



Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Ciências Fisiológicas
Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico

Milena Rossales Castro

**ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE MELATONINA SOBRE O TECIDO
ÓSSEO DE RATAS COM HIPOESTROGENISMO INDUZIDO**

São Carlos - SP
2024

Milena Rossales Castro

**ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE MELATONINA SOBRE O TECIDO
ÓSSEO DE RATAS COM HIPOESTROGENISMO INDUZIDO**

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck

**São Carlos - SP
2024**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

FOLHA DE APROVAÇÃO

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Trabalho de Conclusão de curso do candidato Milena Rossales Castro, realizada em 14/06/2024.

Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Victor Fabricio
Universidade do Oeste Paulista / Faculdade de Medicina de Jaú

Me. Taciane Maria Melges Pejon
Universidade Federal de São Carlos

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, pessoas que me ensinaram o verdadeiro significado de amor. Em especial, à minha mãe, meu pilar de força e fonte de motivação constante, e ao meu pai, *in memoriam*, cuja presença permanece viva em meu coração.

APOIO FINANCEIRO



Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 2021/10404-8) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC; Edital 001/2021).

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, expresso minha admiração e profundo agradecimento ao Professor Doutor Wladimir Rafael Beck pela constante oportunidade de aprendizado e crescimento, pela confiança depositada em mim e pela orientação genuína ao longo destes anos de graduação e durante a execução desta pesquisa.

Agradeço à minha mãe, Nilva, por todo o amor incondicional ao longo da vida e por sempre me proporcionar a certeza de que posso alcançar qualquer sonho. Mãe, tudo é e sempre será por você. Você é minha heroína. Eu te amo! Ao meu pai, Celsior, que sempre vibrou com minhas realizações e, tenho certeza, estaria extremamente orgulhoso neste momento. Sinto sua falta.

Ao meu irmão, Fernando, que sempre esteve presente nos momentos importantes da minha vida, em quem me inspiro em muitos aspectos e admiro a inteligência. Nossa ligação é eterna. À minha cunhada, Amanda, que se tornou uma grande amiga e me acompanhou em várias fases ao longo dos anos. Amanda, com você posso parafrasear Mário Quintana para dizer que a cada vitória tua, sinto que venci.

À minha família, pequena, mas com o tamanho ideal, que além de família, são meus verdadeiros amigos. Luciana e Claudio, que nunca mediram esforços para me apoiar. Minha avó, Maria, que é meu símbolo de mulher e resiliência, a quem amo profundamente. Gilberto, a quem admiro por sua coragem e garra. Ademir, pelas várias conversas e caronas nessas idas e vindas de São Carlos.

Ao meu namorado, Cleber, que desde que chegou trouxe a paz que minha vida precisava, ao mesmo tempo em que trouxe a dose certa de aventura. Obrigada por acreditar em mim, me encorajar, estar ao meu lado e reconstruir meu coração. Seu abraço é meu lar.

Aos colegas do LAFEEEx pelo convívio, ensinamentos e momentos de descontração. Em especial, deixo meu agradecimento à doutoranda Taciane Pejon, não apenas por deixar a rotina densa de laboratório sempre mais leve, mas por toda a aprendizagem na realização deste trabalho, estendendo essa parceria à vida pessoal. Suas considerações são imprescindíveis para a qualidade deste trabalho.

Ao Professor Doutor Victor Fabrício, que com sua experiência e olhar construtivo trouxe inúmeras contribuições e esclareceu muitas dúvidas ao longo do experimento. Agradeço pelas conversas norteadoras e por aceitar estar nesta banca avaliadora.

Às amigas girl power feitas na biologia: Ana Luiza, Laura, Isabela, Luana e os demais que estiveram presentes nesse período acadêmico. Em particular, à minha grande amiga Bruna, companheira inseparável da graduação, por tornar essa jornada muito mais leve, mesmo com os inúmeros desafios, incluindo uma pandemia. Sem a sua presença, apoio e incentivo, nada teria sido igual.

Aos amigos de São Carlos, especialmente Yasmin e Wilson, pela parceria, risadas e música boa durante essa caminhada. Admiro a união de vocês e sou grata por nossos caminhos terem se cruzado.

Aos meus amigos de longa data que sempre compreenderam meus momentos de ausência pela rotina agitada: Nicole, Fernanda, seus pais Silvana e Francisco, que são como uma segunda família para mim. À Ana Paula, pela amizade sincera de tantos anos, que é aquele tipo de amor completamente livre de egoísmo como explicado por Fernando Pessoa. E ao meu amigo Samuel, com quem celebro nossas bodas de prata de amizade. O que o ensino médio uniu, ninguém separa.

A todos os meus professores, técnicos e profissionais que de alguma forma participaram de alguma etapa desta pesquisa, pelos ensinamentos transmitidos.

A todos aqueles que me ajudaram, direta ou indiretamente, tornando esta etapa da minha trajetória mais leve e menos estressante. Obrigada a cada um de vocês.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro concedido.

*Nós não vemos o que vemos, nós vemos o que somos. Só vêem as
belezas do mundo, aqueles que têm belezas dentro de si.*

(Rubem Alves)

RESUMO

Hipoestrogenismo é associado a desequilíbrios no tecido ósseo. A escassez hormonal compromete o remodelamento ósseo e intensifica as chances de fraturas. Nesse cenário, a melatonina tem sido alvo de estudos como um método farmacológico promissor e alternativo a tratamentos com efeitos adversos. Contudo, o osso não é um órgão simples de ser modulado e há inconclusões na literatura sobre o protocolo adequado de oferta hormonal para se observar impactos nas propriedades ósseas. No presente estudo, avaliamos os efeitos da administração crônica de melatonina sob condição de hipoestrogenismo em parâmetros ósseos comumente comprometidos pelo déficit de estrógenos. Foram utilizadas 40 fêmeas Wistar, divididas aleatoriamente em quatro grupos: grupo controle (GC); grupo ovariectomizado (GO); grupo melatonina (GM); e grupo ovariectomizado + melatonina (GOM). GO e GOM foram submetidos à ovariectomia bilateral na 15ª semana de idade para indução do hipoestrogenismo. Uma semana após, iniciou-se a administração diária de melatonina (10 mg/kg) por gavagem orogástrica, durante o período noturno dos animais, ao longo de 12 semanas. Após este período de intervenções, houve a coleta do fêmur e análises do tecido ósseo que compreenderam medidas métricas, físicas, químicas e mecânicas. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão e foram analisados usando ANOVA two-way para comparar os efeitos da ovariectomia (OVX) e da melatonina (MEL), sendo utilizado post-hoc de Newman Keuls com nível de significância de 5%. Os resultados mostram que MEL aumentou o comprimento do osso ($F=10,02$, $p<0,05$), sem efeito da OVX. OVX reduziu densidade óssea ($F=28,76$, $p<0,01$) e densidade mineral ($F=50,34$, $p<0,01$), sem efeito da MEL. OVX aumentou o teor de água no osso ($F=29,58$, $p<0,01$) e reduziu o percentual mineral ($F=36,87$, $p<0,01$), sem efeito de MEL para ambos. No teste de fratura cortical, não houve efeito da OVX na carga máxima e de fratura, enquanto MEL aumentou as duas propriedades ($F=9,93$, $p<0,01$; $F=7,36$, $p<0,05$). Para o conteúdo de cálcio e fósforo, não houve efeito significativo da OVX e MEL. De maneira geral, OVX causou prejuízos em parâmetros ósseos, e MEL teve efeitos benéficos parciais, não sendo eficaz para neutralizar todas as consequências do déficit de estrógenos. Apesar disso, considerando a análise abrangente dos parâmetros investigados, o tratamento hormonal revelou potencial em mitigar a deterioração da qualidade óssea em contextos de desordens osteometabólicas induzidas pelo hipoestrogenismo.

Palavras-chave: Déficit de Estrógenos; Ovariectomia; Densidade Mineral Óssea; Osteopenia; N-acetil-5-metoxitriptamina.

ABSTRACT

Hypoestrogenism is associated with imbalances in bone tissue. Hormonal deficiency compromises bone remodeling and increases the chances of fractures. In this context, melatonin has been studied as a promising pharmacological method and an alternative to treatments with adverse effects. However, bone is not a simple organ to modulate, and there are inconclusive findings in the literature regarding the appropriate hormonal protocol to observe impacts on bone properties. In the present study, we evaluated the effects of chronic melatonin administration under hypoestrogenism conditions on bone parameters commonly compromised by estrogen deficiency. Forty female Wistar rats were randomly divided into four groups: control group (GC); ovariectomized group (GO); melatonin group (GM); and ovariectomized + melatonin group (GOM). GO and GOM underwent bilateral ovariectomy at 15 weeks of age to induce hypoestrogenism. One week later, daily administration of melatonin (10 mg/kg) by orogastric gavage began, during the animals' nighttime period, over 12 weeks. After this intervention period, femurs were collected and bone tissue analyses were conducted, including metric, physical, chemical, and mechanical measurements. Data are presented as mean \pm standard deviation and were analyzed using two-way ANOVA to compare the effects of ovariectomy (OVX) and melatonin (MEL), with Newman-Keuls post-hoc test at a 5% significance level. The results show that MEL increased bone length ($F=10.02$, $p<0.05$), with no effect from OVX. OVX reduced bone density ($F=28.76$, $p<0.01$) and mineral density ($F=50.34$, $p<0.01$), with no effect from MEL. OVX increased bone water content ($F=29.58$, $p<0.01$) and reduced mineral percentage ($F=36.87$, $p<0.01$), with no effect from MEL on both. In the cortical fracture test, OVX had no effect on maximum load and fracture load, while MEL increased both properties ($F=9.93$, $p<0.01$; $F=7.36$, $p<0.05$). For calcium and phosphorus content, there was no significant effect from OVX and MEL. Overall, OVX caused impairments in bone parameters, and MEL had partial beneficial effects, but was not effective in neutralizing all the consequences of estrogen deficiency. Despite this, considering the comprehensive analysis of the investigated parameters, hormonal treatment showed potential in mitigating bone quality deterioration in contexts of osteometabolic disorders induced by hypoestrogenism.

Keywords: Estrogen Deficiency; Ovariectomy; Bone Mineral Density; Osteopenia; N-acetyl-5-methoxytryptamine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Organização hierárquica do tecido ósseo.
- Figura 2 - Mecanismos pelos quais os estrogênios aumentam/preservam a massa óssea.
- Figura 3 - Vias de sinalização da biossíntese de melatonina na pineal de ratos.
- Figura 4 - Mecanismos pelos quais a melatonina regula a remodelação óssea.
- Figura 5 - Desenho experimental.
- Figura 6 - Representação do procedimento cirúrgico de ovariectomia.
- Figura 7 - Etapas do preparo e administração da dose de melatonina.
- Figura 8 - Obtenção dos parâmetros biométricos.
- Figura 9 - Dessecador à vácuo para retirada do ar da porosidade óssea.
- Figura 10 - Obtenção dos parâmetros biofísicos.
- Figura 11 - Forno mufla para incineração do tecido ósseo.
- Figura 12 - Equações para determinação de medidas físicas ósseas.
- Figura 13 - Teste biomecânico.
- Figura 14 - Gráfico de carga por deslocamento (deformação) do osso durante o teste.
- Figura 15 - Variação da massa corporal no decorrer de 12 semanas de intervenções.
- Figura 16 - Evolução das massas corporais dos grupos experimentais.
- Figura 17 - Representação gráfica dos parâmetros biométricos obtidos.
- Figura 18 - Representação gráfica dos parâmetros biofísicos obtidos.
- Figura 19 - Representação gráfica dos parâmetros biomecânicos obtidos.
- Figura 20 - Representação gráfica dos parâmetros bioquímicos obtidos.

