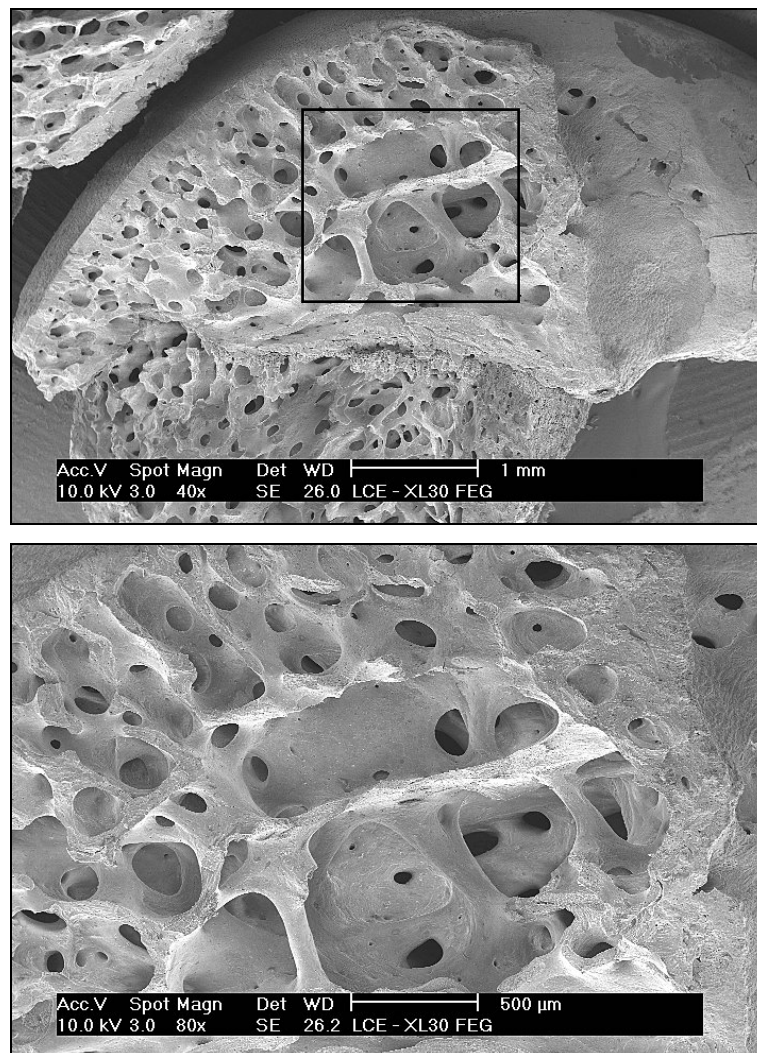


Figura 26: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e intactos. Notar que há, ainda que menos, espaçamento entre as trabéculas (quadrado).

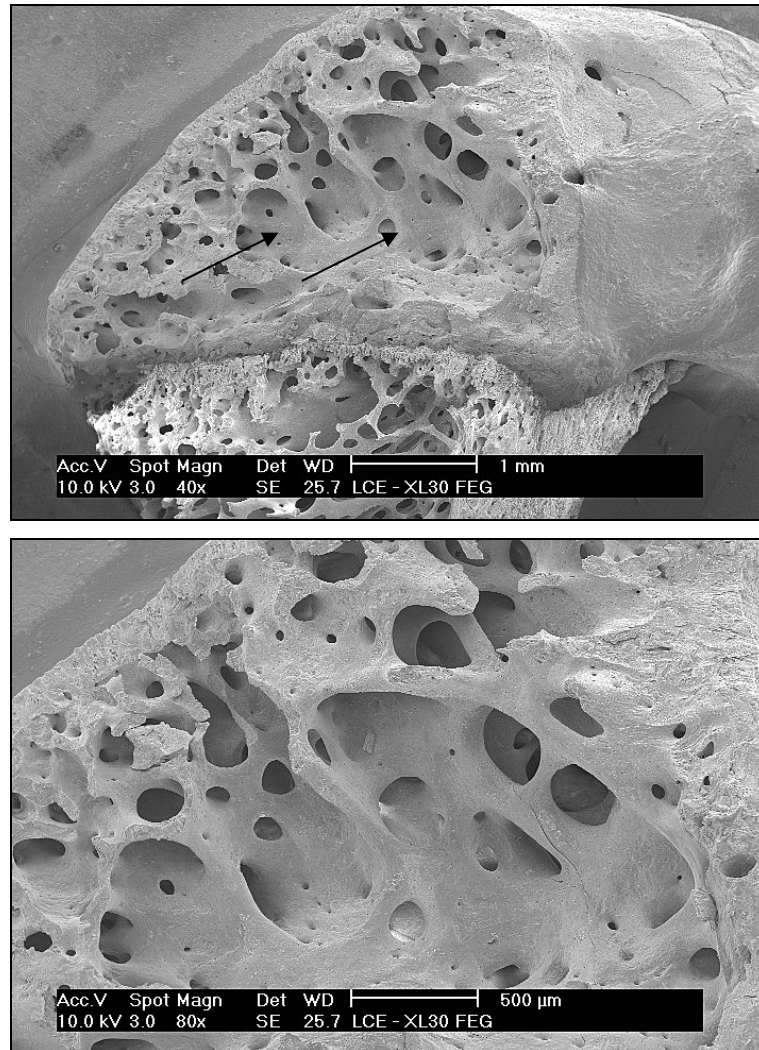


Figura 27: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e intactos.
Notar que ainda existem alguns platôs (setas).

Seguindo a análise dos côndilos dos animais pinealectomizados e não orquiectomizados, agora tratados ou com salina ou com melatonina, observa-se melhores interconectividades entre as trabéculas dos ossos deste último grupo. O grupo pinealectomizado, intacto, tratado com melatonina apresentou tendência a larguras maiores das trabéculas (Figuras 28, 29, 30 e 31).

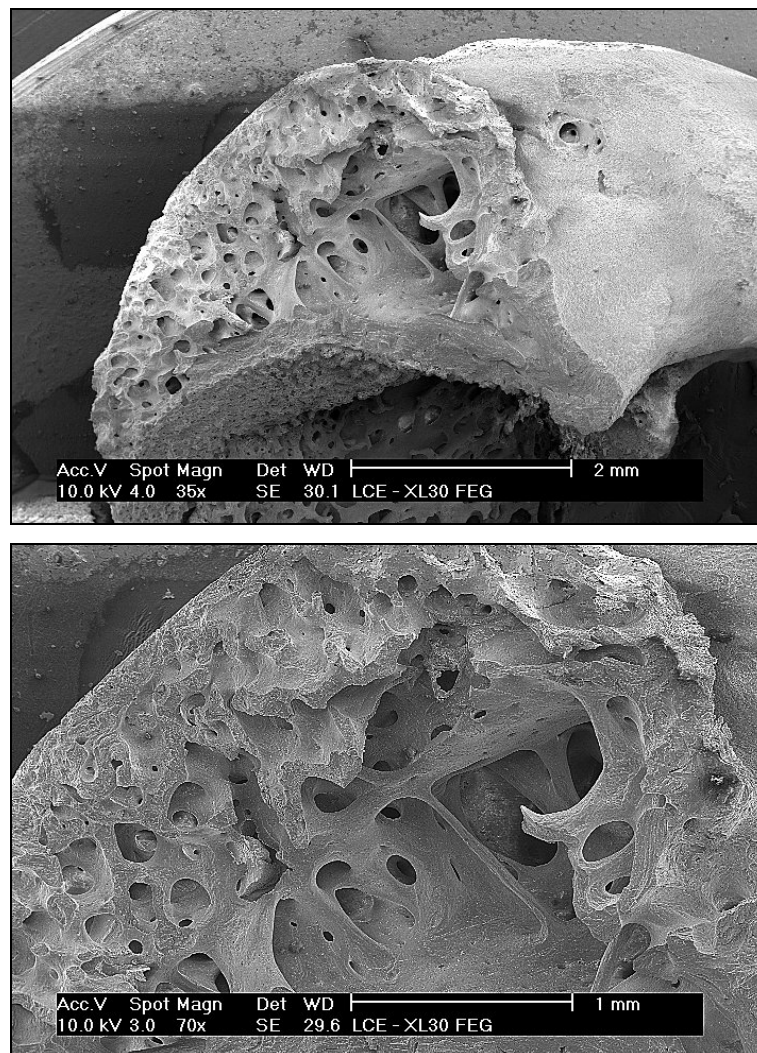


Figura 28: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e intactos tratados com salina

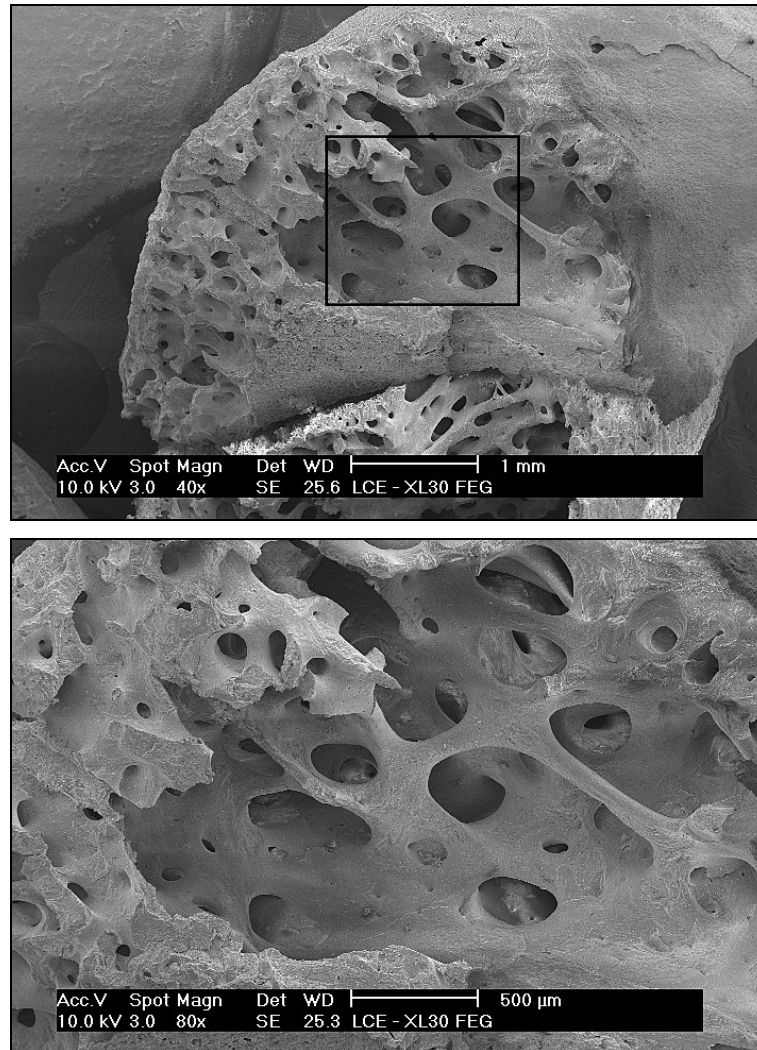


Figura 29: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e intactos tratados com salina. Notar o espaço não preenchido por trabéculas (quadrado).