LISTA DE SIGLAS

5-HTP - 5-Hidroxitriptofano
AANAT - Serotonina N-acetiltransferase
ALP - Fosfatase Alcalina
AMPc - Adenosina Monofosfato Cíclico
ATP - Adenosina Trifosfato
BMPs - Proteínas Morfogenéticas Ósseas
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DHEA - Dehidroepiandrosterona
DHEAS - Sulfato de Dehidroepiandrosterona
DMO - Densidade Mineral Óssea
DXA - Absorciometria por Raios-X de Dupla Energia
E-ER - Complexo Estrogênio-Receptor de Estrogênio
ER - Receptor de Estrogênio
ER α - Receptor de Estrogênio-alfa
ER β - Receptor de Estrogênio-beta
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GC - Grupo Controle
GH - Hormônio do Crescimento
GM - Grupo Melatonina
GO - Grupo Ovariectomizado
GOM - Grupo Ovariectomizado + Melatonina
GPER - Receptor de Estrógenos Acoplados à Proteína G
HSC - Células-tronco Hematopoiéticas
IFN- γ - Interferon-gamma
IL - Interleucina
IL-1 β - Interleucina-1-beta
IL-6 - Interleucina-6
IL-7 - Interleucina-7
LRP-5 - Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade-5

M-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
MC - Massa Corporal
MEL - Melatonina
MMP-13 - Metaloproteinase da Matriz-13
MPC - Células Progenitoras Mielóides
MSC - Células-Tronco Mesenquimais
MT1 - Receptor de Melatonina Tipo 1
MT2 - Receptor de Melatonina Tipo 2
NAS - N-acetilserotonina
NF- κ B - Fator Nuclear Kappa B
NFATc1 - Fator Nuclear das Células T Ativadas
NSQ - Núcleo Supraquiasmático
OCN - Osteocalcina
OPG - Osteoprotegerina
OVX - Ovariectomia
PIBIC - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
PKA - Proteína Quinase A
PTH - Hormônio Paratireóide
PX - Pinealectomia
RANK - Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
RANKL - Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
RBBP1 - Proteína de Ligação ao Retinoblastoma-1
SHBG - Globulina Ligadora de Hormônio Sexual
THR - Terapia de Reposição Hormonal
TNF - Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2. OBJETIVO	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Composição e propriedades do tecido ósseo	20
3.2 Biossíntese de estrógenos e mecanismos de ação	23
3.3 Biossíntese da melatonina e vias de ação no tecido ósseo	27
4. METODOLOGIA	31
4.1 Amostras e condições ambientais	31
4.2 Desenho experimental	31
4.3 Procedimento cirúrgico de ovariectomia bilateral	32
4.4 Administração de melatonina	33
4.5 Obtenção e armazenamento do material biológico	34
4.6 Análises do tecido ósseo	34
4.6.1 Análises biométricas	34
4.6.2 Análises biofísicas	35
4.6.3 Análises biomecânicas	37
4.6.4 Análises bioquímicas	39
4.7 Análises estatísticas	39
5. RESULTADOS	39
5.1 Massa corporal	39
5.2 Parâmetros biométricos	41
5.3 Parâmetros biofísicos	41
5.4 Parâmetros biomecânicos	43
5.5 Parâmetros bioquímicos	44
6. DISCUSSÃO	44
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	65

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Estrógeno é um termo que designa um conjunto de três classes de hormônios esteroides sexuais femininos, o 17β -estradiol e seus metabólitos estrona e estriol, derivados do colesterol por uma série de reações enzimáticas (GOODMAN, 2009; GUYTON e HALL, 2011). O estrogênio, juntamente com a progesterona, outro esteróide ovariano, regula todos os aspectos da reprodução feminina, do comportamento sexual à gestação e à lactação (DEMAYO et al., 2002). Os ovários são as principais glândulas a produzirem estrógenos, mas a síntese também ocorre em menor quantidade em tecidos extragonadais como nas glândulas adrenais. Entre as classes supracitadas, o estradiol é o mais ativo na mulher durante a idade reprodutiva, atuando principalmente no controle do crescimento e desenvolvimento de suas características sexuais (PORCARI; BRYANT; COMANA, 2015). A estrona, por sua vez, predomina com o término da funcionalidade reprodutiva dos ovários, ao passo que o estriol é produzido em elevadas quantidades durante a gravidez (GOODMAN, 2009). Após a síntese, o estrógeno tem seu transporte plasmático realizado pela globulina de ligação aos hormônios sexuais (SHBG) até às células-alvo que não se restringem apenas aos órgãos reprodutivos (HAMMOND, 2011), mas diversos outros tecidos devido a ampla distribuição de seus receptores (MELMED, 2016; ARNAL et al., 2017).

Em um modelo clássico de ação genômica, o hormônio se liga aos seus receptores estrogênicos nucleares que podem ser divididos em subtipos alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$), promovendo resposta celular a depender da especificidade do receptor. O complexo estrogênio-receptor de estrogênio (E-ER) move-se para o núcleo e pode recrutar fatores que então alteram a transcrição do DNA (LARA-CASTILLO, 2021). Em circunstâncias que exigem respostas imediatas, os estrógenos também atuam por efeito não genômico a partir da ligação em receptores de estrógenos acoplados à proteína G (GPER) na membrana e ativa mecanismos de sinalização a jusante (FUENTES; SILVEYRA, 2019). No que se refere às ERs nucleares, estes exibem ações como fatores de transcrição, ativando ou reprimindo genes-alvo (STILLWELL, 2016), de modo que sua expressão determina como as células respondem ao hormônio, variando conforme o tecido em que se encontram (MELMED, 2016). O $ER\alpha$ é presente nos órgãos reprodutivos femininos (ovários e útero) e masculinos (testículos e epidídimo), na glândula mamária, nas células do tecido ósseo, muscular esquelético, hepático e adiposo. Por outro lado, o $ER\beta$ está no cólon, também no ovário e osso, bexiga, próstata e células adiposas (PATERNI et al., 2014). Diante da ampla distribuição dos ERs, pode-se assimilar como os estrógenos desempenham diversas ações no organismo.

Dessa forma, embora sejam sobretudo reconhecidos pelas suas funções reprodutivas, estuda-se há anos seus benefícios em outras áreas do corpo.

De acordo com Medina-Contreras et al. (2020), os estrógenos apresentam importante papel na manutenção do metabolismo glicolítico, assim como sobre o perfil lipídico, regulando a distribuição da gordura corporal. No tecido muscular, o hormônio favorece a manutenção do tamanho e quantidade das fibras musculares (ENNS; TIIDUS, 2010) e está relacionado com os conteúdos de proteínas transportadoras responsáveis pela captação de glicose e ácidos graxos, GLUT4 e FAT CD36, respectivamente (PEJON, 2020), influenciando na saúde metabólica. Outro importante alvo desse hormônio é o tecido ósseo, no qual o estrógeno opera em sua homeostase por inúmeras vias, sendo capaz de inibir a ativação da remodelação e reabsorção óssea, estimulando a diferenciação dos osteoblastos e controlando a formação e apoptose dos osteoclastos (FAIENZA et al., 2013). A remodelação óssea é um processo fisiológico contínuo e dinâmico que, de acordo com as demandas metabólicas, objetiva a renovação óssea de todo o esqueleto a partir de atividades coordenadas entre os osteoclastos e osteoblastos, células responsáveis pela reabsorção e síntese óssea respectivamente. As etapas desse mecanismo compreendem inicialmente sinais bioquímicos que impulsionam o processo de diferenciação das células em osteoclastos. Em seguida, os osteoclastos se posicionam em determinados locais do tecido ósseo em que células ósseas mais velhas, cristalizadas e sujeitas a fratura devem ser retiradas. Após a remoção, as regiões são preenchidas por osteoblastos que sintetizam a matriz óssea e a torna mineralizada, um processo que se estende por ao menos 3 meses. Nessas células, $ER\alpha$ e $ER\beta$ são extensamente expressados, o que favorece a atuação do estrógeno em inibir a reabsorção óssea excessiva (VILAR, 2016).

Esse mecanismo inibitório acontece porque o estrógeno interrompe a ação do fator nuclear kappa B ($NF-\kappa B$), um complexo proteico controlador da transcrição do DNA que estimula a diferenciação das células em osteoclastos. Por outro lado, provoca a produção de osteoprotegerina (OPG) pelos osteoblastos, também conhecido como fator de inibição da osteoclastogênese que, nesse processo, regula a interação entre o receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) e seu ligante (RANKL), moléculas envolvidas na maturação dos osteoclastos, agindo como um receptor de RANKL, de modo a realizar sua captura. Consequentemente, é impedido a interação entre o RANKL e o RANK, resultando na inativação da via de maturação dos osteoclastos. Dessa forma, de maneira cíclica, no momento em que a OPG reduz sua concentração e deixa de competir pelo RANKL em respostas às demandas metabólicas, ocorre a fosforilação do $NF-\kappa B$ e o mecanismo de ação

osteoclástica é retomado. Em resumo, com a expressão hormonal do estrogênio no tecido, há indução no aumento da produção osteoblástica de OPG, uma citocina anti-inflamatória que inibe a formação e a atividade das células osteoclásticas (GOODMAN, 2009; VILAR, 2016).

Após abordar algumas das inúmeras participações sistêmicas dos estrogênios, em condição adversa de déficit hormonal, as consequências fisiológicas se tornam preocupantes e relevantes de serem investigadas porque, independente da circunstância causadora (natural ou induzida), é comum o surgimento de desequilíbrios no metabolismo. Em particular ao tecido ósseo, a falta de estrogênios altera a expressão dos genes alvo do hormônio, intensificando a resposta inflamatória a partir da secreção aumentada do fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL-1/2/6/7), resultando na formação de osteoclastos. Assim, o hipoestrogenismo contribui na perda tecidual, caracterizada por constante reabsorção de minerais de cálcio (Ca) e fósforo (P) que são direcionados à corrente sanguínea (CUNHA et al., 2010; GUYTON e HALL, 2011). Nessa condição, a reabsorção passa a superar a formação óssea, o que resulta no mecanismo de remodelação óssea prejudicado e na densidade mineral óssea (DMO) reduzida. Com a redução da DMO, todo o esqueleto se torna mais frágil, comprometendo a integridade das suas funções e intensificando a predisposição às fraturas e morbidades (LEWIECKI; BORGES, 2006). Dessa forma, tem-se conjunturas propensas ao surgimento de doenças osteometabólicas como um quadro de osteopenia que pode evoluir à osteoporose (GUYTON e HALL, 2011; MELMED, 2016; TU et al., 2018). Essas conjunturas são alterações ósseas em consequência do desequilíbrio na microestrutura óssea que podem ser avaliadas ao se mensurar certas propriedades do tecido ósseo, as quais podem ser severas o suficiente para levar às enfermidades ósseas.

Para prevenir ou tratar as mudanças na biologia estrutural, molecular e funcional do osso que predispõem às doenças ósseas, numerosos estudos se direcionam à tentativa de identificar abordagens eficientes. Entre elas, a mais comum busca inibir a atividade osteoclástica, possibilitando maior atuação das células osteoblásticas (BAO et al., 2019). Nessas circunstâncias, visando uma melhor qualidade de vida, a terapia de reposição hormonal (TRH) do estrogênio é frequentemente empregada e recomendada para indivíduos saudáveis (SANTOS et al., 2014). De fato, diversas linhas de estudo evidenciam a redução do excesso de reabsorção e o aumento da proteção da massa óssea a partir da TRH, melhorando a sensibilidade do osso à carga mecânica e sua resistência às fraturas. No entanto, apesar dos resultados positivos, são inúmeros os efeitos colaterais em função da dinâmica de administração do hormônio e seu uso a longo prazo em indivíduos com predisposição genética para condições adversas associadas ao tratamento hormonal (CHEN; KO; CHEN,

2019; GUO et al., 2020). Para essas pessoas, a TRH está associada a uma elevada incidência de trombose venosa profunda (MILLER et al., 2006) e ainda há muita discussão sobre sua relação com casos de acidente vascular encefálico (IORGA et al., 2017). Além disso, sua combinação com progesterona, outro hormônio ovariano, relaciona-se a um maior risco de câncer de endométrio e de mama (KERLIKOWSKE, 2010; SUN et al., 2017). Dessa maneira, ao considerar o potencial efeito prejudicial do hipoestrogenismo sobre o tecido ósseo, é certamente válida a busca por método alternativo à TRH, no qual os efeitos colaterais sejam diminutos e haja grande potencial benéfico.

Atualmente, a literatura apresenta estudos que procuram outros caminhos às intervenções convencionais tanto para a prevenção, quanto para o tratamento do prejuízo hormonal do déficit de estrogênio sobre a saúde do tecido ósseo. Entre eles, a melatonina (MEL) exógena tem recebido considerável atenção na literatura médica e parece ser bastante promissora (BAO et al., 2019; LI et al., 2019). Sabe-se que o hormônio não-esteroidal, secretado majoritariamente pela glândula pineal durante o período de escuro, atua principalmente na regulação do ciclo circadiano (REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010) e possui relevante ação antioxidante e anti-inflamatória (REITER, 2000; CARRASCAL et al., 2018). Seus receptores (MT1 e MT2), tem ampla distribuição e sua expressão resulta em diferentes respostas fisiológicas (SLOMINSKI et al., 2012). Diante disso, os estudos com a melatonina se difundiram em outras áreas. Pesquisas mais recentes com modelo animal investigaram seus benefícios também como agente ergogênico ao exercício físico (BECK et al., 2015; BECK, SCARIOT, GOBATTO et al., 2016) e apontam suas ações positivas na performance aeróbia (BECK et al., 2018) e na recuperação metabólica pós esforço físico (FARIA et al., 2021A; FARIA et al., 2021B; FARIA et al., 2024). Além disso, na imensa maioria das pesquisas envolvendo sua administração, tanto em modelo animal quanto em humano, quase não há demonstrativos de efeitos adversos graves, não sendo identificados sinais de toxicidade mesmo em doses elevadas (LIU; HUANG; HE, 2013). Dessa forma, o hormônio também se torna alvo de estudos como uma possível terapia alternativa para contribuir com a melhora da saúde do sistema esquelético e evitar fisiopatologias ósseas.

O interesse em se estudar a ação da melatonina no tecido ósseo tem sido impulsionado por estudos que sugerem a produção do hormônio em muitos outros tecidos do corpo além da glândula pineal, sendo a medula óssea um importante sintetizador (WANG et al., 2019; CHEN et al., 2019). Outro aspecto é que a produção de melatonina pela medula óssea supera a quantidade encontrada em circulação durante o período noturno (TAN et al., 1999), o que pode indicar uma grande atuação do hormônio no tecido ósseo local. Uma das

funções no osso é a redução de processos inflamatórios. A melatonina, semelhante aos estrógenos, tem papel importante em inibir a ativação exacerbada do NF- κ B que, além de estimular a diferenciação de osteoclastos, regula centenas de genes envolvidos em diversos outros processos fisiológicos celulares e sinaliza para o aumento de processos inflamatórios. Além disso, a melatonina atua na remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs), visto que o aumento da reabsorção óssea e a baixa massa óssea culminam em estresse oxidativo, uma comum etiopatogenia de doenças degenerativas caso radicais livres não sejam combatidos (VILAR et al., 2016). No caso da regulação óssea, alguns estudos têm mostrado que o hormônio pode ser uma relevante ferramenta farmacológica porque demonstra ser capaz de aumentar a densidade mineral óssea (SHARAN et al., 2017; MARIA et al., 2018; LU et al., 2021).