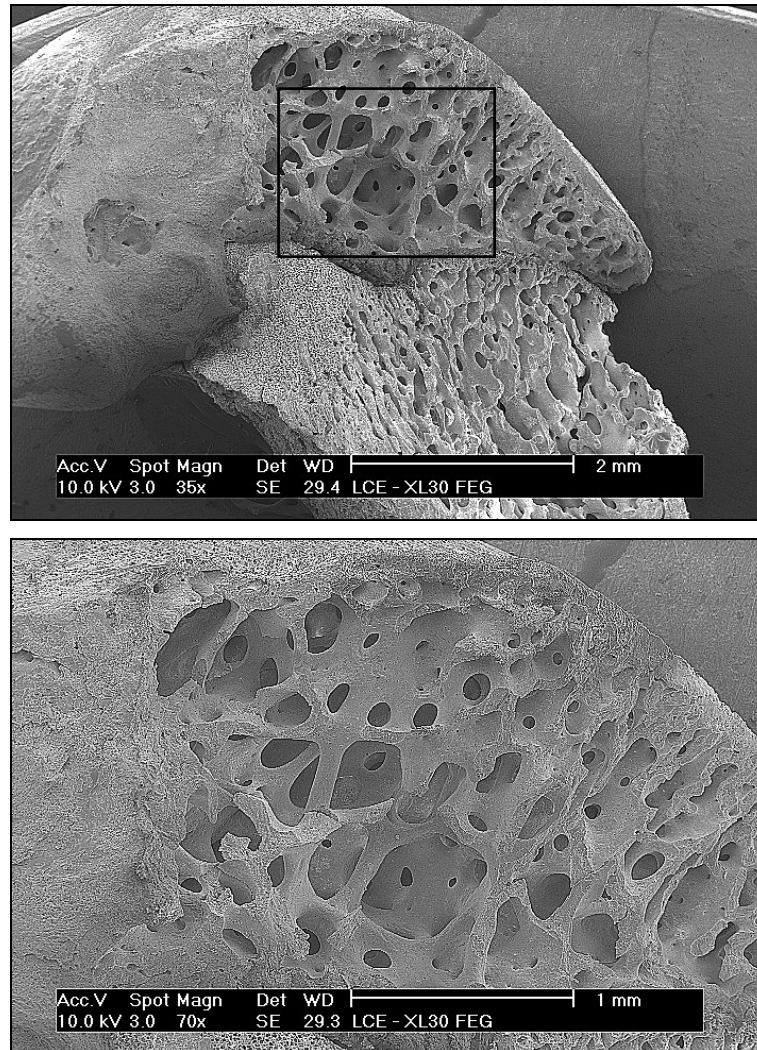


Figura 30: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e intactos tratados com melatonina. Notar que as regiões intertrabeculares estão menores.

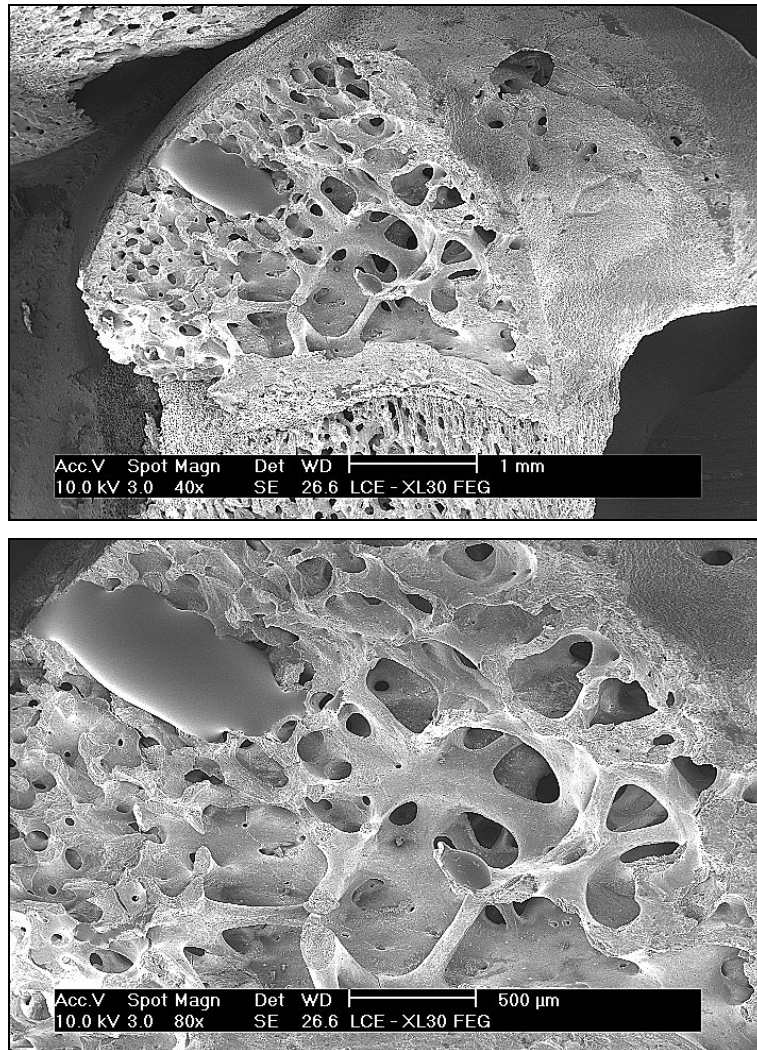


Figura 31: Micrografia do fêmur de rato do grupo de animais pinealectomizados e intactos tratados com melatonina

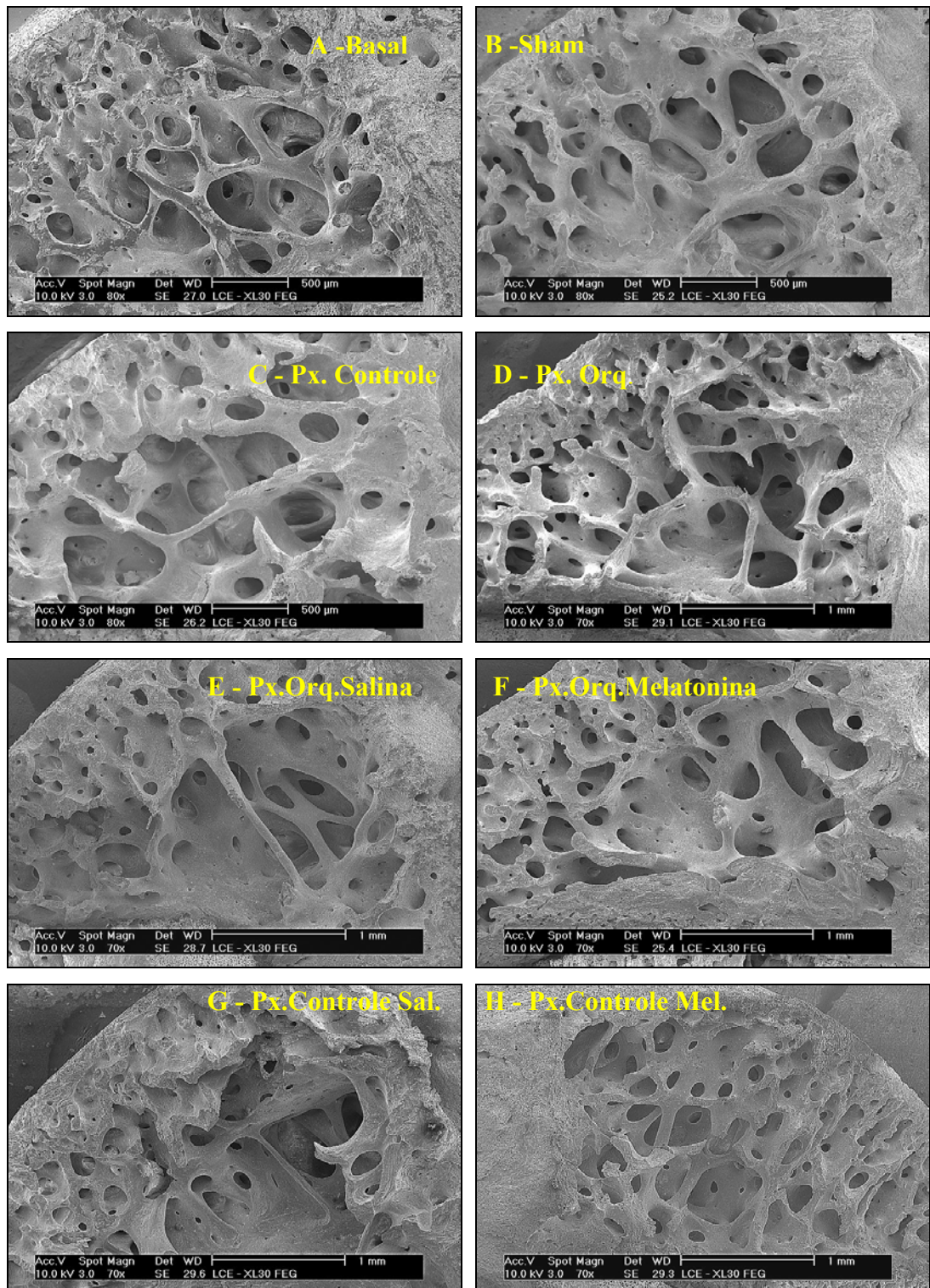


Figura 32: Micrografias dos fêmures dos ratos dos diferentes grupos experimentais

A partir da Figura 32, é possível notar os diferentes arranjos trabeculares ocorridos em função dos diferentes grupos experimentais. É evidente que os grupos Basal e Sham apresentaram melhores platôs, com trabéculas mais espessas e sem escavações (Fotos A e B). Já a pinealectomia, isoladamente (Foto C), indica maior espaçamento entre as trabéculas, que fica mais evidenciado quando é associada à orquiectomia (Foto D).

Os tratamentos dos animais pinealectomizados e castrados, com salina ou melatonina, não foram suficientes para corrigir o arranjo trabecular, mas observa-se que o osso do animal tratado com melatonina apresentou mais trabéculas do que o que recebeu salina (Fotos E e F). Para os animais não castrados, mas pinealectomizados, a reposição hormonal demonstrou efeitos melhores na quantidade e interconectividade entre as trabéculas (Fotos G e H).

5 DISCUSSÃO

5.1 Massa Corporal

Alguns pesquisadores verificaram que a orquiectomia promove menor ganho de massa corporal de ratos adultos quando comparados a grupos intactos, diferentemente do que ocorreria com ratas (HODGKINSON, 1979; DANIELSEN, MOSEKILDE e ANDREASSEN, 1992; VANDERSCHUEREN et al., 1992; PENG et al., 1994; MONTEAGUDO et al., 1997). Em relação ao efeito da pinealectomia sobre o peso corporal, ALONSO et al. (1978) não verificaram diferenças em ratos com 25 dias de idade. No entanto, após reposição hormonal com alta dose de melatonina (800 µg/kg), houve diminuição do peso corporal quando comparado ao respectivo grupo controle. Este resultado indica que o tratamento com melatonina ou a reposição hormonal, em caso de pinealectomia, promove ganho de peso menor em relação a animais controles. Isso também foi constatado por outros autores (DEBELJUK, FEDER e PAULUCCI, 1970; BERTONCELLO, 2001; PRUNET-MARCASSUS et al., 2003; LADIZESKI et al., 2003).

No presente trabalho, houve diferenças de ganho de massa corporal entre os grupos de animais pinealectomizados e Sham, quando os ratos sem a glândula pineal apresentaram peso corporal final mais elevado do que os com operação fictícia. No entanto, a pinealectomia associada à orquiectomia não alterou o ganho de peso corporal dos animais. Quando se realizou a reposição hormonal de melatonina, para os animais orquiectomizados ou não, verificou-se menor ganho de peso corporal dos animais comparados aos respectivos grupos controles. Verifica-se, assim, a ação da melatonina sobre o controle do peso corporal, independentemente de haver ou não orquiectomia. A pinealectomia promoveu maior ganho de massa corporal em relação ao grupo Sham. A pinealectomia associada à orquiectomia reverteu este efeito, não diferindo, portanto, do grupo sham

Em trabalho realizado por WOLDEN-HANSON et al. (2000), verificou-se que o tratamento com melatonina durante 12 semanas em ratos não diminuiu o consumo de alimento, porém, houve diminuição do ganho de peso corporal, adiposidade intraabdominal, insulina plasmática e leptina plasmática, comparado ao grupo controle. Em um trabalho realizado anteriormente (1999) por RASMUSSEN et al. também foi observado o mesmo resultado. O provável papel da melatonina sobre o controle do peso corporal, segundo estes autores, seria devido à diminuição da temperatura interna com conseqüente aumento do metabolismo. Também verificaram que o tratamento com melatonina aumenta a sensibilidade à leptina, um fator contribuinte para a diminuição do peso corporal, já que a leptina diminui a ingestão alimentar. BAYDAS et al. (2001) verificaram que a melatonina provoca diminuição da liberação de leptina em ratos. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para verificar a participação direta ou indireta da melatonina sobre o metabolismo corporal, bem como sua relação com os níveis plasmáticos de leptina.

Quanto às diferenças que ocorreram entre os grupos de animais pinealectomizados e castrados tratados ou com salina ou com melatonina e cada qual comparado ao grupo de animais pinealectomizados e castrados, sem reposição hormonal, podem ser devidas ao estresse imposto pelo tratamento diário bem como pelo menor peso corporal inicial dos ratos deste último grupo.

A reposição hormonal mostrou-se eficaz no controle do peso corporal, tanto para ratos castrados quanto para ratos intactos, cada qual comparado ao seu respectivo grupo controle. Este resultado vem ao encontro do que havíamos verificado em estudos anteriores (BERTONCELLO, 2001). No entanto, nesse trabalho foram analisados ratos não pinealectomizados. Assim, sugere-se que a melatonina, em dose farmacológica para atuação como reposição hormonal, agiria diretamente sobre os tecidos corporais para controle metabólico, o que reflete conseqüentemente sua ação sobre o controle do peso corporal.

5.2 Análise do fêmur direito

A partir dos dados obtidos neste estudo, quanto ao comprimento do fêmur, verificou-se maiores valores para todos os grupos experimentais quando comparados aos animais do grupo Basal. Entre os demais grupos, observou-se que não houve diferenças significativas. O resultado acompanha os obtidos anteriormente em nosso laboratório, quando o tratamento com melatonina não foi suficiente para alterar esse parâmetro (BERTONCELLO, 2001), o que difere das fêmeas, conforme KALU (1991). Segundo este autor, os valores de massa óssea devem ser considerados válidos quando são menores nas ratas ovariectomizadas em relação ao grupo Basal, sendo este grupo necessário para se comparar a curva de crescimento, peso, densidade e conteúdo de cálcio ósseo nas ratas de 1 a 3 meses e a partir desta idade. Entretanto, nossos resultados estão de acordo com GUNNESS e ORWOLL (1995), que também obtiveram resultados semelhantes com até 4 semanas de orquiectomia. Não são encontrados, na literatura, trabalhos avaliando o comprimento do fêmur em animais pinealectomizados. Assim, nossos resultados são os primeiros a identificar esse parâmetro.

Ainda em se tratando de parâmetros biométricos, verificou-se que somente houve diferenças significativas para espessura total sagital (sentido ântero-posterior) entre os grupos pinealectomizados e castrados ou não castrados em relação aos grupos Sham e Basal. Sabe-se, através de alguns trabalhos já realizados, que a orquiectomia pode provocar diminuição das espessuras ósseas (DANIELSEN, MOSEKILDE e ANDREASSEN, 1992; GUNNES e ORWOLL, 1995). O fato de haver maior espessura

da diáfise femoral para os ratos pinealectomizados e orquiectomizados pode ser um indicativo da ação da ausência de melatonina sobre esta estrutura, o que indica efeito dessas cirurgias também sobre o osso cortical. No entanto, é necessário um estudo mais aprofundado sobre a diferente ação deste hormônio sobre osso trabecular e cortical. Vale ressaltar que foi considerada a espessura total do osso, sem divisão por porções laterais/mediais ou frontais/posteriores, de maneira semelhante como DANIELSEN, MOSEKILDE e ANDREASSEN (1992) mediram na região epifisária do fêmur. Dos nossos resultados, surge uma questão: o aumento dessa espessura seria um indicativo de ação direta da melatonina sobre o osso cortical?

O volume ósseo variou estatisticamente entre o grupo de animais basais e cada um dos demais grupos experimentais, tendo maiores valores para estes últimos, o que está de acordo com a literatura (GUNNESS e ORWOLL, 1995). Este fato é diretamente relacionado ao crescimento do animal visto que o grupo Basal era composto de animais com 4 meses de idade e serve como referência inicial para qualquer parâmetro de análise. Os animais componentes dos outros grupos, durante a análise, já estavam com a idade de 6 meses. Não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais, quando comparado cada qual com seu controle. A não alteração do volume ósseo pode ter sido compensada pela variação de um outro parâmetro físico, como o peso do osso, ou, ainda, por algum parâmetro mecânico que indique maior capacidade de armazenamento de carga por parte das lamelas ósseas.

A densidade mineral óssea, calculada em função do volume e do peso do material mineral ósseo, diminuiu para os animais pinealectomizados não orquiectomizados e que receberam ou salina ou melatonina, em comparação aos animais pinealectomizados não castrados sem tratamento. A diferença de peso corporal inicial dos animais, mesmo não significativa, pode ter direcionado este resultado. Em virtude da não variação do volume ósseo, para a maioria dos grupos, a densidade mineral está relacionada à diminuição do peso do material mineral ósseo. Notou-se que o tratamento com salina promoveu menor densidade óssea aos animais, quando comparados aos que receberam reposição hormonal de melatonina, para os grupos pinealectomizados não castrados. De acordo com trabalhos encontrados na literatura (ROSEN et al., 1995), nossos resultados indicam tendência a menores valores de densidade óssea para os animais castrados em relação aos intactos. A melatonina contribuiu também para

promover maior densidade mineral em animais não castrados. Este fato denota que a orquiectomia ainda é uma via determinante para efetiva perda de massa óssea, o que não ocorreria em tamanha intensidade somente com a pinealectomia dos animais.

A pinealectomia também não provocou alteração da força máxima suportada pelo fêmur durante o teste de flexão a três pontos, independente do grupo ter recebido ou não a reposição hormonal. No entanto, ainda que não significativamente, a pinealectomia associada à orquiectomia promoveu menores valores de força máxima do fêmur. A orquiectomia provocando menor ganho de força máxima está de acordo com dados descritos na literatura (HODGKINSON, 1979; DANIELSEN, MOSEKILDE e ANDREASSEN, 1992; PENG et al., 1994). A redução das concentrações plasmáticas dos hormônios esteróides em ratos, provocada pela castração, gera uma diminuição da massa óssea levando à osteopenia do osso cortical. O que poderia ter ocorrido aos animais pinealecomizados e orquiectomizados, deste estudo, seria uma reorganização das lamelas ósseas, o que foi prevenida pela reposição com melatonina. Segundo EINHORN (1996), a capacidade do osso em resistir a fraturas não depende somente da massa óssea e das propriedades materiais, mas também da geometria e da arquitetura óssea.

O fato do tratamento com melatonina para os ratos pinealectomizados, mas não castrados, indicar maior força no teste de flexão, comparado ao grupo de animais tratados com salina, corrobora os resultados anteriores no que diz respeito a afirmar que a melatonina, administrada para reposição hormonal, é eficaz na proteção à espoliação óssea.

O momento máximo de força para provocar fratura foi proporcional à carga máxima. Apesar dos resultados não significativos, a pinealectomia provocou diminuição do momento máximo de força, resultado mais acentuado quando houve a dupla cirurgia (pinealectomia associada à orquiectomia). Esta diminuição deveu-se à menor carga, visto que o comprimento do fêmur não diferiu entre os grupos experimentais. O braço de alavanca do osso não interferiu no momento máximo de força, pois os valores obtidos para este parâmetro não levaram em consideração o comprimento do fêmur, e sim a distância dos apoios onde o osso foi mantido durante o teste. A reposição hormonal com melatonina atenuou a diminuição do momento máximo de força óssea,

para os animais não orquiectomizados, comparados aos que receberam tratamento com salina.

Em relação à qualidade óssea, proposta por SØGAARD et al. (1997), verificou-se uma tendência à maior força máxima normalizada para o grupo de animais pinealectomizados não castrados e que receberam reposição hormonal, em relação a todos os outros. Este resultado indica uma possibilidade da melatonina em proteger o tecido ósseo, seguindo a tendência já apresentada pela força máxima.

Quanto à deformação óssea apresentada pelos ossos durante o teste de flexão, tanto o grupo Sham quanto o grupo de ratos pinealectomizados não castrados (Px.Controle) foram os que apresentaram maiores valores. Nestes animais, fica evidente que a fase elástica do tecido predomina durante o teste de imposição da carga, o que não ocorre com os grupos em que foram realizadas as cirurgias e eles atingem rapidamente a fase plástica promovendo as modificações estruturais no osso.

A rigidez, variável calculada durante a fase elástica do osso, relacionando a força pela deformação, mostrou-se aumentada para os animais que receberam melatonina, castrados ou não, comparados aos seus grupos controles, mostrando novamente ação desse hormônio na prevenção de eventual fraqueza óssea.

Quando se analisa cada parâmetro isoladamente e em conjunto, pode-se verificar que a melatonina parece exercer um papel importante na constituição do tecido ósseo que permanece após perda óssea, ou seja, mesmo com volume e peso reduzido, a força suportada é maior, o que reflete em maior rigidez e qualidade óssea. A hipótese é de que a melatonina teria um efeito restaurador sobre as lamelas e/ou trabéculas ósseas que permanecem no tecido e não primariamente e intensamente na formação de tecido ósseo a partir das células osteogênitoras.

5.3 Análise do fêmur esquerdo

A densitometria tem se constituído em um importante método de análise do tecido ósseo quando se deseja comparar a massa distribuída por uma área total ou parcial do osso. Assim, é possível analisar a estrutura óssea tanto animais pós sacrifício

quando *in vivo*, o que viabiliza e muito o diagnóstico e acompanhamento da evolução de osteoporose e/ou osteopenia em humanos.

A densidade mineral óssea, verificada em relação à área total do osso, foi menor quando se realizou a pinealectomia e a orquiectomia nos animais. A reposição hormonal preveniu o efeito deletério sobre a estrutura óssea. Estes resultados indicam ação da melatonina sobre o osso trabecular e, provavelmente, também sobre o osso cortical.

A densitometria do fêmur esquerdo não acompanhou de forma linear o mesmo resultado da densidade mineral óssea analisado no fêmur direito a partir do princípio de Arquimedes. Provavelmente, deve-se ao fato das medições levarem em consideração o volume ósseo e não a área do osso, como é o caso da densitometria. E, como avaliado anteriormente, o volume ósseo mostrou-se sem alterações significativas entre os grupos. Através da densitometria, portanto, verifica-se que a reposição hormonal com melatonina pode exercer um papel protetor sobre o tecido ósseo, em animais pinealectomizados, sejam castrados ou não.

Há trabalhos indicando uso de densitometria para avaliar a constituição óssea em animais castrados. MOREAU et al. (2001) analisaram ossos de ratos orquiectomizados e verificaram menor conteúdo mineral a partir de 8 semanas da cirurgia. Em estudo mais recente, LEROUXEL et al. (2004), analisaram a mandíbula de ratos orquiectomizados. Com um desenho experimental parecido ao trabalho anterior, eles verificaram perda de tecido ósseo a partir de 16 semanas de orquiectomia, através de análise de densitometria.

DA PAZ et al. (2001) analisaram o tecido ósseo de ratas ovariectomizadas, tratadas com estradiol ou alendronato, a partir de densitometria. No final do experimento, verificaram que a densidade mineral óssea na região distal do fêmur foi menor para os animais ovariectomizados comparados aos controles. Houve ainda valores maiores de densidade mineral para ossos de ratas tratadas com alendronato. Estes estudos indicam a densitometria como um método capaz de mensurar a integridade do tecido ósseo. No entanto, não se verifica na literatura trabalhos analisando o tecido ósseo, através de densitometria, para animais pinealectomizados ou tratados com melatonina.

Nosso trabalho, pela primeira vez, utiliza a densitometria óssea para analisar o fêmur de ratos orquiectomizados e pinealectomizados. Quando se verifica que o grupo

Sham apresentou maior valor de densidade mineral óssea, sugere-se que a pinealectomia também poderia ser uma cirurgia realizada em animais para estudos sobre o conteúdo mineral do tecido ósseo. É evidente que mais estudos devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

Os resultados quantitativos obtidos, sejam com o fêmur direito ou com o fêmur esquerdo, foram corroborados pela análise qualitativa dos cêndilos a partir da microscopia eletrônica de varredura. Verificou-se que a pinealectomia provocou diminuição do volume tecidual ósseo na porção média dos cêndilos, com maiores espaçamentos entre as trabéculas e diminuição dos platôs trabeculares, resultados que foram mais acentuados quando se associou a retirada da glândula pineal à orquiectomia. Isso vem ao encontro do que já havíamos encontrado em trabalho anterior, mas somente analisando o efeito da castração (BERTONCELLO, 2001). O efeito da pinealectomia também pode ser comparado e verificado sua proximidade com os resultados encontrados após castração em ratas, conforme trabalhos de THOMPSON (1995) e CANOTILHO (1996).