Segundo Li et al. (2018), MT2 é amplamente encontrado nas células osteoblásticas e osteoclásticas do tecido ósseo, indicando que a melatonina atua nas principais vias de sinalização envolvidas na remodelação óssea. Ainda, considerando a capacidade antioxidante do hormônio, a melatonina pode atuar no tecido ósseo de maneira independente do seu receptor por meio da eliminação de radicais livres produzidos pelos osteoclastos durante o processo de reabsorção óssea (LU et al., 2021), exercendo a proteção das células ósseas contra ataques oxidativos que contribuem para o processo de degradação óssea. Quanto à propriedade anti-inflamatória da melatonina, esta pode ser identificada principalmente a partir da sua ação inibitória na produção de citocinas pró-inflamatórias que promovem maior atividade dos osteoclastos, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina 1 beta (IL-1 β), suprimindo seus efeitos nos aspectos estruturais do tecido ósseo que levam à osteólise (XU et al., 2018). Ademais, o hormônio também estimula a síntese de citocinas anti-inflamatórias como a OPG que, conforme supracitado, tem grande importância no processo de reparo do tecido (MARIA et al., 2018).

Entretanto, há diferentes afirmações em relação às ações da melatonina nas atividades osteoclásticas e osteoblásticas envolvidas no metabolismo ósseo. No geral, há evidências substanciais de que a melatonina pode atuar de forma benéfica nos ossos (ORYAN; MONAZZAH; BIGHAM- SADEGH, 2018), mas existem estudos, como o de Histing et al. (2012), que apontam a ação da melatonina como um hormônio capaz de inibir a reabsorção óssea, mas sem exercer qualquer efeito na cicatrização óssea diante do período de estudo que compreendeu um intervalo de 2 a 5 semanas. Porém, muitas vezes esses conflitos acontecem em decorrência da forma de administração da melatonina, da quantidade da dose e do tempo de duração da oferta. Além disso, é necessário considerar que o osso, ainda que se mantenha

em constante modificação, é um tecido rígido e, conseqüentemente, sua modulação não é simples, fazendo com que a literatura apresente respostas inconclusivas e divergentes acerca do tempo mínimo de duração do protocolo para se observar efeitos positivos nas propriedades ósseas.

Xu et al. (2018) reporta que o tratamento com a indolamina reduz a reabsorção óssea inadequada induzida pelo hipoestrogenismo e inativa vias de maturação de citocinas pró-inflamatórias envolvidas no estresse oxidativo, enquanto que Kotlarczyk et al. (2012) relata que, durante um período de 6 meses de administração do hormônio, não foi verificado nenhuma mudança significativa na DMO, apesar de identificado uma menor proporção entre os marcadores de reabsorção óssea e de formação óssea, indicando influência da melatonina no microambiente ósseo. No entanto, a dose de 3 mg/dia de melatonina utilizada no estudo pode não ter sido suficiente para alcançar resultados significativos, apesar da duração prolongada da intervenção. Diante das respostas inconclusivas sobre o uso da melatonina na prevenção de perda óssea, especialmente considerando que mudanças significativas em variáveis ósseas podem exigir estudos mais extensos com diferentes concentrações hormonais, torna-se relevante investigar se a melatonina pode neutralizar os efeitos adversos do déficit de estrógenos na saúde óssea. Sendo assim, este estudo investigou os efeitos da melatonina sobre parâmetros do tecido ósseo comumente comprometidos pelo hipoestrogenismo. Espera-se que a administração crônica de melatonina previna alterações dos parâmetros ósseos, mantendo a homeostase do tecido e auxiliando na prevenção de doenças ósseas, apesar da condição adversa de déficit de estrógenos.

2. OBJETIVO

Investigar o efeito da administração crônica de melatonina sobre parâmetros biométricos, biofísicos, bioquímicos e biomecânicos do tecido ósseo de ratas sob condição de hipoestrogenismo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Composição e propriedades do tecido ósseo

O tecido ósseo desempenha funções vitais que vão além da sustentação do corpo e proteção dos órgãos internos. Ele também aloja e protege a medula óssea que produz as células sanguíneas; proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis; constitui um sistema de alavancas que amplia as forças

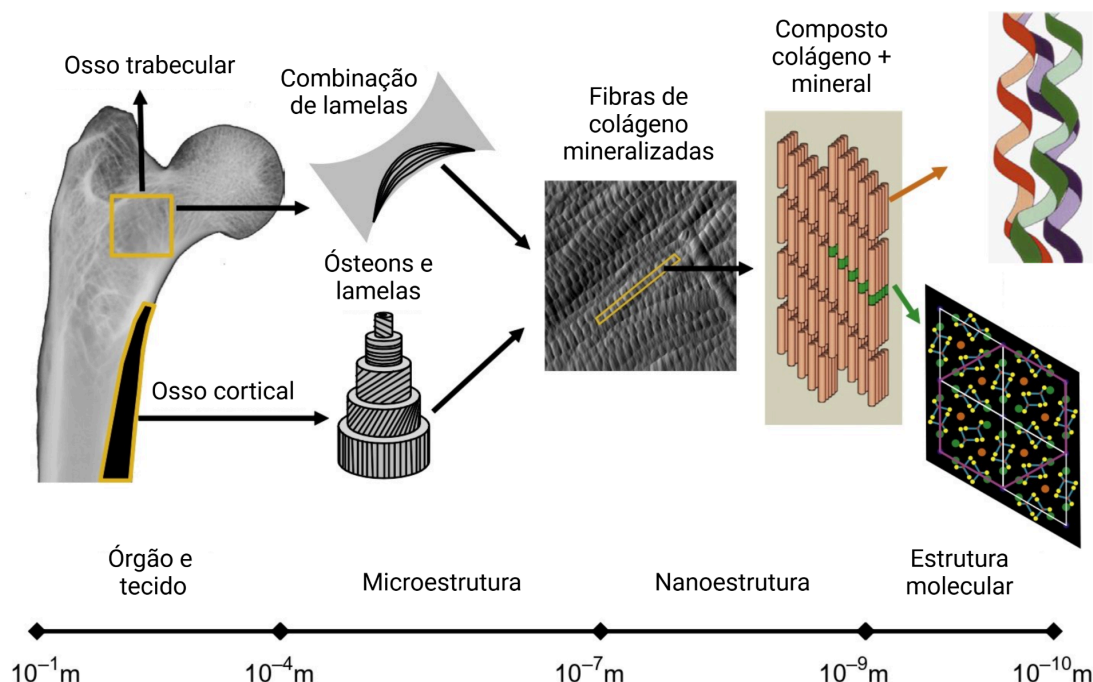
geradas na contração muscular; e contribui para a manutenção da homeostase metabólica mineral. Isso porque a matriz óssea extracelular atua como reserva de componentes inorgânicos, uma vez que sua fase mineral corresponde a cerca de 60 a 70% de sua composição. O componente mineral mais predominante do tecido ósseo é o cálcio que, juntamente com o fosfato e carbonato, apresentam-se em sua forma cristalina como hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO)_6(OH)_2]$. Outros elementos minerais estão presentes em quantidades reduzidas, como magnésio, sódio, potássio, manganês e flúor. Esse reservatório extracelular confere aos ossos a capacidade de controlar o metabolismo de íons e regular os níveis sanguíneos desses minerais. Além da fase mineral, há a matriz extracelular orgânica, a qual é composta predominantemente por fibras de colágeno tipo I que, associadas à hidroxiapatita, promovem a dureza e resistência do tecido ósseo. Há também elementos não-colagenosos, como proteoglicanos e glicoproteínas, a exemplo da osteocalcina (OCN) e osteonectina que participam da mineralização da matriz, bem como as células do tecido ósseo, responsáveis pelo mecanismo contínuo de formação e reabsorção óssea.

Além dos osteoblastos e osteoclastos, células mais envolvidas na remodelação óssea e abordadas na introdução deste trabalho, há outros dois grupos celulares entre os componentes microestruturais do tecido ósseo: as células osteoprogenitoras e os osteócitos. As células osteoprogenitoras são células-tronco mesenquimais encontradas nas superfícies internas e externas dos ossos, capazes de se proliferar e se diferenciar em osteoblastos conforme as demandas metabólicas. Por outro lado, os osteócitos são osteoblastos diferenciados aprisionados na matriz calcificada e interconectados por longos filamentos, formando uma rede de comunicação que traduz e transmite sinais bioquímicos em resposta às forças mecânicas aplicadas ao osso. Diferente dos osteoblastos, as células osteoclásticas derivam de células-tronco hematopoiéticas progenitoras dos monócitos, os quais migram da medula óssea pelos vasos sanguíneos até regiões alvo do tecido ósseo e se diferenciam sob a influência de fatores de crescimento e citocinas específicas (BOLAMPERTI, VILLA, RUBINACCI, 2022).

Na macroescala, as estruturas ósseas podem ser categorizadas quanto a sua morfologia como osso longo (como o fêmur), curtos (como as vértebras) ou chatos (como o crânio). Nessa classificação, é possível identificar visualmente dois tecidos bem distintos: o cortical e esponjoso, cujas proporções variam de acordo com a região do esqueleto. O osso cortical é sempre predominante e constitui cerca de 80% do esqueleto. Trata-se de um tecido denso, compacto e rígido que compreende a maior parte da massa óssea e forma a camada mais externa dos ossos e o corpo daqueles longos, assumindo a maior parte do papel de

suporte de carga (BURR, 2019). Suas unidades estruturais incluem a matriz intersticial, a qual tem alto índice de minerais, linha de crescimento, ósteons e o Sistema Haversiano. Os ósteons atuam como fibras de alta rigidez, sendo compostos de lamelas concêntricas embebidas na matriz óssea que circundam os capilares sanguíneos, vasos linfáticos e nervos que se ramificam do canal central Haversiano (Figura 1).

Figura 1 - Organização hierárquica do tecido ósseo.



Adaptado de BURR, 2019. No nível macroscópico, é composto por uma camada externa de osso cortical denso e uma parte interna de osso esponjoso. No nível microscópico, o osso cortical é formado por osteons, que contêm um canal central com vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos, cercados por lamelas concêntricas. O osso trabecular também é lamelar. No nível nanoscópico, o osso é uma combinação de fibras de colágeno e placas minerais. As fibrilas são formadas por uma hélice tripla de cadeias de colágeno.

O osso esponjoso, correspondendo a cerca de 20% do esqueleto, é caracterizado por sua alta porosidade e é encontrado nas extremidades dos ossos longos e nos corpos dos ossos curtos. Diferencia-se do osso cortical pela disposição espacial aleatória da substância óssea, formando numerosas trabéculas delgadas interconectadas com espaços preenchidos por medula óssea. Embora também suporte carga, uma das funções do tecido esponjoso é redirecionar as tensões para a camada mais forte cortical (BURR, 2019). Devido à sua alta porosidade, que varia de 30% a 90%, possui área de contato maior e, conseqüentemente, uma taxa metabólica mais elevada em comparação com o osso cortical. Por essa razão, é um tecido inicialmente afetado em desequilíbrios minerais, sendo perdido mais rapidamente em condições que afetam a saúde óssea. No entanto, apresenta maior resiliência e capacidade de

absorção de impactos mecânicos, permitindo melhor adaptação e suportando alongamentos e deformações antes da fratura.

À medida que a vida progride, o tecido ósseo passa por mudanças fisiológicas contínuas devido ao equilíbrio dinâmico entre formação e reabsorção óssea. Durante o crescimento do esqueleto, a formação óssea excede a reabsorção, até que ocorra uma inversão desse processo. Na espécie humana, o ápice de desenvolvimento ósseo ocorre por volta dos 30 anos, com estabilização até cerca dos 40 anos e, posteriormente, uma prevalência progressiva do balanço ósseo negativo. Em modelo animal, estudos em ratas Wistar, como o conduzido por Kalu et al. (1989), revelou que animais com dietas regulares apresentaram rápido aumento na densidade e conteúdo de cálcio nos fêmures até os 3 meses de idade. Após esse período, observa-se um crescimento mais gradual nos parâmetros ósseos até os 6 meses de idade, seguido de estabilização, sem alterações significativas nos meses subsequentes. Já em animais com 1 ano de idade ou mais, tornaram-se evidentes e progressivos os comprometimentos das condições biológicas estruturais, moleculares e funcionais dos ossos.

Além do avanço natural da idade, o metabolismo do tecido ósseo pode ser influenciado por diversas outras condições que podem afetar o indivíduo de formas variadas, como ingestão insuficiente de cálcio e proteínas, forças mecânicas aplicadas ao esqueleto, fatores genéticos e hereditários, fatores de crescimento, hábitos de vida, doenças intercorrentes e hormônios circulantes (MAO et al., 2021). Entre esses hormônios, destacam-se o estrógeno, conforme previamente abordado, a testosterona, a calcitonina, o hormônio paratireoide (PTH) e a vitamina D. O PTH e a calcitonina exercem efeitos antagônicos no metabolismo do cálcio no tecido ósseo. Sintetizado em resposta a baixos níveis plasmáticos de cálcio, o PTH ativa receptores osteoblásticos e desencadeia ações parácrinas sobre os osteoclastos e seus precursores, estimulando a osteólise para equilibrar os níveis sanguíneos. Por outro lado, a calcitonina, sintetizada pela glândula tireóide em resposta ao aumento dos níveis extracelulares de cálcio, reduz a atividade dos osteoclastos e, conseqüentemente, a concentração plasmática do íon. Dessa forma, a calcitonina promove a formação óssea, protegendo o corpo contra a hipercalcemia, enquanto o PTH regula a reabsorção óssea, protegendo contra a hipocalcemia. Esses mecanismos exemplificam como o osso é um tecido em constante remodelação regulada por diversos parâmetros.