Não houve evidente melhora da arquitetura óssea com o tratamento com salina ou melatonina para os animais pinealectomizados e castrados, o que indica a dupla cirurgia como um mecanismo de promover a osteopenia em ratos. A concentração de melatonina utilizada não foi eficiente para evitar os efeitos deletérios da dupla cirurgia. No entanto, essa mesma concentração aparentemente mostrou-se eficaz como reposição hormonal quando aplicada aos animais pinealectomizados mas não castrados.

BAGI e MILLER (1994), em estudo com animais após 12 semanas de ovariectomia, encontraram diminuição da conectividade trabecular e aumento dos volumes medulares, indicando maior separação entre as trabéculas. Não são encontrados muitos trabalho com análise microscópica da porção distal da epífise óssea, o que foi realizado aqui. Também, nosso trabalho é o primeiro a avaliar a arquitetura trabecular de ossos de ratos pinealectomizados e orquiectomizados, através de microscopia eletrônica de varredura. Algumas imagens não seguiram o padrão pré-determinado, possivelmente pelo fato do feixe de elétrons do microscópio eletrônico nem sempre ter o mesmo comprimento. Vale ressaltar também que a metodologia aqui empregada para preparação do material foi adaptada de trabalho anterior e associada a metodologia empregada para análise de material orgânico.

Os parâmetros analisados neste trabalho indicam um efeito deletério da castração sobre o tecido ósseo. É possível verificar ainda que existe uma acentuação desse efeito caso a orquiectomia esteja associada à cirurgia de retirada da glândula pineal. Uma via de ação da melatonina sobre o tecido ósseo pode ser considerada no sentido de agir na remoção de metabólitos, como o peroxinitrito proveniente da metabolização do óxido nítrico, que atua aumentando a geração de osteoclastos quando em baixas concentrações (RALSTON et al., 1995; GILAD et al., 1997).

Ainda, pode-se postular que a glândula pineal tenha ação relacionada com a liberação de hormônios esteróides gonadais (REITER et al., 1978). LADIZESKI et al. (2003) verificaram que a melatonina acentuou a eficácia do estradiol em conter a reabsorção óssea provocada pela ovariectomia em ratas, quando administrados os dois hormônios. KUS et al. (2000) verificaram que a pinealectomia causou hiperatividade nas células Leydig. Sugeriram, então, que possa existir relação entre a glândula pineal e testículo de ratos, o que já havia sido sugerido por EDMONDS e STETSON (1995).

Estudos realizados *in vitro* verificaram efeito direto da melatonina sobre células ósseas, estimulando inclusive a formação de osteoblastos (ROTH et al., 1999; NAKADE et al., 1999, KOYAMA et al., 2002). Através de estudos com marcadores ósseos, OSTROWSKA et al. (2002), indicaram que a pinealectomia induz e a administração de melatonina exógena suprime os níveis de marcadores do metabolismo ósseo (fosfatase alcalina, pró-colágeno tipo I), principalmente em ratas ovariectomizadas.

LIMA et al. (2003) analisaram a formação de células C em glândula tireóide de ratos após pinealectomia. Sabe-se que estas células sintetizam calcitonina, que atua sobre a formação óssea. Eles encontraram maior número destas células em ratos após retirada da glândula pineal. Este efeito relaciona a glândula ao controle do metabolismo do cálcio e, conseqüentemente, ao tecido ósseo. Há receptores para calcitonina nos osteoclastos que, por ativação parácrina aos osteoblastos, ativam a deposição de cálcio na matriz óssea. Poderia a ausência de melatonina ativar os osteoclastos, via maior liberação de calcitonina, sem que houvesse a ativação parácrina. Um estudo *in vitro*, relacionando os dois hormônios seria ideal para confirmar ou não esta hipótese.

Em um artigo de revisão, VANECEK (1998) apresenta a melatonina exercendo papel importante em diferentes tecidos corporais. No entanto, ainda há escassez de trabalhos indicando o mecanismo de ação da melatonina sobre o tecido ósseo, direta ou indiretamente. Verifica-se que existe sim relação entre a glândula pineal e o tecido ósseo, o que pode ser analisado através da pinealectomia ou da administração exógena do hormônio em animais experimentais. CARDINALI et al. (2003) afirmam que a melatonina poderia impedir o desenvolvimento da osteopenia que ocorre com o envelhecimento em humanos pelo fato de melhorar o sono REM e restaurar a secreção de GH, o que indica uma nova terapêutica para aumentar a massa óssea em doenças relacionadas à perda de material mineral.

Diante do que se encontra na literatura e dos resultados obtidos neste trabalho, poderia-se supor que a melatonina atuaria como um suplemento a ser administrado em pessoas idosas como terapêutica para prevenção de osteopenia? É evidente que os estudos caminham no sentido de correlacionar todos os resultados encontrados a fim de verificar se o hormônio pode ser considerado de fato protetor ao tecido ósseo humano. Para tanto, mais trabalhos devem ser realizados a fim de corroborar as evidências positivas encontradas até agora, inclusive analisando populações de pessoas idosas com quadro de desenvolvimento de osteopenia.

6 CONCLUSÕES

A pinealectomia parece acentuar os efeitos osteopênicos da orquiectomia em ratos. Também, tem ação importante no controle de peso dos animais e não promove menor ganho de peso devido à deficiência de melatonina.

O tratamento de reposição hormonal de melatonina na dose de 200 µg/kg PC em ratos é suficiente para proteger o tecido ósseo contra a fraqueza estrutural que ocorre devido à espoliação após a orquiectomia.

O tratamento com melatonina, como reposição hormonal aos animais pinealectomizados, protege o tecido ósseo contra a fraqueza óssea.

O animal pinealectomizado pode ser considerado como modelo experimental associado ao orquiectomizado, para estudo sobre osteopenia em ratos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WANIS, M.E., KAWAHARA, N. The role of neurofibromin and melatonin in pathogenesis of pseudarthrosis after spinal fusion for neurofibromatous scoliosis. **Med. Hypoth.**, v.58(5), p.395-398, 2002.

ABDEL-WANIS, M.E., KAWAHARA, N. Skeletal disorders associated with skin pigmentatin: a role of melatonin? **Med.Hypoth.**, v.61(5-6), p.640-642, 2003.

ALONSO, R., PRIETO, L., HERNANDEZ, C., MAS, M. Antiandrogenic Effects of the Pineal Gland and Melatnin in Castrated and Intact Prepuberal Male **Rats.J.Edocr.**, v.79, p.77-83, 1978.

ARUTYUNYAN, G.S., MASHKOUSKII, M.D., ROSCHCHINA, L.F. Pharmacological properties of melatonin. **Fed.Proc., Fed.Am.Soc.Exp.Biol.**, v.23, p.T1330-1332, 1963.

ATTIE, 1991 Bisphosphanate therapy for osteoporosis. In **Hosp.Pract.**, p.88,1991.

AZRIA, M. **Las Calcitoninas – Fisiología y Farmacología**. España: Ediciones Mayo, 154p, 1989.

BAGI, C.M., MILLER, S.C. Comparison of osteopenic, changes in cancellous bone induced by ovariectomy and/or immobilization in adult rats. **Anat.Rec.**, v.239, p.243-254, 1994.

BARASSIN, S., SABOUREAU, M., KALSBECK, A., BOTHOREL, B., VIVIEN-ROELS, B., MALAN, A., BUIJS, R.M., GUARDIOLA-LEMAITRE, B., PÉVET, P. Interindividual differences in the pattern of melatonin secretion of the Wistar rat. **J.Pineal Res.**, v.27, p.193-201, 1999.

BAYDAS, G., GURSU, F., CANPOLAT, S., KONAR, V., YASAR, A., CANATAN, H., KELESTIMUR, H. Effects of pinealectomy on the circadian release pattern of leptin in male rat. **Neuroend.Lett**, v.22(6), p.449-452, 2001.

BERTONCELLO, D. **Efeitos do tratamento com melatonina sobre o tecido ósseo de ratos castrados**. Dissertação de mestrado em Ciências Fisiológicas – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos SP, 2001.

CANOTILHO, M.M. **Osteoporose Experimental em Ratas: efeitos da administração crônica de ácido acetilsalicílico**. Dissertação de mestrado DCF- UFSCar, 1996.

CARDINALI, D.P., LADIZESKY, M.G., BOGGIO, V., CUTRERA, R.A., MAUTALEN, C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. **J.Pineal Res.**, v.34(2), p.81-87, 2003.

CASTRO, A.C.S., QUEIROZ, G.F., NOGUEIRA, J.C., COIMBRA, C.C., REIS, A.M., MARUBAYASHI, U., YAMASAKI, K. Effect of pinealectomy, adrenalectomy, pinealectomy plus adrenalectomy upon the quantification of spermatogenic cells of adult rats **Arq.Bras.Med.Vet.Zootec.**, v.54, n.3, 2002.

CASTROVIEJO, D.A, ROSENSTEIN, R.E., ROMEO, H.E., CARDINALI, D.P. Changes in Gama-Aminobutyric Acid High Affinity Binding to Cerebral Cortex Membranes after Pinealectomy or Melatonin Administration to Rats. **Neuroendocrinology**, v.43, p.24-31, 1986.

CHRISTIANSEN, C. The different routes of administration and the effect of hormone replacement therapy on osteoporosis. **Fert.Steril.**, v.62, S.2, n.6, p.S152-S156, 1994.

CIPOLLA-NETO, J., AFECHÉ, S.C. Glândula pineal: fisiologia celular e função. In: WAJCHENBERG, B. **Trat.Endocrin.Clin.**, São Paulo: Roca, p.83-93, 1992.

CLARK, J.M. Variation of collagen fiber alignment in a joint surface: a scanning electron microscope study of tibial plateau in dog, rabbit and man. **J.Orthop.Res.**, v.9, p.246-257, 1991.

CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis, **Am.J.Med.**, 1993.

CRAMER, H., RUDOLPH, J., CONSRUCH, U., KENDEL, K. On the effects of melatonin on sleep and behavior in man. **Adv.Biochem.Psychopharmacol.**, v.11, p.187-191, 1974.

DA PAZ, L.H.B.C., DE FALCO, V., TENG, N.C., REIS, L.M., PEREIRA, R.M.R., JORGETTI, V. Effect of 17 β -estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. **Braz.J.Med.Biol.Res**, v.34(8), p.1015-1022, August 2001.

DANIELSEN, C.C., MOSEKILDE, L., ANDREASSEN, T.T. Long-Term Effect of orchidectomy on Cortical Bone from Rat Femur: Bone Mass and Mechanical Properties. **Calcif.Tissue Int.**, v.50, p.169-174, 1992.

DEBELJUK, L., FEDER, V.M., PAULUCCI, O.A. Effects of Melatonin on Changes Induced by Castration and Testosterone in Sexual Structures of Male Rats. **Endocrinology**, v.87, p.1358-1360, 1970.

DELMAS, P.D., MALAVAL, L. The Proteins of Bone. In: MUNDY, G.R. & MARTIN, T.J. **Phys.Pharmac.Bone**, Berlin: Springer-Verlag, 1993.

DEMPSTER, D.W., LINDSAY, R. Pathogenesis of Osteoporosis. **The Lancet**, v.341, p.797-801, 1993.

DUAN, Y., DE LUCA, V., SEEMAN, E. Parathyroid Hormone Deficiency and Excess: Similar Effects on Trabecular Bone But Differing Effects on Cortical Bone, **J.Clin.Endocrin.Metabolism**, v.84, n.2, p. 718-722, 1999.

DUBOCOVICH, M.L. Pharmacology and function of melatonin receptors. **FASEB J.** v.2, p.2765-2773, 1988.

DUPAS, M.A. **Pesquisando e Normalizando** – Noções Básicas e Recomendações Úteis para a Elaboração de Trabalhos Científicos. São Carlos SP: EDUFSCar, 2004.

EBADI, M. Multiple pineal receptors in regulating melatonin synthesis. In: YU, H.-S., REITER, R.J. **MELATONIN – Biosynthesis, Physiological Effects, and Clinical Applications**. Boca Raton – Flórida: CRC Press, p.39-71, 1993.

EDMONDS, K.E., STETSON, M.H. Pineal gland and melatonin affect testicular status in the adult marsh rice rat (*Oryzomys palustris*). **Gen.Comp.Endocrin.**, v. 99(3), p.265-274, 1995.

EINHORN, T.A. The Bone Organ System: Form and Function. In: MARCUS, R., FELDMAN, D., KELSEY, J. **Osteoporosis**, San Diego: Academic Press, p.3-22, 1996.

ENGESAETER, L.B., EKELAND, A., LANGELAND, N. Methods for testing the mechanical properties of the rat femur. **Acta.Orthop.Scand.**, v.49, p.512-518, 1978.

ERIKSEN, E.F., BRIKEN, K., CHARLES, P. New markers of bone metabolism: clinical use in metabolic bone disease. **Europ.J.Endocrinology**, v.132, p.251-263, 1995.

ERSHLER, W.B., HARMAN, S.M., KELLER, E.T. Immunologic aspects of osteoporosis. **Develop.Comp.Immunology**, v.21, n.6, p.487-499, 1997.

FAGAN, A.B., KENNAWAY, D.J., SUTHERLAND, A.D. Total 24-hour melatonin secretion in adolescent idiopathic scoliosis. A case-control study. **Spine**, v. 23(1), p.41-46, 1998.

FROST, H.M., JEE, W.S.S. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. **Bone Min.**, v.18, p.227-236, 1992.

GARNERO, P., DELMAS, P.D. New Developments in Biochemical Markers for Osteoporosis. **Calcif.Tissue Int.**, v.59(Suppl 1): S2-S9, 1996.

GILAD, E., CUZZOCREA, S., ZINGARELLI, B., SALZMAN, A.L., SZABÓ, C. Melatonin is a scavenger of Peroxynitrite. **Life Sciences**, v.60, n.10, p.PL169-PL175, 1997.

GUNNESS, M., ORWOLL, E. Early Induction of Alterations in Cancellous and Cortical Bone Histology After Orchidectomy in Mature Rats. **J.Bone Min.Res.**, v.10, p.1735-1743, 1995.

HAKANSON, D.O., BERGSTROM, W.H. Pineal and Adrenal Effects on Calcium Homeostasis in the Rat. **Ped.Res.**, v.27, n.6, p.571-573, 1990.

HAKANSON, D.O., PENNY, R., BERGSTROM, W.H. Calcemic Responses to Photic and Pharmacologic Manipulation of Serum Melatonin. **Ped.Res.**, v.22, n.4, p.414-416, 1987.

HOCK, J.M., GERA, I., FONSECA, J., RAISZ, L.G. Human Parathyroid Hormone-(1-34) Increases Bone Mass in Ovariectomized and Orchidectomized Rats. **Endocrinology**, v.122, n.6, p.2899-2904, 1988.

HODGKINSON, A. Effects of Calcium Deprivation and Orchidectomy on Bone Composition in the Rat. **Horm.Metab.Res.**, v.11, p.516-519, 1979.

HOFFMAN, R., REITER, R.J. Rapid Pinealectomy in Hamsters and other Small Rodents. **Anat.Rec.**, v.153, p.19-22, 1965.

JOHNSTON, C.C., SLEMENDA, C.W. Pathogenesis of Osteoporosis. **Bone**, v.17, p.19-22, 1995.

KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Min.**, v.15, p.171-192, 1991.

KANIS, J.A. Estrogens, the menopause, and osteoporosis. **Bone**, 19(5): 185S-190S, 1998.

KOYAMA, H., NAKADE, O., TAKADA, Y., KAKU, T., LAU, K.H. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. **J.Bone Min.Res.**, v. 17(7), p.1219-1229, 2002.

KRAUSE, D.N., DUBOCOVICH, M.L. Melatonina Receptors. **Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.**, v.31, p.549-568, 1991.

KRUGER, M.C., HORROBIN, D.F. Calcium metabolism, osteoporosis and essential fatty acids: a review. **Prog.Lipid.Res.**, v.36, n.2/3, p.131-151, 1997.

KUS, I., SARSILMAZ, M., OGETÜRK, M., YILMAZ, B., KELESTIMUR, H., ONER, H. Ultrastructural interrelationship between the pineal gland and the testis in the male rat. **Arch.Androl.**, v.45(2), p.119-124, 2000.

LADIZESKI, M.G., BOGGIO, V., ALBORNOZ, L.E., CASTRILLÓN, P.O., MAUTALEN, C., CARDINALI, D.P. Melatonin increases oestradiol-induced bone formation in ovariectomized rats. **J.Pineal Res.**, v. 34(2), p.143-151, 2003.

LAITINEN, J.T., SAAVEDRA, J.M. Characterization of Melatonin Receptors in the Rat Suprachiasmatic Nuclei: Modulation of Affinity with Cations and Guanine Nucleotides. **Endocrinology**, v.126, n.4, p.2110-2115, 1990.

LERNER, A.B., CASE, J.D. Melatonin. **Fed.Proc.**, v.19, p.590-592, 1960.

LERNER, A.B., CASE, J.D., TAKAHASHI, Y., LEE, T.H., MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **J.Am.Chem.Soc.**, v.80, p.25-87, 1958.

LEROUXEL, E., LIBOUBAN, H., MOREAU, M.F., BASLÉ, M.F.; AUDRAN, M., CHAPPARD, D. Mandibular bone loss in an animal model of male osteoporosis (orchidectomized rat): a radiographic and densitometric study. **Osteop.Int.**, v.15(10), p.814-819, 2004.

LI, M., JEE, W.S.S., KE, H.Z., TANG, L.Y., MA, Y.F., LIANG, X.G., SETTERBERG, R.B. Prostaglandin E2 Administration Prevents Bone Loss Induced by Orchidectomy in Rats. **J.Bone Min.Res.**, v.10, p.66-73, 1995.

LIMA, M.A., LIMA, L.M.B., FREITAS, L.L.L., BARBOSA, P.F.T., BORGES, M.F., REIS, L., PEREIRA, G.A. C cells in the thyroid of pinealectomized rats. **Rev.Hosp.Clin. Fac. Med. São Paulo**, v.58, n.1, p.21-26, 2003.

LISSONI, P., TANCINI, G., BARNI, S., PAOLOROSSO, F., ROSSINI, F., MAFFE, P., DI-BELLA, L. The pineal hormone melatonin in hematology and its potential efficacy in the treatment of thrombocytopenia. **Recenti.Prog.Med.**, v.87(12), p.582-585, 1996.

LUTTGE, W.G., WALLIS, C.J. *In vitro* accumulation and saturation of 3H –progesterone in selected brain regions in the adenohipophysis, uterus and pineal of the female rats. **Steroids**, v.22, p.493-502, 1973

MACHIDA, M., DUBOUSSET, J., IMAMURA, Y., MIYASHITA, Y., YAMADA, T., KIMURA, J. Melatonin. A possible role in pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. **Spine**, v.21(10), p.1147-1152, 1996.

MAEDA, T., KAWANE T., HORIUCHI, N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. **Endocrinology**; v.144(2), p.681-692, 2003.

MAESTRONI, G.J., CONTI, A., PIERPAOLI, W. Pineal Melatonin, Its Fundamental Immunoregulatory Role in Aging and Cancer. **Ann.New York Acad.Sciences**, v.521, p.140-148, 1988.

MALMROS, B., MORTENSEN, L., JENSEN, M.B., CHARLES, P. Positive effects of physiotherapy on chronic pain and performance in osteoporosis. **Osteop.Int.**, v.8, p.215-221, 1998.

MARCUS, R., FELDMAN, D., KELSEY, J. **Osteoporosis**, San Diego: Academic Press, p.3-22, 1996.

MARQUES NETO, J.F. **Campanha nacional de prevenção da osteoporose**. 1ª edição. São Paulo, Merck Sharp & Dohme, 54p., 2001.

- MARTIN, R.B. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. **J.Biomech.**, v.23, n.10, p.1021-1029, 1990.
- MAZESS, R.B. Fracture Risk: A Role for Compact Bone. **Calcif.Tissue Int.**, v.47, p.191-193, 1990.
- MELTON, L.J., RIGGS, B.L. Epidemiology and cost of osteoporotic fractures. In: **International Conference on Osteoporosis**. Milano, 1986.
- MILLER, S.C., BOWMAN, B.M., JEE, W.S.S. Available animal models of osteopenia - small and large. **Bone**, v.17, p.117-123, 1995.
- MITCHELL, S.L., GRANT, S., AITCHISON, T. Physiological effects of exercise on post-menopausal osteoporotic women. **Physiotherapy**, v.84 (4), p.157-163, 1998.
- MONTEAGUDO, M.D., HERNÁNDEZ, E.R., SECO, C., GONZALEZ-RIOLA, J., REVILLA, M., VILLA, L.F., RICO, H. Comparison of the Bone Robusticity Index and Bone Weight/Bone Length Index with the Results of Bone Densitometry and Bone Histomorphometry in Experimental Studies. **Act.Anat.**, v.160, p.195-199, 1997.
- MORÁBITO, C.R.T. **Importância da melatonina no sono fisiológico humano**. Dissertação de mestrado DCF/UFSCar, 1995.
- MOREAU, M.F., LIBOUBAN, H., LEGRAND, E., BASLÉ, M.F., AUDRAN, M., CHAPPARD, D. Lean, fat and bone masses are influenced by orchidectomy in the rat. A densitometric X-ray absorptiometric study. **J.Musc.Neur.Interact**, v.1(3), p.209-213, 2001.
- MOSEKILDE, LI., THOMSEN, J.S., McOSKER, J.E. No Loss of Biomechanical Effects After Withdrawal of Short-Term PTH Treatment in an Aged, Osteopenic, Ovariectomized Rat Model. **Bone**, v.20, n.5, p.429-437, 1997.
- MUNDY, G.R., MARTIN, T.J. **Physiology and pharmacology of bone**. Berlin: Springer-Verlag, 762p., 1993.
- NAKADE, O., KOYAMA, H., ARIJI, H., YAJIMA, A., KAKU, T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. **J.Pineal Res.**, v.27(2), p.106-110, 1999.
- NODA, Y., MORI, A., LIBURDY, R., PACKER, L. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. **J.Pineal Res.**, v.27, p.159-163, 1999.
- NORDIN, B.E.C. Calcium and Osteoporosis. **Nutrition**, v.13, n.7/8, p.664-686, 1997.
- O'KELLY, C., WANG, W., RASO, J., MOREAU, M., MAHOOD, J., ZHAO, J., BAGNALL, K. The production of scoliosis after pinealectomy in young chickens, rats, and hamsters. **Spine**, v.24(1), p.35-43, 1999.

OKATANI, Y., MORIOKA, N., WAKATSUKI, A. Changes in nocturnal melatonin secretion in perimenopausal women: Correlation with endogenous estrogen concentrations. **J.Pineal Res.**, v.28, p.111-118, 2000.

OSTROWSKA, Z., KOS-KUDLA, B., MAREK, B., KAJDANIUK, D., STASZEWICZ, P., SZAPSKA, B., STRZELCZYK, J. The relationship between the daily profile of chosen biochemical markers of bone metabolism and melatonin and other hormone secretion in rats under physiological conditions. **Neuroendocrinol. Lett.**, v.23(5-6), p.417-425, 2002.

PANZER, A., Melatonin in osteosarcoma: an effective drug? **Med.Hypoth.**, v.48(6), p.523-525, 1997.

PARFITT, A.M. Calcium Homeostasis. In: **Physiology and Pharmacology of Bone**, editores: Mundy, G.R. , Martin, T.J., Berlin: Springer-Verlag,1993.

PARVIAINEN, M.T., PIRSKANEN, A., MAHONEN, A., ALLAVA, E.M., MÄENPÄÄ, P.H. Use of Non-Collagen Markers in Osteoporosis Studies. **Calcif.Tissue Int.**, S.49, p. S26-S30, 1991.

PENG, Z.,TUUKKANEN, H., ZHANG, H., JÄMSÄ, T., VÄÄNÄNEN, H.K. The mechanical strength of bone in diferent rat models of experimental Osteoporosis. **Bone**, v.15(5), p.523-532, 1994.

PROSENC, N., CERVÓS-NAVARRO, J. Ultrastructural Morphology of the Aged Pineal. **Ann.New York Acad.Sciences**, v.719, p.64-76. 1994.

PRUNET-MARCASSUS, B., DESBAZEILLE, M., BROS, A., LOUCHE, K., DELAGRANGE, P., RENARD, P., CASTEILLA, L., PÉNICAUD, L., Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. **Endocrinology**, v.144(12), p.5347-5352, 2003.