3.2 Biossíntese de estrógenos e mecanismos de ação

Os esteroides são compostos orgânicos que possuem uma estrutura básica de quatro anéis, sendo três anéis de seis carbonos (ciclohexanos) e um anel de cinco carbonos

(ciclopentano), formando um núcleo chamado de ciclopentanoperhidrofenantreno, ou simplesmente esterano. Com base em suas propriedades e funções biológicas, os esteróides são classificados em quatro principais grupos: estrogênios (estradiol, estrona e estriol), androgênios (testosterona e dihidrotestosterona), corticosteróides (cortisol, androstenediona e aldosterona) e progestogênios (progesterona). A biossíntese de todos os hormônios esteróides tem início com a conversão do acetato em colesterol. Posteriormente, o colesterol é transformado em pregnenolona, que serve como o composto precursor comum na síntese esteroidal, independentemente do hormônio produzido ao final. Ao lado da pregnenolona, forma-se também progesterona, mas é a partir da pregnenolona que ocorre sua maior síntese, sendo considerada um metabólito intermediário com seus próprios efeitos biológicos (HALBE, 1965). Dessa forma, a pregnenolona pode seguir duas vias distintas: ser metabolizada em progesterona e, na sequência, em androstenediona, ou ser metabolizada em dehidroepiandrosterona (DHEA) e, depois, em androstenediona. Nas gônadas e na placenta, a progesterona é preferencialmente o ponto de partida para a via principal que leva à formação de estrogênios e androgênios, mas há também uma via de alternância a partir do DHEA. Por outro lado, nas glândulas adrenais, a progesterona inicia a via de biossíntese dos hormônios corticosteróides. No entanto, em menor quantidade há a formação de androgênios e estrogênios nas adrenais, sendo o primeiro passo da via metabólica a conversão de pregnenolona em DHEA.

Na degradação da cadeia lateral da progesterona, nas gônadas e na placenta, ocorre a formação da androstenediona e, sequencialmente, do potente andrógeno testosterona, que também pode ser derivado diretamente. Nas adrenais, seguindo um mecanismo semelhante, o DHEA provém da pregnenolona por quebra da cadeia lateral e sua conversão para estrogênios ocorre através da androstenediona. A enzima responsável pela conversão da androstenediona em testosterona também pode agir diretamente no DHEA para produzir testosterona. Este mesmo mecanismo também é observado na conversão da DHEA em androstenediona. Na próxima fase da síntese, tanto a androstenediona quanto a testosterona podem ser convertidas diretamente em estrona ou 17β -estradiol pela ação da enzima aromatase (MOHAMAD, SOELAIMAN, CHIN, 2016). Assim, os estrogênios representam a última etapa da biossíntese hormonal, com a progesterona, DHEA, androstenediona e testosterona atuando como compostos intermediários biologicamente ativos. Em resumo, os órgãos secretores dos hormônios sexuais têm essencialmente as mesmas vias de síntese: a via progesterona-androstenediona, predominante nas gônadas e na placenta, e a via pregnenolona-DHEA, que ocorre nas adrenais (HALBE, 1965). No entanto, diferem

quantitativamente, uma vez que a quantidade de estrogênios secretada pelos córtices adrenais é pouco relevante quando comparada à produzida pelos ovários.

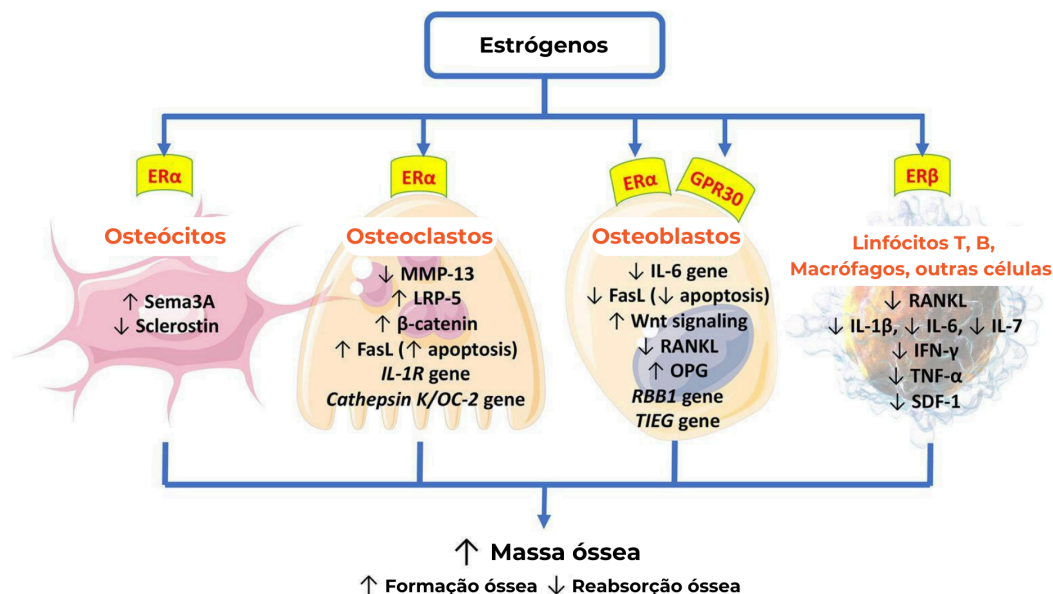
Entre os três hormônios (estradiol, estrona e estriol) que constituem a classe estrogênio, o estradiol é o principal produto da síntese nos ovários e a forma mais ativa, enquanto a estrona e o estriol são ligantes mais fracos. Estudos recentes mostram que o 17 β -estradiol é sintetizado em outros tecidos periféricos, contribuindo para uma variedade de processos fisiológicos locais, principalmente nas respostas inflamatórias. Além das adrenais, sítios extragonadais que produzem o hormônio ovariano incluem o tecido adiposo (HETEMÄKI et al., 2021; KATZER et al., 2021; PEJON et al., 2024), a pele (NELSON, BULUN, 2001) e órgãos linfóides secundários (OAKLEY et al., 2016). Outro aspecto relevante envolvendo a biossíntese extragonadal de estrogênio é que muitos tecidos também podem captar e converter moléculas precursoras presentes na circulação, como a androstenediona, sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) e DHEA, disponíveis para conversão em testosterona e, assim, em estrogênios, bem como sulfato de estrona e estrona, que servirão de estoque para a conversão a estradiol (SIMPSON, 2003). Isso mostra como níveis séricos de precursores se tornam importantes como fonte de substrato adequado para a produção hormonal em numerosos tecidos periféricos.

Entretanto, o metabolismo desses precursores é altamente específico de cada tecido e depende fortemente da distribuição e do perfil enzimático presente no local. Isso ressalta que apenas saber as concentrações circulantes de estrógenos e precursores não é indicativo preciso sobre a disponibilidade desses hormônios em tecidos fora das gônadas (NELSON, BULUN, 2001). Em células osteoblásticas, pesquisadores identificaram atividade tanto da aromatase quanto de uma outra forma enzimática que permite a produção local de estradiol (GENNARI, MERLOTTI, NUTI, 2011). Porém, outros estudos não demonstraram a presença da aromatase no tecido ósseo do colo femoral, o que evidencia que ainda há algumas incertezas sobre a expressão dessas enzimas em localidades do osso (LEA et al., 1997). Além disso, ainda envolvendo as concentrações circulantes dos hormônios, sabe-se que os níveis sanguíneos de testosterona e precursores diminuem acentuadamente com o declínio da função ovariana, mas superam os níveis de estrogênios séricos. A partir da diminuição da atividade dos ovários, é estimado que mais de 70% do total de andrógenos passam a ser sintetizados nos tecidos periféricos, ao passo que nos homens isso representa cerca de 30-40%. Esse contraste, na verdade, é ainda maior ao se considerar a suficiência ininterrupta de testosterona em circulação ao longo de toda a vida dos homens. Esse cenário expõe como os andrógenos desempenham um papel importante na manutenção dos níveis de estrogênio em tecidos

extragonadais e se insere entre as justificativas dos porquês de as fisiopatologias ósseas afetarem mais as mulheres em comparação aos homens.

O mecanismo funcional dos estrógenos sobre a massa óssea é principalmente indireto, atuando na linhagem osteoclástica com efeitos anti-reabsortivos. Os osteoclastos surgem pela proliferação controlada por citocinas e pela proliferação e diferenciação de precursores de monócitos que circulam dentro do conjunto de células hematopoiéticas da medula óssea (TEITELBAUM, 2000). A ação indireta dos estrógenos nos osteoclastos se deve à sua capacidade de inibir citocinas pró-inflamatórias (como IL-1/2/6/7, TNF e OPG) que, quando presentes, promovem maior atividade de reabsorção óssea. Outras citocinas essenciais para a formação da linhagem osteoclástica são o fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) e o RANKL, membro da superfamília TNF, abordado na introdução deste trabalho. M-CSF estimula a proliferação e diferenciação dos precursores de osteoclastos, que expressam o receptor RANK em sua superfície. Na deficiência de estrogênio, a ação basal de RANKL e M-CSF é intensificada justamente em razão da ação das citocinas citadas acima em níveis aumentados, as quais potencializam a formação e ativação dos osteoclastos e prolongam sua vida útil (PFEILSCHIFTER et al., 2002). Além disso, os efeitos dos estrogênios sobre os osteoclastos são mediados através de efeitos relacionados ao RE pelos osteoblastos com estímulo à produção de OPG (citocina com afinidade ao RANKL e efeito inibitório sobre ele), células T e células B (ANAGNOSTIS et al., 2022). Também, conforme demonstrado por Liedert et al. (2020), envolvem vias que interagem de maneira coordenada nesse processo de remodelação óssea como a cascata de sinalização Wnt/ β -catenina (Figura 2).

Figura 2 - Mecanismos pelos quais os estrogênios aumentam/preservam a massa óssea.



Adaptado de ANAGNOSTIS et al., 2022. Os estrogênios exercem diversos efeitos sobre a massa óssea através de múltiplos mecanismos que envolvem seus receptores clássicos de membrana e nucleares e interações com citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, proteínas e fatores relacionados ao metabolismo ósseo. Os receptores de estrogênio ERα (receptor de estrogênio-alfa) e ERβ (receptor de estrogênio-beta) desempenham papéis importantes na regulação de genes específicos em resposta ao estrogênio. O ligante Fas (FasL) está envolvido na regulação da apoptose celular, enquanto o receptor acoplado à proteína G-30 (GPR-30) media efeitos não genômicos rápidos dos estrogênios, contribuindo para a sinalização celular. Citocinas como a interleucina-1-beta (IL-1β), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-7 (IL-7) aumentam a reabsorção óssea ao estimular os osteoclastos. O interferon-gama (IFN-γ) também tem um papel complexo na modulação da atividade osteoclástica e osteoblástica. A proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade-5 (LRP-5) é importante na via de sinalização Wnt, essencial para a formação e função dos osteoblastos. A metaloproteinase da matriz-13 (MMP-13) degrada a matriz óssea, facilitando a reabsorção. A osteoprotegerina (OPG) se liga ao ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL), impedindo sua interação com RANK e inibindo a reabsorção óssea. A proteína de ligação ao retinoblastoma-1 (RBBP1) está envolvida na regulação da transcrição gênica e na modulação da atividade celular. O fator derivado do estroma-1 (SDF1) influencia a mobilização de células e a remodelação óssea, enquanto a semaforina 3A (Sema3A) regula a função e a sobrevivência dos osteoblastos. O gene-1 induzido precocemente pelo TGF-β (TIEG) é importante na regulação da formação óssea. O fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) promove a formação e ativação dos osteoclastos, aumentando a reabsorção óssea.