RALPH, C.L. Cytology of the Pineal Gland: Changes Produced by Various Treatments. **J.Neur.Transm.**, Suppl. 13, p.25-45, 1978.

RAISZ, L.G., SHOUKRI, K.C. Pathogenesis of Osteoporosis. In: MUNDY, G.R. & MARTIN, T.J. **Phys.Pharmac.Bone**. Berlin: Springer-Verlag, p.299-331, 1993.

RALSTON, S.H. Analysis of gene expression in human bone biopsies by plymerase chain reactrion: Evidence for enhanced cytokine expression in postmenopausal osteoporosis, **J.Bone Min.Res.**, v.9, p.883-890, 1994.

RALSTON, S.H., HO, L.P., HELFRICH, M.H., GRABOWSKI, P.S., JOHNSTON, P.W., BENJAMIN, N. Nitric Oxide: A Cytokine-Induced Regulator of Bone Resorption. **J.Bone Min.Res.**, v.10, p.1040-1049, 1995.

RASMUSSEN, D.D., BOLDT, B.M., WILKINSON, C.W., YELLON, S.M., MATSUMOTO, A.M. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. **Endocrinology**, v.140(2), p.1009-1012, 1999.

REITER, R.J. Impact of Photoperiodic Information on Pineal Metabolism and Physiology. **J.Int.Soc.Biomet.**, p.178-187, 1984.

REITER, R.J. **Melatonin - Clinical Perspectives**. Oxford University Press, p.1-42, 1988.

REITER, R.J., ROBINSON, J. **Melatonin**. New York: Bantam Book, 1995.

REITER, R.J., ROLLAG, M.D., PANKE, E.S., BANKS, A.F. Melatonin: Reproductive Effects. **J.Neur.Transm.**, Suppl. 13, p.209-223, 1978.

REITER, J.R., TAN, D., KIM, S.J., MANCHESTER, L.C., QI, W., GARCIA, J.J., CABRERA, J.C., EL-SOKKARY, G., ROUVIER-GARAY, V. Augmentation of indices of oxidative damage in life-long melatonin-deficient rats. **Mech.Age.Develop.**, v.110, p.157-173, 1999.

RIGGS, B.L., MELTON, L.J. The prevention and treatment of osteoporosis. **N.England J.Med.**, v.327, p.620-627, 1992.

ROSEN, H.N., TOLLIN, S., BALENA, R., MIDDLEBROOKS, V.K., BEAMER, W.G., DONOHUE, L.R., ROSEN, C., TURNER, A., HOLICK, M., GREENSPAN, S.L. Differentiating between orchietomized rats and controls using measurements of trabecular bone density: a comparison among DXA, histomorphometry, and peripheral computerized tomography. **Calcif.Tissue Int.**, v.57, p.35-39, 1995.

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

SADAT-ALI, M., al-HABDAN, I., al-OTHMAN, A. Adolescent idiopathic scoliosis. Is low melatonin a cause? **Join.Bone Spine**, v.67(1), p.62-64, 2000.

SARTORI, L., MAGGI, S. Epidemiology of osteoporotic fractures. **Ann.Ital.Med.Int.**, v.10, p.5-8, 1995.

SIMMONS, H.A., PIRIE, C.M., THOMPSON, D.D., KE, H.Z. Parathyroid Hormone (1-34) Increased Total Body Bone Mass in Aged Female Rats, **The J.Pharmac.Experim.Therap.**, v.286, n.341, p.341-344, 1998.

SKARE, T.L. **Reumatologia Princípios e Práticas**, 1ªed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.256, 1999.

SMITH, R. Bone physiology and the osteoporotic process. **Resp.Med.**, v.87, p.3-7, 1993.

SØGAARD, C.H., DANIELSEN, C.C., THORLING, E.B., MOSEKILDE, L. Long-Term Exercise of Young and Adult Female Ratas: Effect on Femoral Neck Biomechanical Competence and Bone Structure. **J.Bone Min.Res.**, v.9, n.3, p.409-416, 1994.

SØGAARD, L.H., MOSEKILDE, LI., THOMSEN, J.S., RICHARDS, A., McOSKER, J.E. A Comparison of the Effects of Two Anabolic Agents (Fluoride and PTH) on Ash Density and Bone Strenght Assessed in an Osteopenic Rat Model. **Bone**, v.20, p.439-449, 1997.

STAAL, A., FRITH, J.C., FRENCH, M.H., SWARTZ, J., GÜNGÖR, T., HARRITY, T.W., TAMASI, J., ROGERS, M.J., FEYEN, J.H. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. **J.Bone Miner.Res.**; v.18(1), p.88-96, 2003.

STANKOV, B., FRASCHINI, F., REITER, R.J. The melatonin receptos: distribution, biochemistry, and pharmacology. In: **MELATONIN – Biosynthesis, Physiological Effects, and Clinical Applications**. Boca Raton – Flórida: CRC Press, p.155-186, 1993.

THOMPSON, D.D. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v.17, n.4, p.125-133, 1995.

VÄÄNÄNEN, H.K. Pathogenesis of Osteoporosis. **Calcif.Tissue Int.**, [Suppl] 49, S11-S14, 1991.

VANDERSCHUEREN, D., HERCK, E.V., SUIKER, A.M.H., VISSER, W.J., SCHOT, L.P.C., BOUILLON, R. Bone and Mineral Metabolism in Aged Male Rats: Short and Long Term Effects of Androgen Deficiency. **Endocrinology**, v.130, p.2906-2916, 1992.

VANDERSCHUEREN, D., BOUILLON, R. Androgens and Bone. **Calcif.Tissue Int.** v.56, p.341-346, 1995.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiol.Rev.**, v.78, p.687-721, 1998.

WILLS, M.R. Osteoporosis diagnosis and therapeutic management. **Rev.Soc.Bras.Densitom.Clin.**, v.7(2), p.3-13, 1998.

WOLDEN-HANSON, T., MITTON, D.R., McCANTIS, R.L., YELLON, S.M., WILKINSON, C.W., MATSUMOTO, A.M., RASMUSSEN, D.D., Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. **Endocrinology**, v.141(2), p.487-497, 2000.

WOOLF, A.D., DIXON, A.S.J. **Um guia clínico – Osteoporse**. London: Martin Dunitz, 1988.

WURTMAN, R.J., OZAKI, Y. Physiological Control of Melatonin Synthesis and Secretion: Mechanisms Generating Rhythms in Melatonin, Methoxytryptophol, and Arginine Vasotocin Levels and Effects on the Pineal of Endogenous Catecholamines, the Estrous Cycle, and Environmental Lighting. **J.Neur.Transm.**, Suppl. 13, p.59-70, 1978.

YU, H.S., TSIN, A.T.C., REITER, R.J. Melatonin: history, biosynthesis, and assay methodology. In: **MELATONIN – Biosynthesis, Physiological Effects, and Clinical Applications**. Boca Raton – Flórida: CRC Press, p.1-16, 1993.

ZARROW, M.X., YOCHIM, J.M., McCARTHY, J.L. **Experimental Endocrinology - a sourcebook of basic techniques**. New York: Academic Press, p.136-137, 1964.

ZERBINI,C. The current status of bisphosphanate therapy in osteoporosis. **Rev.Bras.Reum.**, v.35:2, p.88, 1995.

ZHOU, H., CHERNECKY, R., DAVIES, J.E. Deposition of Cement at Reversal Lines in Rat Femoral Bone. **J.Bone Min.Res.**, v.9, n.3, p.367-374, 1994.

APÊNDICE

DP = desvio padrão; EPM = erro padrão médio

Ratos pinealectomizados + castrados

Rato	PC in (g)	PC fin (g)	F.max (N)	Comp.(mm)	Diam > (mm)	Diam < (mm)	P.imerso (g)	P.úmido(g)	P.seco (g)	P.cinza (g)	V.Osseo	D.Ossea	D.Mineral	F.M.Norm	Ganho Peso
203	341	380	96,2	39,3	3,75	2,55	0,3798	0,9497	0,5393	0,3786	0,5699	1,66643	664,33	0,1448	39
207	332	388	98,6	38,75	3,6	2,6	0,3911	0,9085	0,54	0,3827	0,5174	1,75589	739,66	0,1333	56
222	344	382	96	39,15	4,1	2,45	0,4044	0,9493	0,5753	0,3997	0,5449	1,74215	733,53	0,1309	38
223	341	378	110,2	39,25	4,1	2,7	0,377	0,903	0,5434	0,3752	0,526	1,71673	713,31	0,1545	37
224	326	398	102,2	39,35	3,7	2,55	0,3942	0,8945	0,5518	0,3869	0,5003	1,78793	773,34	0,1322	72
231	353	374	86,3	39,65	3,45	2,45	0,3839	0,9395	0,5498	0,3798	0,5556	1,69096	683,59	0,1262	21
232	335	400	78,9	39,7	3,5	2,35	0,3696	0,8892	0,5133	0,3543	0,5196	1,71132	681,87	0,1157	65
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Média	338,86	385,71	95,486	39,3071	3,742857	2,521429	0,385714	0,9191	0,5447	0,3796	0,5334	1,72449	712,8	0,1339	46,85714
DP	8,7831	10,029	10,259	0,31941	0,265249	0,114953	0,011719	0,02625	0,01849	0,01371	0,0243	0,04093	38,678	0,0125	18,03172
EPM	3,3197	3,7904	3,8777	0,12073	0,100255	0,043448	0,004429	0,00992	0,00699	0,00518	0,0092	0,01547	14,619	0,0047	6,815349

Ratos pinealectomizados + intactos

Rato	PC in (g)	PC fin (g)	F.max (N)	Comp.(mm)	Diam > (mm)	Diam < (mm)	P.imerso (g)	P.úmido(g)	P.seco (g)	P.cinza (g)	V.Osseo	D.Ossea	D.Mineral	F.M.Norm	Ganho Peso
209	329	387	93,6	38,75	3,7	2,45	0,386	0,8826	0,5376	0,3762	0,4966	1,77729	757,55	0,1236	58
210	316	396	95,8	38,2	3,9	2,5	0,3952	0,8992	0,5543	0,3926	0,504	1,78413	778,97	0,123	80
211	328	410	105,8	38,85	3,75	2,65	0,3918	0,9031	0,5451	0,3915	0,5113	1,76628	765,7	0,1382	82
215	317	390	81,9	37,9	3,75	2,35	0,3701	0,8665	0,5101	0,3584	0,4964	1,74557	722	0,1134	73
216	311	368	86,3	38,95	3,5	2,3	0,3744	0,8658	0,5251	0,3639	0,4914	1,7619	740,54	0,1165	57
233	353	460	120,3	41,45	4,1	3,1	0,4605	1,1336	0,7102	0,4911	0,6731	1,68415	729,61	0,1649	107
234	363	423	121,9	41,7	4,1	3,05	0,4664	1,1516	0,6909	0,4761	0,6852	1,68068	694,83	0,1754	60
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Média	331	404,86	100,8	39,4	3,828571	2,628571	0,406343	0,95749	0,5819	0,40711	0,5511	1,74286	741,31	0,1364	73,85714
DP	19,757	29,925	15,784	1,53351	0,219578	0,325137	0,040048	0,12737	0,08246	0,05395	0,0877	0,04305	28,714	0,0245	17,93905
EPM	7,4674	11,31	5,9657	0,57961	0,082993	0,12289	0,015137	0,04814	0,03117	0,02039	0,0332	0,01627	10,853	0,0093	6,780324

Ratos pinealectomizados sham

Rato	PC in (g)	PC fin (g)	F.max (N)	Comp.(mm)	Diam > (mm)	Diam < (mm)	P.imerso (g)	P.úmido(g)	P.seco (g)	P.cinza (g)	V.Osseo	D.Ossea	D.Mineral	F.M.Norm	Ganho	Peso
217	332	376	109,3	38,45	4	2,85	0,4069	0,9726	0,5752	0,4018	0,5657	1,71929	710,27	0,1539		44
218	330	396	107,7	39,35	3,65	2,7	0,421	0,95	0,5929	0,4216	0,529	1,79584	796,98	0,1351		66
219	339	399	100,5	39,65	3,75	2,5	0,4198	0,9736	0,5954	0,4181	0,5538	1,75804	754,97	0,1331		60
220	333	396	125,6	39,65	3,85	2,95	0,434	1,0051	0,622	0,4381	0,5711	1,75994	767,12	0,1637		63
221	357	424	95,1	39,85	3,7	2,35	0,4195	0,9644	0,596	0,4149	0,5449	1,76987	761,42	0,1249		67
225	323	376	101,3	39,15	4	2,5	0,4014	0,9339	0,5794	0,4037	0,5325	1,7538	758,12	0,1336		53
226	328	394	100,1	39,2	3,8	2,35	0,3985	0,8908	0,5661	0,3961	0,4923	1,80947	804,59	0,1244		66
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Média	334,57	394,43	105,66	39,3286	3,821429	2,6	0,414443	0,95577	0,58957	0,41347	0,5413	1,7666	764,78	0,1384		59,85714
DP	11,028	16,226	10,026	0,46535	0,138013	0,238048	0,012655	0,03615	0,01825	0,01432	0,0267	0,02951	30,957	0,0148		8,513295
EPM	4,1682	6,1329	3,7893	0,17588	0,052164	0,089974	0,004783	0,01366	0,0069	0,00541	0,0101	0,01115	11,701	0,0056		3,217723

Ratos pinealectomizados + castrados + salina

Rato	PC in (g)	PC fin (g)	F.max (N)	Comp.(mm)	Diam > (mm)	Diam < (mm)	P.imerso (g)	P.úmido(g)	P.seco (g)	P.cinza (g)	V.Osseo	D.Ossea	D.Mineral	F.M.Norm	Ganho	Peso
235	359	392	92,4	39,95	3,85	2,6	0,4038	0,9659	0,5765	0,3962	0,5621	1,71838	704,86	0,1311		33
236	347	361	88,8	39,55	3,75	2,6	0,3807	0,9194	0,5592	0,3746	0,5387	1,7067	695,38	0,1277		14
238	356	371	87,3	37,25	3,75	2,7	0,3667	0,868	0,5019	0,3519	0,5013	1,7315	701,97	0,1244		15
239	338	379	96,4	38,05	3,85	2,7	0,3775	0,8995	0,5246	0,3674	0,522	1,72318	703,83	0,137		41
241	334	360	105,1	38,8	4	2,7	0,4055	0,992	0,5788	0,4052	0,5865	1,69139	690,88	0,1521		26
242	350	357	101,4	38,2	3,65	2,65	0,3899	0,9191	0,5512	0,382	0,5292	1,73677	721,84	0,1405		7
243	353	373	96	38	4	2,45	0,3776	0,9273	0,5415	0,3756	0,5497	1,68692	683,28	0,1405		20
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Média	348,14	370,43	95,343	38,5429	3,835714	2,628571	0,385957	0,92731	0,54767	0,37899	0,5414	1,71355	700,29	0,1362		22,28571
DP	9,2273	12,408	6,4498	0,94755	0,131385	0,090633	0,014466	0,04102	0,02772	0,01775	0,0279	0,01926	12,267	0,0094		11,82813
EPM	3,4876	4,6897	2,4378	0,35814	0,049659	0,034256	0,005468	0,0155	0,01048	0,00671	0,0105	0,00728	4,6363	0,0036		4,470615

Ratos pinealectomizados + castrados + melatonina

Rato	PC in (g)	PC fin (g)	F.max (N)	Comp.(mm)	Diam > (mm)	Diam < (mm)	P.imerso (g)	P.úmido(g)	P.seco (g)	P.cinza (g)	V.Osseo	D.Ossea	D.Mineral	F.M.Norm	Ganho	Peso
244	323	352	101,3	37,5	3,75	2,75	0,3894	0,9075	0,5529	0,3845	0,5181	1,75159	742,13	0,1365		29
245	347	370	102,6	39,25	4,05	2,6	0,4126	0,9882	0,5861	0,4115	0,5756	1,71682	714,91	0,1435		23
246	334	346	104	38,95	3,6	2,6	0,3889	0,9408	0,5758	0,3889	0,5519	1,70466	704,66	0,1476		12
247	344	372	90,8	38,5	3,7	2,5	0,3822	0,8994	0,5425	0,3774	0,5172	1,73898	729,7	0,1244		28
249	352	364	101,2	38,65	3,75	2,7	0,4226	1,0326	0,6201	0,4211	0,61	1,69279	690,33	0,1466		12
250	342	372	83,3	38,1	3,7	2,5	0,369	0,9157	0,5287	0,3641	0,5467	1,67496	666	0,1251		30
251	349	356	102,9	37,75	4	2,7	0,3922	0,9625	0,5716	0,3946	0,5703	1,68771	691,92	0,1487		7
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Média	341,57	361,71	98,014	38,3857	3,792857	2,621429	0,393843	0,94953	0,56824	0,39173	0,5557	1,70964	705,66	0,1389		20,14286
DP	10,014	10,484	7,8552	0,6349	0,166905	0,099403	0,018159	0,04842	0,03038	0,01954	0,033	0,02788	25,794	0,0105		9,581729
EPM	3,785	3,9624	2,969	0,23997	0,063084	0,037571	0,006863	0,0183	0,01148	0,00739	0,0125	0,01054	9,7492	0,004		3,621553

Ratos pinealectomizados + intactos + melatonina

Rato	PC in (g)	PC fin (g)	F.max (N)	Comp.(mm)	Diam > (mm)	Diam < (mm)	P.imerso (g)	P.úmido(g)	P.seco (g)	P.cinza (g)	V.Osseo	D.Ossea	D.Mineral	F.M.Norm	Ganho	Peso
253	357	378	104,9	38,85	3,95	2,55	0,4069	0,9826	0,5763	0,4003	0,5757	1,70679	695,33	0,1509		21
254	338	365	93,6	38,25	4	2,45	0,3873	0,9151	0,5586	0,391	0,5278	1,7338	740,81	0,1263		27
255	339	393	90,8	39,35	3,85	2,6	0,3913	0,9949	0,5732	0,3961	0,6036	1,64828	656,23	0,1384		54
256	354	381	90	39,3	4,1	2,5	0,349	0,9255	0,5576	0,3908	0,5765	1,60538	677,88	0,1328		27
257	346	382	104	38,6	4,2	2,6	0,4011	1,002	0,6	0,4087	0,6009	1,6675	680,15	0,1529		36
258	352	382	93,3	38,75	3,95	2,75	0,3783	0,9286	0,546	0,3826	0,5503	1,68744	695,26	0,1342		30
259	359	380	118,3	39,55	4,25	2,65	0,4136	1,0298	0,6205	0,427	0,6162	1,67121	692,96	0,1707		21
260	348	397	105,1	39,15	4,05	2,5	0,3926	0,9379	0,5666	0,3988	0,5453	1,71997	731,34	0,1437		49
N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Média	349,13	382,25	100	38,975	4,04375	2,575	0,390013	0,96455	0,57485	0,39941	0,5745	1,68005	696,24	0,1437		33,125
DP	7,8274	9,6769	9,7936	0,43753	0,134795	0,096362	0,019998	0,04289	0,02445	0,01356	0,0314	0,04153	27,847	0,0142		12,39167
EPM	2,7674	3,4213	3,4626	0,15469	0,047657	0,034069	0,00707	0,01517	0,00864	0,00479	0,0111	0,01468	9,8452	0,005		4,381118

Ratos pinealectomizados + intactos + salina

Rato	PC in (g)	PC fin (g)	F.max (N)	Comp.(mm)	Diam > (mm)	Diam < (mm)	P.imerso (g)	P.úmido(g)	P.seco (g)	P.cinza (g)	V.Osseo	D.Ossea	D.Mineral	F.M.Norm	Ganho Peso
261	325	348	84,6	38,4	3,65	2,45	0,3901	0,903	0,5304	0,3471	0,5129	1,76058	676,74	0,125	23
262	315	349	78,7	38,1	3,55	2,5	0,3307	0,8743	0,4855	0,3202	0,5436	1,60835	589,04	0,1336	34
263	350	401	73,9	39,75	3,9	2,45	0,3901	1,0142	0,5748	0,3901	0,6241	1,62506	625,06	0,1182	51
265	348	446	85,2	40,65	3,75	2,45	0,3911	1,0318	0,5768	0,3916	0,6407	1,61043	611,21	0,1394	98
267	358	417	90	40,6	4,2	2,7	0,4221	1,0801	0,6384	0,4316	0,658	1,64149	655,93	0,1372	59
268	365	430	93,4	40,05	4,1	2,7	0,4262	1,0939	0,644	0,4409	0,6677	1,63831	660,33	0,1414	65
269	362	400	101,9	40	4,2	2,75	0,418	1,0313	0,6209	0,429	0,6133	1,68156	699,49	0,1457	38
270	356	427	90,8	40,2	3,7	2,55	0,3905	0,9938	0,5793	0,396	0,6033	1,64727	656,39	0,1383	71
N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Média	347,38	402,25	87,313	39,7188	3,88125	2,56875	0,39485	1,0028	0,58126	0,39331	0,608	1,65163	646,77	0,1349	54,875
DP	18	36,449	8,7434	0,95803	0,257651	0,128	0,030366	0,07802	0,05424	0,04227	0,0543	0,04977	36,07	0,0091	23,87729
EPM	6,3638	12,887	3,0913	0,33871	0,091093	0,045255	0,010736	0,02758	0,01918	0,01494	0,0192	0,0176	12,753	0,0032	8,441897

Basais

Rato	P.C. (g)	Comp.(mm)	Diam > (mm)	Diam < (mm)	P. Imerso (g)	P. Úmido (g)	P. Seco (g)	P. Cinza (g)	V. Ósseo	D.Óssea	C.Máx.(kgf)	C.Máx.(N)	F.M.Norm
105	304	36,50	3,75	2,70	0,33	0,74	0,43	0,30	0,41	1,79	8,88	86,98	119,44
107	314	35,55	3,95	2,50	0,32	0,70	0,41	0,29	0,39	1,82	7,69	75,37	101,45
109	377	38,55	4,15	2,90	0,38	0,93	0,54	0,36	0,55	1,69	11,15	109,29	166,34
110	369	38,20	3,70	2,75	0,37	0,87	0,50	0,35	0,50	1,74	10,53	103,23	149,43
111	330	36,65	3,75	2,70	0,34	0,78	0,46	0,32	0,43	1,79	9,39	92,05	125,64
112	363	38,00	3,80	2,85	0,37	0,84	0,51	0,35	0,47	1,79	11,31	110,81	148,05
114	343	39,35	4,10	2,95	0,39	0,92	0,55	0,37	0,53	1,73	10,43	102,23	145,57
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Média	342,9	37,54	3,89	2,76	0,36	0,83	0,49	0,33	0,47	1,77	9,91	97,14	136,56
DP	28,17	1,34	0,18	0,15	0,03	0,09	0,05	0,03	0,06	0,05	1,32	12,91	22,03
EPM	8,91	0,42	0,06	0,05	0,01	0,03	0,02	0,01	0,02	0,01	0,42	4,08	6,97

BMD = densidade mineral óssea; BMC = conteúdo mineral ósseo

Ratos pinealectomizados + castrados

Rato	TOTAL			1/3 Distal			1/3 Medial			1/3 Proximal		
	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)
203	0,163	0,4218	2,588	0,1576	0,1408	0,8931	0,1756	0,1376	0,7834	0,1577	0,1434	0,9092
207	0,1408	0,3042	2,16	0,1215	0,08401	0,6912	0,1466	0,09537	0,6507	0,1529	0,1242	0,8124
222	0,161	0,4083	2,536	0,1589	0,141	0,8873	0,1569	0,1171	0,7463	0,1664	0,1503	0,9029
223	0,1619	0,4289	2,649	0,1569	0,1439	0,9174	0,1658	0,1294	0,7805	0,1634	0,1554	0,9508
224	0,1608	0,4104	2,552	0,1598	0,1344	0,8413	0,1546	0,1148	0,7424	0,1668	0,1609	0,9644
231	0,1629	0,4242	2,605	0,1605	0,1485	0,9256	0,1533	0,1129	0,7365	0,1731	0,1621	0,9366
232	0,1632	0,4126	2,528	0,1593	0,1367	0,8584	0,1704	0,1277	0,7496	0,1612	0,148	0,9183
201	0,1537	0,3715	2,417	0,1527	0,125	0,8186	0,1539	0,1023	0,6646	0,1547	0,1436	0,9279
N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Média	0,158413	0,397738	2,504375	0,1534	0,131789	0,854113	0,159638	0,117146	0,73175	0,162025	0,148488	0,915313
DP	0,007756	0,041715	0,154961	0,013117	0,020535	0,075329	0,009889	0,014132	0,048973	0,006791	0,012132	0,046402
EPM	0,002151	0,01157	0,042978	0,003638	0,005695	0,020893	0,002743	0,00392	0,013583	0,001883	0,003365	0,01287