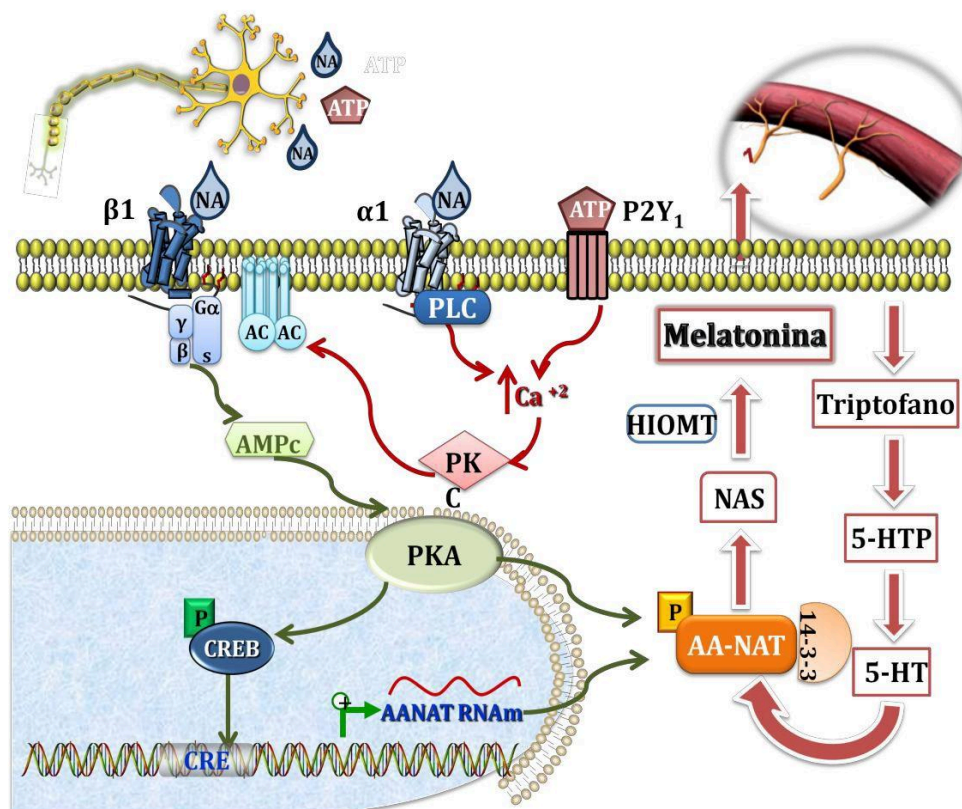
3.3 Biossíntese da melatonina e vias de ação no tecido ósseo

A glândula pineal ocupa a região central do encéfalo, localizada à frente do cerebelo e na porção pósterio-dorsal do diencéfalo, é a principal responsável pela secreção de melatonina, um importante agente cronobiológico. Esse processo é regulado por transduções elétricas transmitidas do núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo até a pineal. As células especializadas da pineal, chamadas pinealócitos, são responsáveis pela síntese e liberação da melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) na ausência de luz. Com o escuro, os neurônios pós-ganglionares simpáticos liberam noradrenalina que interage com seus receptores β1-adrenérgicos e α1-adrenérgicos presentes na membrana dos pinealócitos. Esses receptores, por sua vez, ativam cascatas de eventos intracelulares, as quais se iniciam com a captação do aminoácido triptofano da circulação sanguínea e da sua conversão em

5-hidroxitriptofano (5-HTP) na matriz mitocondrial. No citosol, 5-HTP é convertido em serotonina, que é então acetilada para formar N-acetilserotonina (NAS). Finalmente, NAS é metilada para produzir melatonina, que é então liberada para o sistema vascular (Figura 3). Sendo assim, a síntese hormonal da melatonina é diretamente influenciada pela condição de luz percebida. A inexistência de um estímulo luminoso é sinalizada pelos NSQ, orientando o organismo quanto às alternâncias de luminosidade (dia ou noite) e, assim, modulando o metabolismo de diversos processos fisiológicos, incluindo a produção diária de outros hormônios (BECK, 2015A).

O complexo microambiente da medula óssea, onde ocorre a hematopoiese, está entre os ambientes fisiológicos regulados pelos ritmos biológicos pela ação da melatonina. Estudos identificaram que a melatonina em circulação sanguínea pode atuar diretamente nas células-tronco hematopoiéticas (HSC) e células progenitoras mielóides (MPC) derivadas, prevenindo sua apoptose e regulando sua migração para o sangue periférico de acordo com ciclos externos de início diário de claro e escuro (GOLAN et al., 2018). Além disso, a própria medula óssea é importante sintetizadora do hormônio, apresentando enzimas essenciais para sua biossíntese, como a serotonina-N-acetiltransferase (AANAT), que catalisa a transformação da serotonina em (NAS). Essa produção hormonal na medula óssea pode ser tão expressiva que suas concentrações muitas vezes superam os níveis séricos, o que indica a importante função local. Além de modular a hematopoiese, Halim et al. (2020) e Sun et al. (2022) apontam que a melatonina pode influenciar múltiplos sinais para impulsionar a diferenciação de células mesenquimais (MSC) da medula óssea, que são células-tronco multipotentes capazes de se diferenciar em linhagens osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas ou miogênicas.

Figura 3 - Vias de sinalização da biossíntese de melatonina na pineal de ratos.



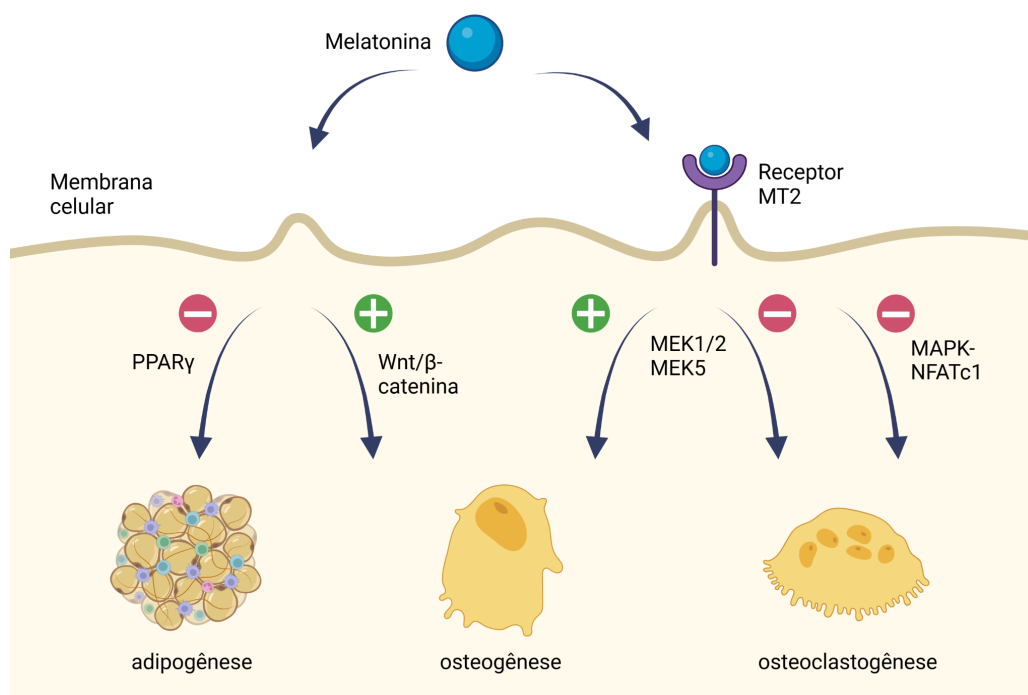
Sousa, 2011. No escuro, as fibras pós-ganglionares simpáticas liberam noradrenalina (NA), ativando os receptores β_1 e α_1 -adrenérgicos na glândula pineal, que promove a ativação da enzima adenilil ciclase (AC), a qual catalisa a conversão de ATP em AMP cíclico (AMPc), elevando os níveis de AMPc dentro da célula. O aumento de AMPc ativa a proteína quinase A (PKA) que fosforila o fator de transcrição CREB, permitindo a transcrição da enzima serotonina N-acetiltransferase (AANAT). Além da via β_1 -adrenérgica, a ativação dos receptores α_1 pela NA e dos receptores P2Y₁ pelo ATP também inicia cascatas de sinalização que levam ao aumento intracelular de cálcio e consequente ativação da proteína quinase C (PKC) que, por sua vez, potencializa a atividade da enzima AC e a transcrição da AANAT. AANAT é substrato para formar N-acetilserotonina (NAS) e a via de biossíntese da melatonina só prossegue com sua tradução.

Outras fontes extra pineal de melatonina incluem o cérebro (CARDINALI, VACAS, BOYER, 1979), a retina, células pancreáticas (BAHR et al., 2012), do trato gastrointestinal, pele, células imunocompetentes, entre outros (HOTTA et al., 2000; CECON, OISHI, JOCKERS, 2018). Apesar de várias partes do corpo sintetizarem o hormônio, sua produção atinge o pico durante a noite, com níveis séricos pelo menos 10 vezes maiores do que durante o dia (TOUITOU, 2001). Essa ampla distribuição tecidual e presença em diversos fluidos corporais deve-se às características lipofílicas e hidrofílicas da melatonina, permitindo que ela atravesse facilmente as membranas celulares por difusão passiva e alcance diferentes partes do organismo. Além disso, uma vez liberada no sistema vascular, a resposta hormonal da melatonina é mediada por receptores melatoninérgicos específicos e independentes acoplados à proteína G, conhecidos como MT1 e MT2, presentes em muitos tipos de células. A melatonina também interage com diversas moléculas intracelulares, modulando cascatas de

sinalização, e pode ativar direta ou indiretamente receptores nucleares que regulam a transcrição de genes alvo (LIU et al., 2019).

Tratando-se do tecido ósseo, por meio da ligação ao receptor MT2, a melatonina eleva a expressão genética e atividade osteoindutora de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fosfatase alcalina, osteocalcina e osteoprotegerina. Em importantes estudos realizados com culturas de células *in vitro*, essas proteínas marcadoras ósseas foram expressas mesmo com baixos níveis do hormônio (ROTH et al., 1999). De modo geral, a melatonina controla o processo geral de remodelação óssea com uma dupla ação: induz a transdução de sinais na osteogênese e promove a formação óssea pelos osteoblastos, enquanto sua combinação com o receptor MT2 também suprime a atividade osteoclastogênica, atenuando a osteólise. De forma mais específica, ocorre a ativação de vias como Wnt/ β -catenina (também ativada pelos estrógenos como citado anteriormente), proteínas quinases ativadas por mitógeno/quinases regulada por sinal extracelular (MAPK/ERK) e NF κ B para melhorar a qualidade óssea, em que desencadeiam cascatas de sinais que estimulam a osteogênese e inibem a osteoclastogênese a partir de precursores do sangue periférico da linhagem mielóide/monócito. Estas cascatas de sinalização resultam na ativação de fatores de transcrição chave (Figura 4), como o fator nuclear das células T ativadas (NFATc1) que regula a transcrição de genes específicos da osteoclastogênese (KIM et al., 2017; CHOI et al., 2021; YANG et al., 2022).

Figura 4 - Mecanismos pelos quais a melatonina regula a remodelação óssea.



Adaptado de YANG et al., 2022. A remodelação óssea depende da comunicação entre osteoblastos (que formam o osso) e osteoclastos (que reabsorvem o osso). A inibição mediada pela melatonina pela via PPAR γ desvia

células-tronco mesenquimais da adipogênese para a osteogênese. A melatonina também atua na ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina para induzir a osteoblastogênese. Receptores de melatonina MT2 ativados estimulam as vias MEK1/2/ERK1/2 e MEK5/ERK5, levando à indução da expressão gênica e proteica osteogênica. A melatonina também impede a indução do NFATc1, levando à supressão da diferenciação dos osteoclastos.

4. METODOLOGIA

4.1 Amostras e condições ambientais

Foram solicitadas 40 ratas fêmeas albinas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) ao Biotério Central da UFSCar, após aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSCar N° 1694190521 (Anexo A). No local, há um controle preciso em relação à luminosidade, contando com um ciclo claro/escuro de 12/12 horas, sendo utilizadas, na fase clara, lâmpadas incandescentes Phillips® H60/100W/2.700K. Na fase escura, os animais permaneceram em total ausência de luz e as intervenções ocorridas nesse período foram realizadas em ambiente com refletores instalados com filtro vermelho (LEE Filters, #fire19; 600 nm; <15 lux). Tais especificações acerca da iluminação no alojamento tem como preocupação mimetizar as condições ambientais ideais do padrão de vida dos roedores, visando reduzir qualquer possível influência no comportamento e bem-estar dos animais que poderia comprometer os resultados, e já foram empregadas em estudos do laboratório como o realizado por Beck e Gobatto (2013). Além disso, o biotério apresenta rigoroso controle quanto à umidade relativa do ar, a permanecer entre 45% e 55%, ao nível de ruído, mantido abaixo de 85 decibéis, e à climatização do ambiente, definida em $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Os animais receberam ração específica para roedores, água filtrada *ad libitum* e tiveram suas gaiolas periodicamente higienizadas.

4.2 Desenho experimental

Os animais chegaram ao biotério aos 45 dias de idade para familiarização e foram alojados coletivamente, na densidade de dez animais por gaiola, sendo distribuídos de maneira aleatória em quatro grupos: controle (GC); ovariectomizado (GO); melatonina (GM); e ovariectomizado + melatonina (GOM). Semanalmente, do início ao fim do experimento, as massas corporais dos animais foram registradas visando a confirmação da consistência das condições ambientais e para ajustes das doses de melatonina quando a intervenção fosse iniciada. Na 15ª semana de idade, a técnica cirúrgica da ovariectomia bilateral foi realizada nos grupos GO e GOM. Uma semana depois, iniciou-se a administração de melatonina aos grupos GM e GOM, sendo administrada também a solução veículo ao GC e GO para igualar

as condições. Após 12 semanas de intervenções, foi realizada a eutanásia dos animais para coleta de material biológico (Figura 5).

Figura 5 - Desenho experimental.

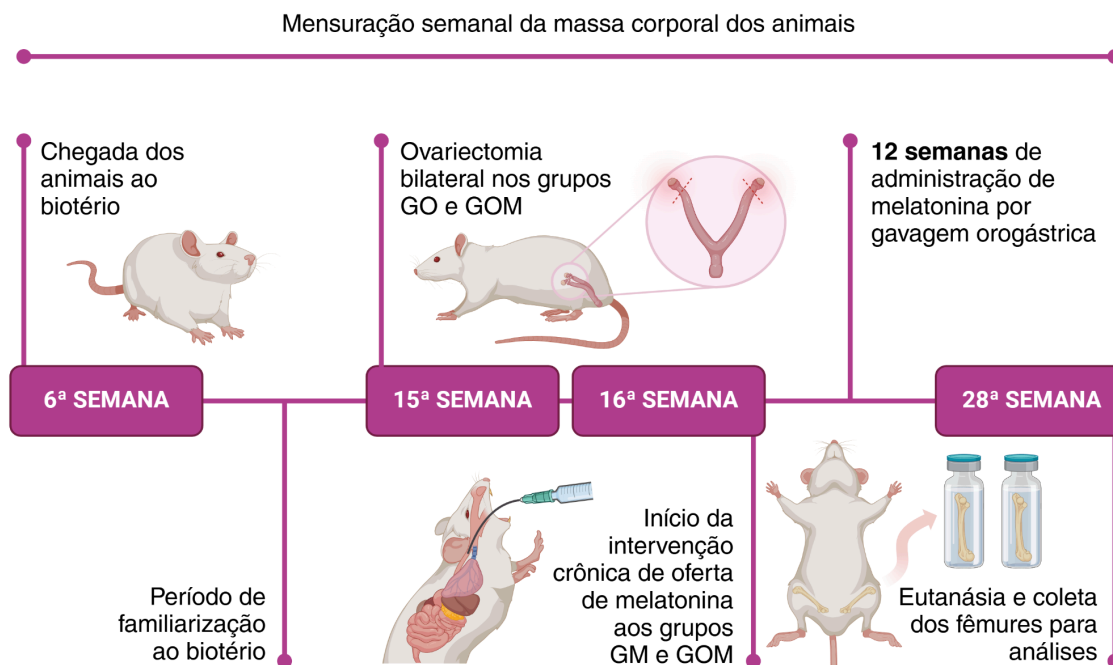


Imagem produzida pelo autor. Sequência cronológica desde a chegada dos animais ao biotério até sua eutanásia e subsequente coleta do material biológico. GO = ovariectomizado, GM = melatonina, GOM = ovariectomizado + melatonina.

4.3 Procedimento cirúrgico de ovariectomia bilateral

Em modelo animal, o procedimento cirúrgico de ovariectomia é empregado com o objetivo de induzir um quadro clínico de déficit de estrógenos, uma vez que essa técnica resulta na ausência de níveis séricos do hormônio ovariano (CAVALCANTI-DE-ALBUQUERQUE et al., 2014; MEDINA-CONTRERAS et al., 2020). Este método é amplamente reconhecido e tem sido realizado em estudos recentes (PEJON et. al., 2022A; PEJON et. al., 2022B; PEJON et. al., 2024). Previamente à cirurgia, os animais foram anestesiados com ketamina (10 mg/kg) e xilazina (0,1 mg/kg), aplicadas por via intraperitoneal. Com o efeito anestésico estabelecido, foi feita uma incisão lateral, seguida do corte na camada muscular e na cavidade peritoneal, de maneira a expor totalmente o órgão para completa extração do ovário (Figura 6). Após a remoção, o tecido foi recolocado na cavidade peritoneal, havendo a sutura das camadas e da pele com fio de nylon. Os mesmos procedimentos cirúrgicos foram realizados na lateral oposta do animal (ZARROW, 1964). Nos dias seguintes, com base em Cunha et al. (2010) e Lino et al. (2018), os animais foram verificados diariamente e receberam dipirona (14 mg/kg) como analgésico e penicilina-estreptomicina (5 mg/kg) para evitar infecções.

Figura 6 - Representação do procedimento cirúrgico de ovariectomia.

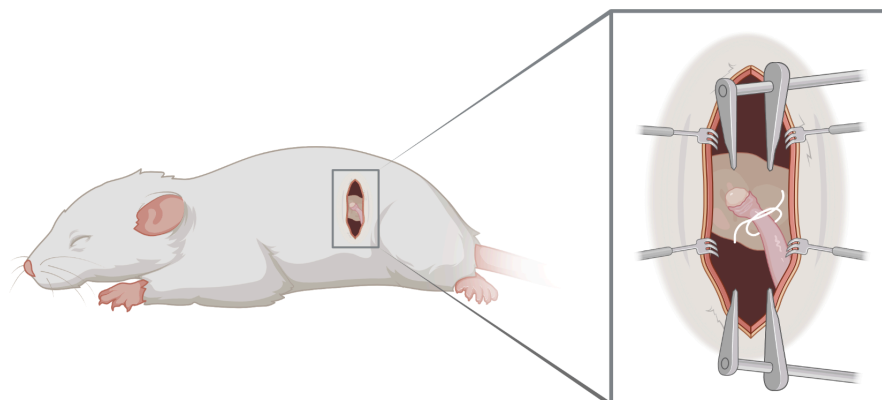


Imagem produzida pelo autor. Após a sedação do animal, faz-se a incisão na cavidade peritoneal. O ovário e a tuba uterina são imediatamente visualizados, envolvidos pelo tecido adiposo perigonadal.

4.4 Administração de melatonina

O método de administração de melatonina foi por gavagem orogástrica (OZTOPUZ et al., 2020; SHARAN et al., 2017; THOMAS et al., 2016; PEJON et al., 2024), utilizando uma agulha curva e rígida de aço inoxidável com extremidade atraumática (modelo BD-12). Ao longo de 12 semanas, cada animal recebeu 10 mg/kg/dia de melatonina previamente dissolvida em etanol (0,01%), conforme seu coeficiente de solubilidade nas especificações técnicas do fabricante (SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, MO, USA) e diluída em água filtrada, sendo esta solução preparada diariamente. Para a preparação das substâncias, no início de cada semana os animais foram pesados para considerar a massa corporal total de cada grupo no cálculo adequado do volume total a ser preparado e posteriormente administrado, tanto da solução veículo quanto da solução com melatonina, sendo que cada animal recebeu a dose conforme sua massa corporal, sem exceder o volume final máximo de 5 mL/kg (TURNER et al., 2011; TURNER et al., 2012) (Figura 7). A administração de melatonina ocorreu sistematicamente 1 hora após o início do ciclo escuro do biotério, durante período de vigília dos animais, havendo o controle da iluminação com filtro vermelho (>600nm; ~15lux) durante as intervenções. Toda a manipulação foi feita na ausência de luz branca e a solução foi mantida em frasco âmbar a fim de evitar os efeitos da luminosidade sobre a estabilidade da droga.

Figura 7 - Etapas do preparo e administração da dose de melatonina.

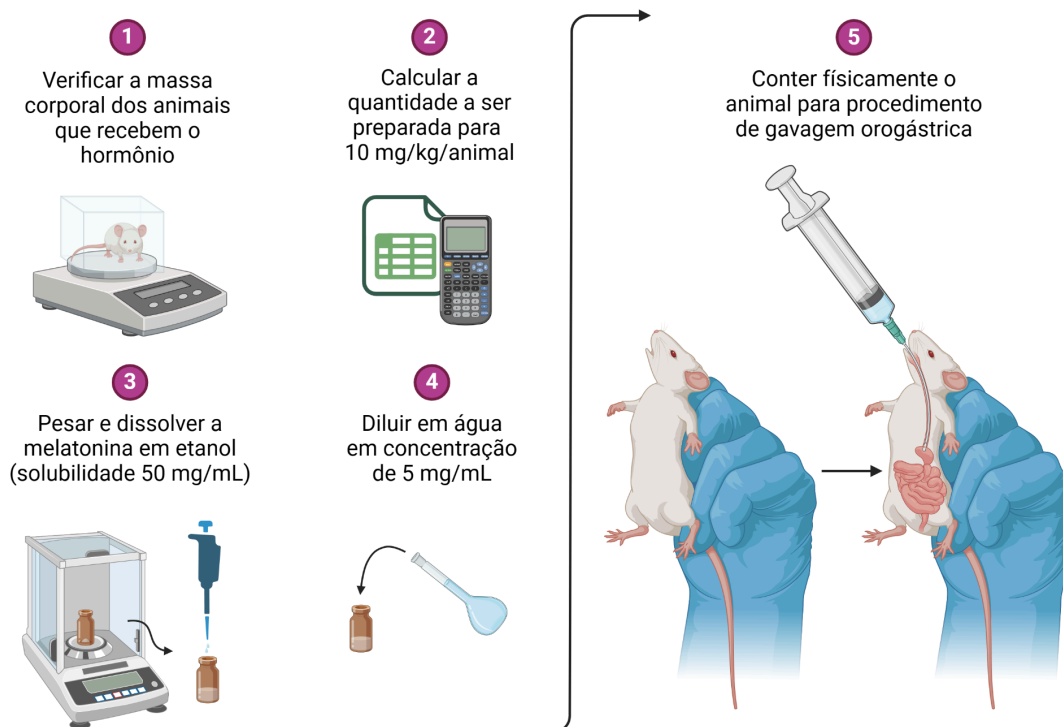


Imagem produzida pelo autor.

4.5 Obtenção e armazenamento do material biológico

Ao longo do experimento, as massas corporais dos animais foram medidas e registradas semanalmente para acompanhamento da evolução. Ao término de 12 semanas de intervenções, em conformidade com as diretrizes da American Veterinary Medical Association (2020), os animais foram eutanasiados por decapitação, com subsequente dissecação femoral de cada animal para retirada da musculatura e tecidos moles. O tecido ósseo foi mantido em solução salina 0,9% e armazenado a -20°C para posteriores análises.

4.6 Análises do tecido ósseo

4.6.1 Análises biométricas

Foi utilizado um paquímetro com precisão de 0,05 mm para mensuração das medidas de comprimento, tendo como referência a região distal dos côndilos femorais, em que há articulação com a tíbia, até a saliência óssea mais proximal do trocânter maior. Também, foram medidas as espessuras das diáfises femorais, tanto dos diâmetros maiores (posição látero-lateral) quanto menores (posição ântero-posterior) de cada amostra (Figura 8), tendo a base do terceiro trocânter como referência (FABRICIO, 2014).

Figura 8 - Obtenção dos parâmetros biométricos.

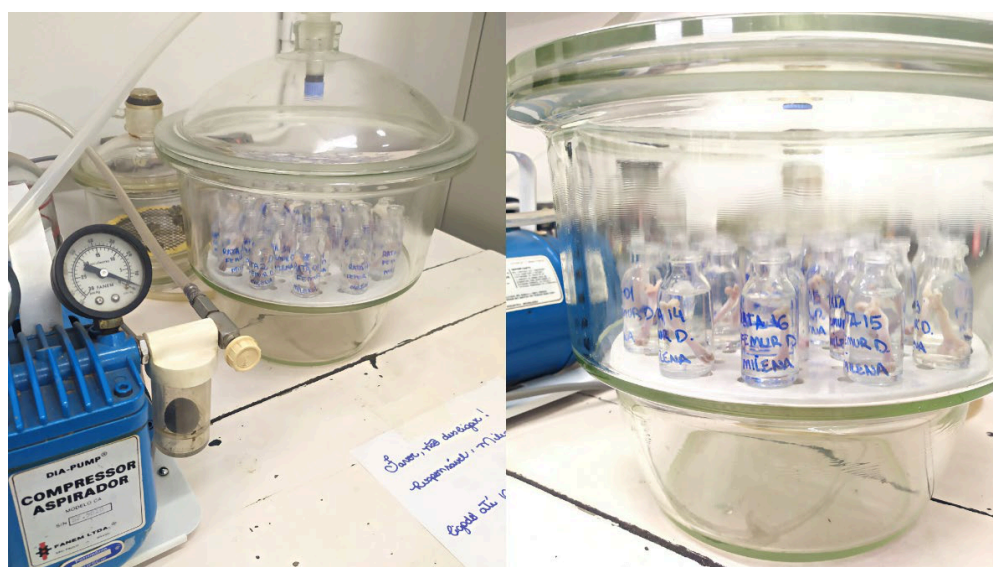


Fotografias pelo autor. (A) Coleta das medidas. (B) Posicionamento do paquímetro para mensuração do comprimento da amostra.

4.6.2 Análises biofísicas

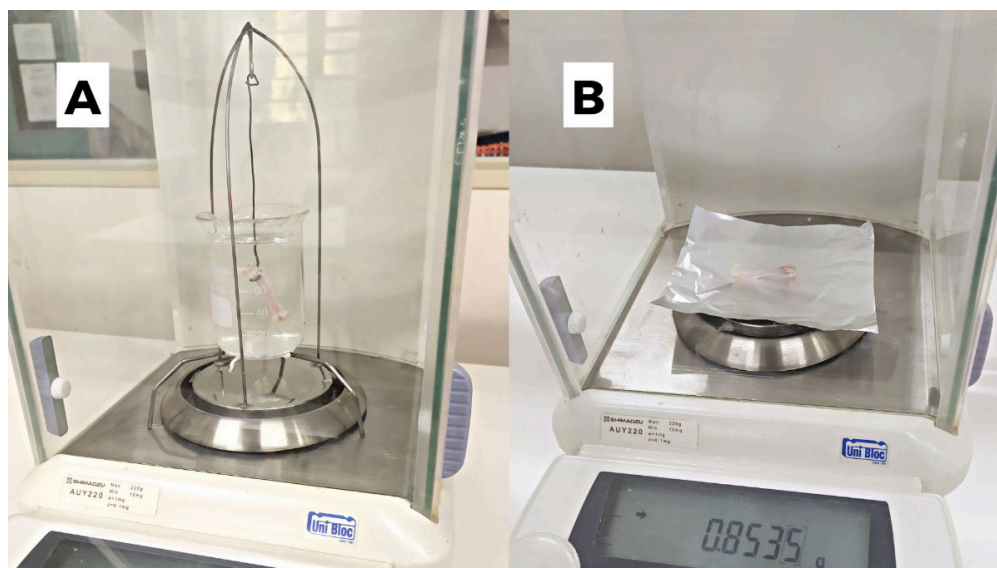
Após o registro biométrico, os ossos foram mantidos imersos em água destilada e permaneceram 24 horas em dessecador para a completa retirada do ar do interior do osso trabecular (Figura 9). Após isso, foi realizada a pesagem para se obter o peso imerso e peso úmido de cada fêmur (Figura 10), sendo essas medidas realizadas previamente ao teste biomecânico.