Ratos pinealectomizados + intactos

Rato	TOTAL			1/3 Distal			1/3 Medial			1/3 Proximal		
	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)
209	0,1635	0,3759	2,3	0,1588	0,1268	0,7987	0,1716	0,1147	0,6684	0,1635	0,1333	0,8156
210	0,1634	0,3959	2,423	0,1662	0,1411	0,8489	0,1586	0,1043	0,6575	0,1654	0,1495	0,904
211	0,1661	0,4131	2,487	0,1652	0,1466	0,8871	0,1614	0,1124	0,6969	0,1728	0,153	0,8853
215	0,1509	0,3659	2,424	0,1527	0,1345	0,8805	0,1439	0,09402	0,6533	0,1551	0,1367	0,8813
216	0,1579	0,3838	2,431	0,1621	0,1369	0,8445	0,1495	0,0998	0,6674	0,1621	0,1457	0,8989
233	0,1848	0,5252	2,843	0,173	0,1713	0,99	0,1888	0,1544	0,818	0,1945	0,1984	1,02
234	0,1942	0,5519	2,842	0,1891	0,1835	0,9704	0,198	0,1639	0,8279	0,1974	0,2027	1,027
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Média	0,168686	0,430243	2,535714	0,166729	0,148671	0,888586	0,1674	0,120503	0,712771	0,172971	0,1599	0,918871
DP	0,015302	0,075873	0,216918	0,011715	0,020834	0,069094	0,019992	0,027459	0,076593	0,016557	0,028628	0,077182
EPM	0,004614	0,022877	0,065403	0,003532	0,006282	0,020833	0,006028	0,008279	0,023094	0,004992	0,008632	0,023271

Ratos pinealectomizados sham

Rato	TOTAL			1/3 Distal			1/3 Medial			1/3 Proximal		
	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)
217	0,1709	0,4398	2,573	0,159	0,1399	0,88	0,1724	0,1259	0,7305	0,1817	0,173	0,9517
218	0,179	0,47	2,625	0,1761	0,1543	0,8762	0,1761	0,1327	0,7536	0,1844	0,1822	0,9885
219	0,1746	0,4426	2,535	0,173	0,1543	0,8915	0,1667	0,1196	0,7174	0,1821	0,1687	0,9261
220	0,1736	0,4459	2,569	0,1705	0,1544	0,906	0,1766	0,1283	0,7264	0,1753	0,1619	0,9234
221	0,1737	0,4505	2,593	0,1725	0,165	0,9566	0,1777	0,1359	0,7648	0,1715	0,1495	0,8716
225	0,1682	0,4168	2,478	0,1626	0,1379	0,8483	0,1706	0,1266	0,7425	0,1717	0,1523	0,8868
226	0,1768	0,437	2,471	0,1743	0,1479	0,8484	0,179	0,1281	0,7159	0,1776	0,1604	0,9028
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Média	0,173829	0,443229	2,549143	0,169714	0,150529	0,886714	0,174157	0,128157	0,735871	0,177757	0,164	0,921557
DP	0,003571	0,015949	0,057748	0,006408	0,009418	0,037368	0,004418	0,005186	0,018501	0,005171	0,011539	0,039727
EPM	0,001129	0,005043	0,018261	0,002026	0,002978	0,011817	0,001397	0,00164	0,005851	0,001635	0,003649	0,012563

Ratos pinealectomizados + castrados + salina

Rato	TOTAL			1/3 Distal			1/3 Medial			1/3 Proximal		
	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)
235	0,1628	0,4154	2,552	0,1624	0,1448	0,8917	0,1584	0,1081	0,6824	0,1683	0,1606	0,9541
236	0,1664	0,4608	2,769	0,1634	0,1685	1,031	0,1711	0,1378	0,8057	0,1655	0,1542	0,932
238	0,1633	0,3786	2,318	0,1557	0,1282	0,8234	0,1699	0,116	0,683	0,1671	0,1331	0,7969
239	0,1627	0,3893	2,393	0,1591	0,1342	0,8431	0,1557	0,1022	0,6563	0,1712	0,153	0,8932
241	0,1663	0,4276	2,571	0,1672	0,1514	0,9058	0,1556	0,1083	0,6964	0,1768	0,1654	0,9357
242	0,1693	0,4357	2,573	0,1696	0,1541	0,9083	0,1597	0,1157	0,7245	0,178	0,1645	0,924
243	0,1649	0,3963	2,403	0,1681	0,1446	0,8607	0,1655	0,1121	0,6776	0,1641	0,1381	0,8413
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Média	0,1651	0,414814	2,511286	0,163643	0,146543	0,894857	0,162271	0,114314	0,7037	0,170143	0,1527	0,896743
DP	0,002419	0,028925	0,151946	0,005055	0,013282	0,068065	0,00653	0,011422	0,049498	0,005445	0,012666	0,057516
EPM	0,000806	0,009642	0,050649	0,001685	0,004427	0,022688	0,002177	0,003807	0,016499	0,001815	0,004222	0,019172

Ratos pinealectomizados + castrados + melatonina

Rato	TOTAL			1/3 Distal			1/3 Medial			1/3 Proximal		
	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)
244	0,1732	0,4204	2,428	0,1725	0,1396	0,809	0,1663	0,116	0,6976	0,1796	0,1642	0,9145
245	0,1693	0,4249	2,51	0,168	0,1484	0,8836	0,1688	0,1167	0,6913	0,1723	0,1542	0,8949
246	0,1695	0,4315	2,546	0,1636	0,1443	0,8822	0,1747	0,123	0,7042	0,1724	0,1627	0,9441
247	0,1665	0,4182	2,511	0,1671	0,149	0,8918	0,1697	0,1217	0,7173	0,1637	0,1467	0,8963
248	0,165	0,3885	2,355	0,161	0,1274	0,7917	0,1716	0,1222	0,7124	0,1632	0,1388	0,8508
249	0,1771	0,4491	2,537	0,1759	0,1562	0,888	0,1705	0,1207	0,7078	0,1841	0,1714	0,9313
251	0,169	0,4357	2,578	0,1735	0,1587	0,915	0,1731	0,1296	0,7487	0,1632	0,1463	0,8966
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Média	0,169943	0,424043	2,495	0,1688	0,146229	0,8659	0,170671	0,121414	0,711329	0,171214	0,1549	0,904071
DP	0,004075	0,018845	0,07727	0,005441	0,010564	0,046354	0,002786	0,004514	0,018647	0,008405	0,011694	0,030251
EPM	0,001358	0,006282	0,025757	0,001814	0,003521	0,015451	0,000929	0,001505	0,006216	0,002802	0,003898	0,010084

Ratos pinealectomizados + intactos + melatonina

Rato	TOTAL			1/3 Distal			1/3 Medial			1/3 Proximal		
	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)
253	0,169	0,4439	2,627	0,1693	0,1513	0,8939	0,1685	0,1281	0,7603	0,1713	0,1626	0,9492
254	0,1639	0,4151	2,532	0,1573	0,1402	0,8914	0,1707	0,1239	0,726	0,1652	0,15	0,9083
255	0,1664	0,443	2,662	0,1558	0,144	0,9241	0,1726	0,1269	0,7349	0,1745	0,1701	0,9746
256	0,1583	0,3994	2,524	0,1552	0,1349	0,8691	0,1574	0,1136	0,7217	0,1638	0,1496	0,9132
257	0,1688	0,4493	2,662	0,1661	0,1513	0,9114	0,1721	0,1308	0,7599	0,1705	0,1656	0,9711
259	0,1838	0,4955	2,695	0,1739	0,167	0,9601	0,19	0,1497	0,7878	0,1885	0,1785	0,9473
260	0,1726	0,453	2,625	0,1624	0,1463	0,9006	0,1819	0,1366	0,751	0,1758	0,1685	0,9587
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Média	0,168971	0,442743	2,618143	0,162857	0,147857	0,907229	0,173314	0,129943	0,7488	0,1728	0,163557	0,946057
DP	0,007951	0,030484	0,066034	0,007228	0,010279	0,028935	0,010307	0,011193	0,023198	0,008213	0,0106	0,026199
EPM	0,002811	0,010778	0,023347	0,002556	0,003634	0,01023	0,003644	0,003957	0,008202	0,002904	0,003748	0,009263

Ratos pinealectomizados + intactos + salina

	TOTAL			1/3 Distal			1/3 Medial			1/3 Proximal		
Rato	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)
261	0,1558	0,4048	2,599	0,154	0,1442	0,9361	0,1569	0,1166	0,7428	0,1575	0,1431	0,9089
263	0,1524	0,3673	2,41	0,152	0,1262	0,8303	0,1476	0,1032	0,6991	0,1567	0,1372	0,8758
265	0,1613	0,4226	2,619	0,1582	0,1467	0,9271	0,1563	0,1167	0,7464	0,1687	0,1587	0,9403
267	0,1637	0,4473	2,733	0,1635	0,1569	0,9597	0,1644	0,122	0,7418	0,1647	0,1669	1,013
268	0,1672	0,4594	2,748	0,1643	0,1568	0,9544	0,1671	0,1358	0,8126	0,1701	0,1664	0,978
269	0,169	0,4499	2,661	0,1635	0,1469	0,8989	0,1706	0,1307	0,7663	0,1736	0,1712	0,9861
270	0,1674	0,4322	2,581	0,1657	0,1467	0,8851	0,1646	0,1192	0,7238	0,1738	0,1643	0,9456
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Média	0,1624	0,426214	2,621571	0,160171	0,146343	0,913086	0,161071	0,1206	0,747543	0,166443	0,158257	0,949671
DP	0,006299	0,031847	0,113196	0,005455	0,010261	0,045541	0,007877	0,010575	0,035476	0,007092	0,013028	0,047194
EPM	0,001992	0,010071	0,035796	0,001725	0,003245	0,014401	0,002491	0,003344	0,011219	0,002243	0,00412	0,014924

Basais

	TOTAL			1/3 Distal			1/3 Medial			1/3 Proximal		
Rato	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)	BMD(g/cm2)	BMC(g)	ÁREA(cm2)
105	0,1432	0,3094	2,160	0,1431	0,1114	0,7786	0,1401	0,0852	0,6082	0,1457	0,1127	0,7731
107	0,1470	0,3301	2,245	0,1493	0,1164	0,7795	0,1475	0,0969	0,6571	0,1442	0,1165	0,8077
109	0,1500	0,3861	2,575	0,1464	0,1354	0,9250	0,1502	0,1063	0,7081	0,1554	0,1435	0,9236
110	0,1548	0,3802	2,456	0,1500	0,1333	0,8884	0,1532	0,1062	0,6930	0,1607	0,1432	0,8914
111	0,1449	0,3275	2,259	0,1488	0,1243	0,8354	0,1395	0,0853	0,6113	0,1475	0,1166	0,7904
112	0,1622	0,3935	2,426	0,1537	0,1298	0,8442	0,1668	0,1160	0,6954	0,1663	0,1504	0,9048
113	0,1454	0,3340	2,297	0,1471	0,1203	0,8181	0,1452	0,09124	0,6282	0,1462	0,1211	0,8282
114	0,1584	0,4155	2,624	0,1560	0,1441	0,9234	0,1574	0,1134	0,7205	0,1639	0,1563	0,9535
N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Média	1,0229	1,2085	3,0047	1,0216	1,0017	1,6436	1,0222	0,9778	1,4802	1,0255	1,0067	1,6525
DP	2,6164	2,5471	1,8797	2,6169	2,6244	2,3843	2,6167	2,6333	2,4453	2,6154	2,6225	2,3811
EPM	0,9250	0,9005	0,6646	0,9252	0,9279	0,8430	0,9251	0,9310	0,8645	0,9247	0,9272	0,8419