Figura 9 - Dessecador à vácuo para retirada do ar da porosidade óssea.



Fotografias pelo autor. Registros mostrando o equipamento hermeticamente fechado e a disposição das amostras.

Figura 10 - Obtenção dos parâmetros biofísicos.



Fotografias pelo autor. (A) Método de medição do peso imerso. (B) Método de medição do peso úmido.

Feito o teste biomecânico (descrição no tópico 4.6.3), as amostras foram colocadas a 100°C em uma estufa por 24 horas para desidratação, obtendo-se, em seguida, o peso seco de cada osso. Para mensurar o peso mineral (peso das cinzas), os ossos foram incinerados em mufla a 800°C por um período de 24 horas (BIROCALE et al., 2016; PACHECO-COSTA et al., 2015) (Figura 11). Todos os pesos foram medidos com uso da balança eletrônica da marca Shimadzu modelo AUY220 com 4 casas decimais de precisão.

Figura 11 - Forno mufla para incineração do tecido ósseo.



Fotografias pelo autor. Registros demonstrando a utilização de recipientes de porcelana que suportam a temperatura elevada e o posicionamento do material biológico.

Após as medições, por meio de fórmulas seguindo o Princípio de Arquimedes (KEENAN et al., 1997), foi calculado o volume ósseo e, em sequência, a densidade óssea e

mineral, percentuais de água e material orgânico e mineral (POLISEL et al., 2021) dos fêmures. Foram utilizadas as seguintes equações (Figura 12):

Figura 12 - Equações para determinação de medidas físicas ósseas.

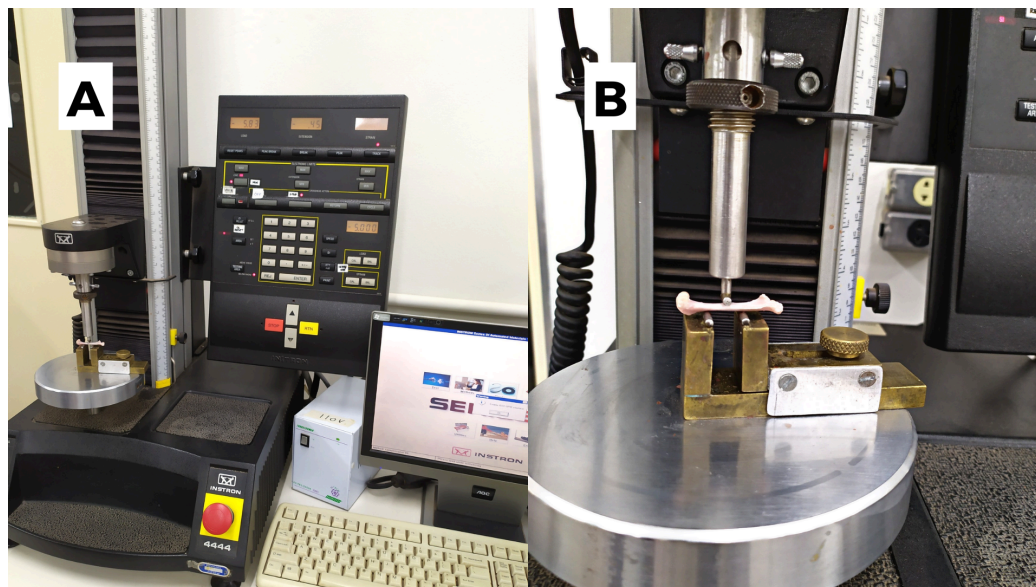
<p>• Volume Ósseo =</p> $\frac{(\text{peso úmido} - \text{peso imerso})}{\text{densidade da água}} \text{ (cm}^3\text{)}$	<p>• Percentual de Água Óssea =</p> $100 \times \frac{(\text{peso úmido} - \text{peso seco})}{\text{peso úmido}} \%$
<p>• Densidade Óssea =</p> $\frac{\text{peso úmido}}{\text{volume ósseo}} \text{ (g.cm}^{-3}\text{)}$	<p>• Percentual de Material Orgânico =</p> $100 \times \frac{(\text{peso seco} - \text{peso mineral})}{\text{peso úmido}} \%$
<p>• Densidade Mineral Óssea =</p> $\frac{\text{peso mineral}}{\text{volume ósseo}} \text{ (g.cm}^{-3}\text{)}$	<p>• Percentual de Material Mineral =</p> $100 \times \frac{\text{peso mineral}}{\text{peso úmido}} \%$

Imagem produzida pelo autor. cm: centímetros; g: gramas.

4.6.3 Análises biomecânicas

Os fêmures direitos foram submetidos ao teste de flexão óssea em três pontos, realizado na máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444. Doze horas antes, os ossos foram descongelados à temperatura ambiente e mantidos em solução salina até o momento do teste. As extremidades do fêmur ficaram apoiadas para que a carga da máquina fosse colocada no centro de cada osso. No início do teste, foi aplicada uma pré-carga de 5 N com uso de uma haste cilíndrica que possui um rolete de 3 mm fixado em sua ponta. A pré-carga foi direcionada de forma perpendicular ao eixo longitudinal do osso, no sentido pósterio-anterior, a fim de estabilizar a amostra, acomodando-a melhor (Figura 13). Após a fixação, foi aplicada uma força no mesmo sentido, com velocidade constante de 0,5cm/min, até a ocorrência da ruptura óssea (POLISEL et al., 2021; DERIGGI-PISANI et al., 2023).

Figura 13 - Teste biomecânico.



Fotografias pelo autor. (A) Equipamento Instron, modelo 4444. (B) Amostra estabilizada após pré-carga.

Diante da carga aplicada, gerou-se um gráfico correspondente à deformação óssea que possibilitou extrair valores de carga máxima, deslocamento na carga máxima, resiliência, tenacidade, rigidez, deslocamento e carga máxima no ponto de fratura (Figura 14). Os registros dos dados referentes à força aplicada e à deformação do osso foram armazenados no software Instron Series IX.

Figura 14 - Gráfico de carga por deslocamento (deformação) do osso durante o teste.

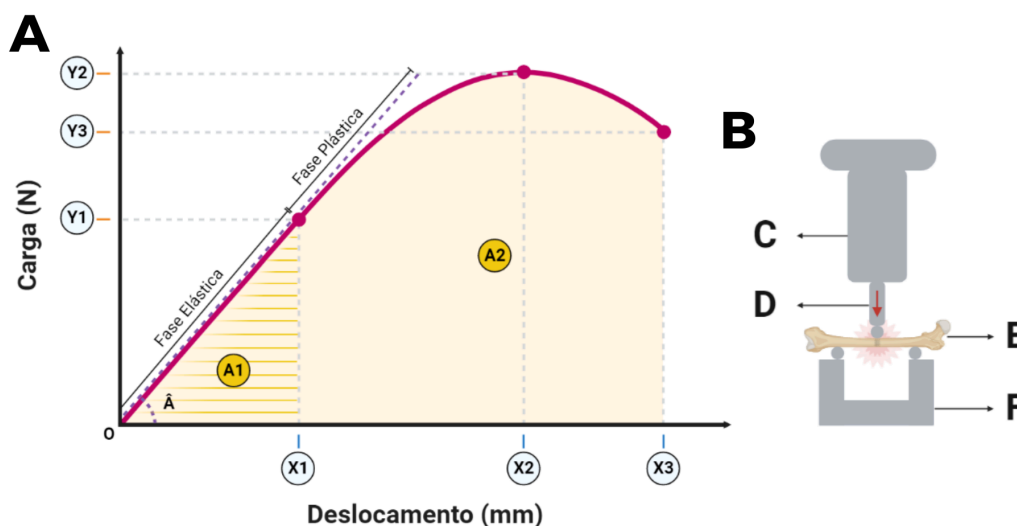


Imagem produzida pelo autor. (A) Gráfico carga x deformação/deslocamento utilizado para determinação das propriedades biomecânicas. (B) Ilustração do posicionamento da amostra na máquina Instron para teste de flexão óssea em três pontos. Em A, Y1: carga no limite elástico; X1: deslocamento no limite elástico; Y2: Carga Máxima; X2: deslocamento na carga máxima; Y3: carga de fratura; X3: deslocamento na carga de fratura; ângulo θ , formado com a tangente da curva: rigidez; área A1: resiliência (energia absorvida na fase elástica); área A1+A2: tenacidade (energia absorvida até o ponto de fratura óssea). Em B, C: haste cilíndrica para a aplicação

de carga; D: extremidade da haste cilíndrica com um rolete fixo; E: osso (fêmur de rato) estabilizado após pré-carga; F: peça de apoio da amostra. N: Newton; mm: milímetros.

4.6.4 Análises bioquímicas

As cinzas ósseas obtidas foram solubilizadas em ácido clorídrico (2N). A partir desta solução, realizou-se as diluições de cálcio (1:500) e fósforo (1:1000) para posterior determinação de suas concentrações por meio de ensaios colorimétricos (POLISEL et al., 2021) utilizando kit comercial (LaborLab) e seguindo as orientações de seus respectivos protocolos. A leitura das microplacas foi realizada na Spectra MAX M5 Multi-Mode, equipamento disponível no Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da Universidade Federal de São Carlos. Concluindo as análises, foram realizados os cálculos finais no Microsoft Excel.

4.7 Análises estatísticas

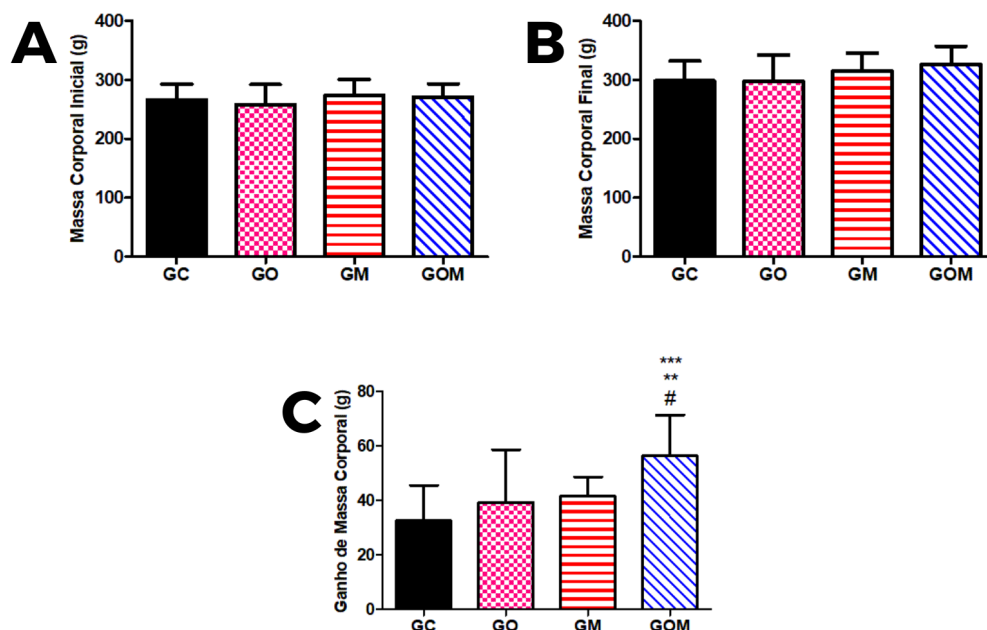
Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. ANOVA two-way foi conduzida para comparação entre os grupos, avaliando os efeitos da ovariectomia (OVX) e da melatonina (MEL), com o auxílio de post-hoc de Newman Keuls, adotando-se o nível de significância de 5% em todos os casos. No caso da massa corporal (MC) dos animais, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA three way para avaliar também o efeito do tempo. Para tabulação dos dados, tratamento estatístico e confecção de gráficos foram utilizados os softwares Microsoft Excel, StatSoft (Statistica 7.0) e Graphpad Prism respectivamente.

5. RESULTADOS

5.1 Massa corporal

Na figura 15 estão apresentados os valores da MC (em gramas) inicial (momento de início da administração diária de melatonina), final (após 12 semanas de intervenções) e o ganho de MC dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de três meses. OVX e MEL não tiveram efeito significativo na MC inicial ($F=0,38$; $p=0,54$ e $F=1,25$; $p=0,27$ respectivamente). Para a MC final, OVX não modificou de forma significativa ($F=0,23$; $p=0,64$) e MEL aumentou de forma significativa ($F=4,24$; $p<0,05$). Significativamente, houve aumento no ganho de MC associado à OVX ($F=5,68$; $p<0,05$) e MEL ($F=8,23$; $p<0,01$).

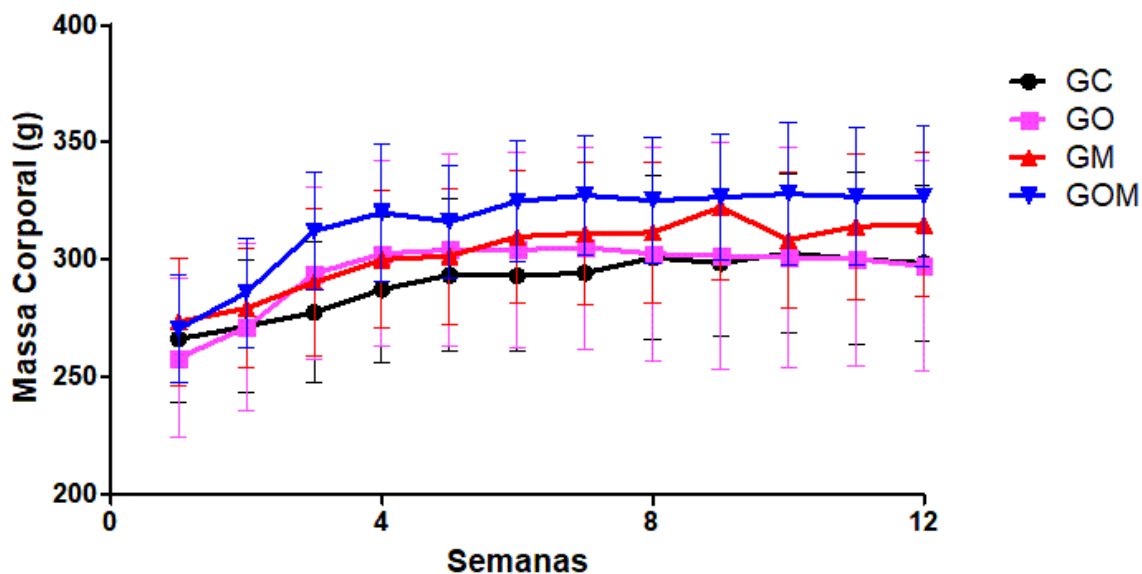
Figura 15 - Variação da massa corporal no decorrer de 12 semanas de intervenções.



Elaborado pelo autor. Representação gráfica da massa corporal inicial (A) e final (B) dos animais dos diferentes grupos experimentais: controle (GC), ovariectomizado (GO), melatonina (GM) e ovariectomizado + melatonina (GOM), bem como o ganho de massa corporal (C) no decorrer de 12 semanas de intervenções. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. # $p < 0,01$ em relação ao GC, ** $p < 0,05$ em relação a GO e *** $p < 0,05$ em relação a GM. g: gramas.

Ao longo das 12 semanas, houve aumento significativo da MC relacionado à OVX ($F=8,44$; $p < 0,01$), à MEL ($F=30,62$; $p < 0,01$) e ao tempo ($F=7,85$; $p < 0,01$). A Figura 16 abaixo exibe a evolução da MC dos grupos experimentais no percurso dos três meses em condição de hipostrogenismo e administração de melatonina.

Figura 16 - Evolução das massas corporais dos grupos experimentais.



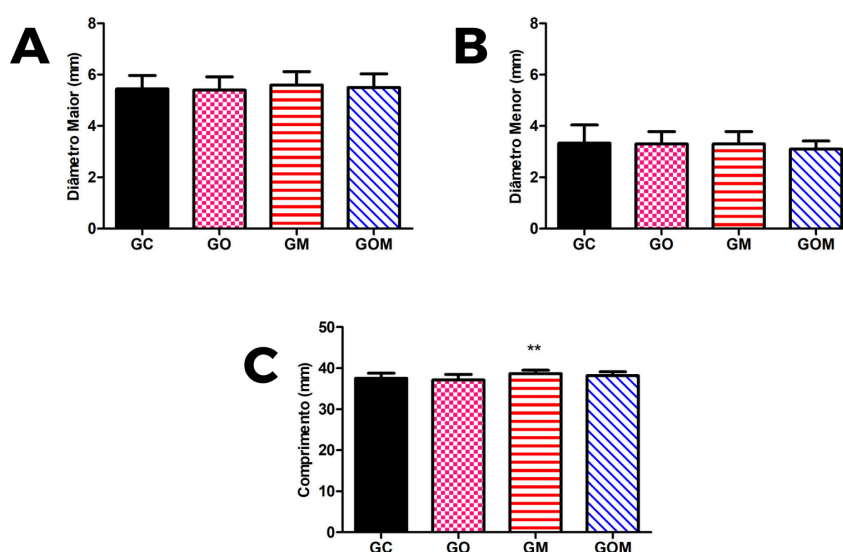
Elaborado pelo autor. Evolução das massas corporais dos grupos experimentais (GC = grupo controle; GO = grupo ovariectomizado; GM = grupo melatonina; GOM = grupo ovariectomizado + melatonina) ao longo de 12

semanas de hipostrogenismo e administração de melatonina. Dados expressos em média \pm desvio padrão. g: gramas.

5.2 Parâmetros biométricos

MEL aumentou significativamente o comprimento do fêmur ($F=10,02$; $p<0,05$) e OVX não alterou de forma significativa ($F=1,82$; $p=0,19$). Para o diâmetro maior, OVX e MEL não promoveram mudanças significativas ($F=0,19$; $p=0,67$ e $F=0,58$; $p=0,45$ respectivamente). Também não foram registradas alterações significativas para o diâmetro menor, tanto relativo à OVX ($F=0,50$; $p=0,48$) quanto MEL ($F=0,50$; $p=0,48$).

Figura 17 - Representação gráfica dos parâmetros biométricos obtidos.



Elaborado pelo autor. Representação gráfica do diâmetro maior (A) menor (B) e comprimento (C) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais: controle (GC), ovariectomizado (GO), melatonina (GM) e ovariectomizado + melatonina (GOM). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. ** $p<0,05$ em relação a GO. mm: milímetros.

5.3 Parâmetros biofísicos

Com base nas medidas de peso imerso, úmido, seco e das cinzas dos fêmures direitos, apresentadas na tabela 1 abaixo, na figura 18 estão dispostos os valores das propriedades físicas: volume ósseo (cm^3), densidade óssea e mineral (g/cm^3), percentual de água, material mineral e material orgânico das amostras biológicas dos animais dos diferentes grupos experimentais. Para o volume ósseo, não houve efeito estatístico significativo associado à OVX ($F=0,50$; $p=0,48$) e MEL ($F=3,12$; $p=0,08$). OVX reduziu significativamente a densidade óssea ($F=28,76$, $p<0,01$), enquanto MEL não alterou ($F=0,57$; $p=0,46$). OVX também diminuiu significativamente a densidade mineral óssea ($F=50,34$; $p<0,01$), ao passo que a MEL não promoveu modificações ($F=0,00$; $p=0,99$).

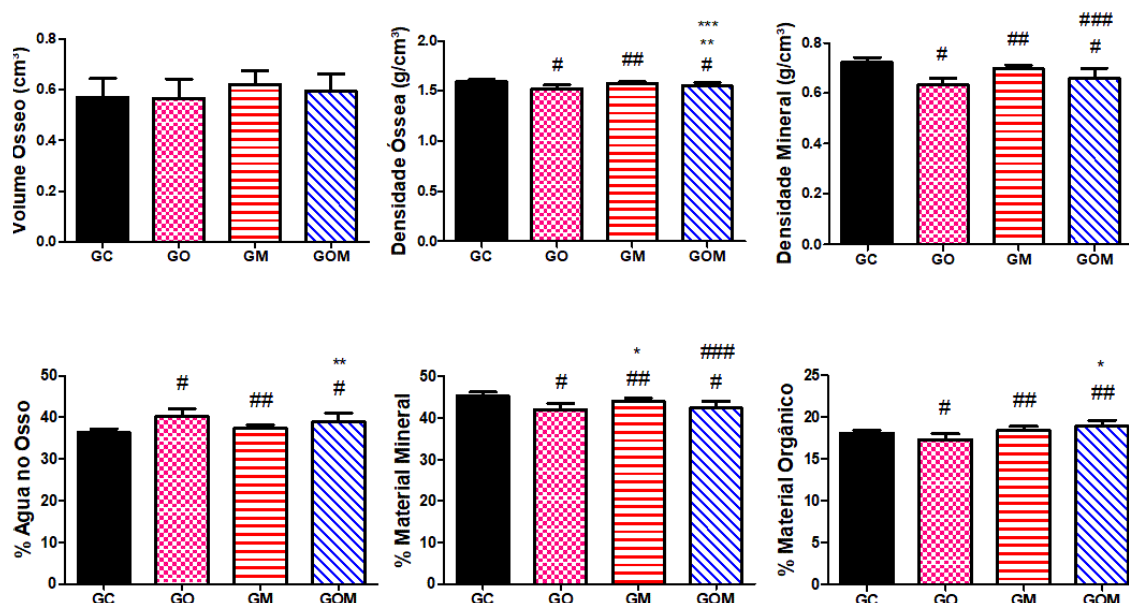
Para os percentuais de água e material mineral, OVX aumentou, de forma significativa, a porcentagem de água no osso ($F=29,58$; $p<0,01$) e reduziu, também significativamente, o percentual de material mineral ($F=36,87$; $p<0,01$). Para essas duas propriedades, MEL não alterou de forma significativa ($F=0,10$; $p=0,81$ e $F=1,32$; $p=0,26$, respectivamente), mas aumentou significativamente o percentual de material orgânico ($F=22,75$; $p<0,01$), o qual não foi modificado de maneira significativa frente à OVX ($F=0,51$; $p=0,48$).

Tabela 1. Dados de peso imerso, úmido, seco e das cinzas dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	GC	GO	GM	GOM
Peso imerso (g)	0,34 ± 0,05	0,29 ± 0,05	0,35 ± 0,03	0,32 ± 0,02
Peso úmido (g)	0,91 ± 0,12	0,86 ± 0,12	0,98 ± 0,08	0,92 ± 0,09
Peso seco (g)	0,58 ± 0,08	0,51 ± 0,08	0,61 ± 0,05	0,56 ± 0,05
Peso das cinzas (g)	0,41 ± 0,06	0,36 ± 0,06	0,43 ± 0,03	0,39 ± 0,03

Elaborado pelo autor. Dados expressos em média ± desvio padrão. Controle (GC), ovariectomizado (GO), melatonina (GM) e ovariectomizado + melatonina (GOM). g: gramas.

Figura 18 - Representação gráfica dos parâmetros biofísicos obtidos.



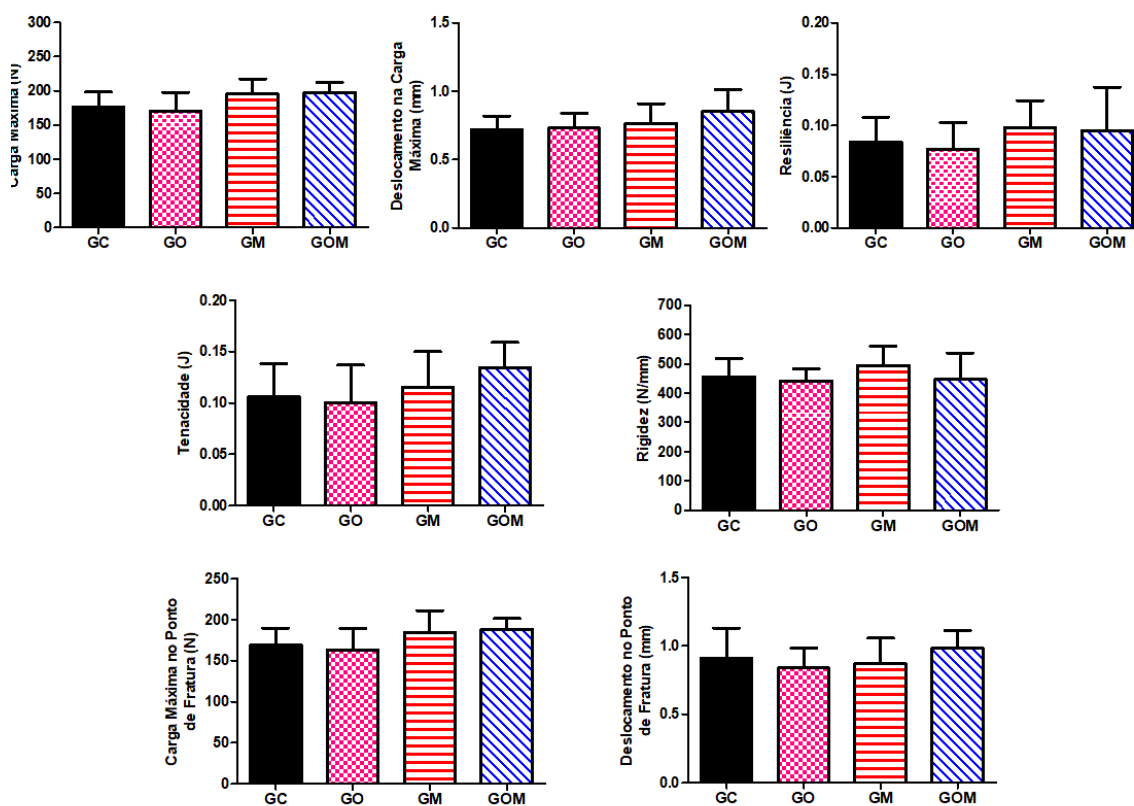
Elaborado pelo autor. Representação gráfica dos valores de parâmetros biofísicos dos fêmures direitos dos grupos experimentais (GC = controle; GO = ovariectomizado; GM = melatonina; GOM = ovariectomizado + melatonina). Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. # $p<0,01$ em relação ao GC; ## $p<0,01$ em relação a GO; ### $p<0,01$ em relação a GM; * $p<0,05$ em relação ao GC; ** $p<0,05$ em relação a GO; *** $p<0,05$ em relação a GM.

$p < 0,05$ em relação a GM. g: gramas; cm: centímetros.

5.4 Parâmetros biomecânicos

Na figura 19 estão expressos os valores das propriedades biomecânicas dos fêmures direitos: carga máxima (N), deslocamento na carga máxima (mm), resiliência (J), tenacidade (J), rigidez (N/mm), carga máxima (N) e deslocamento (mm) no ponto de fratura dos animais dos diferentes grupos experimentais. Para a carga máxima, MEL aumentou significativamente ($F=9,93$; $p < 0,01$) e OVX não modificou ($F=0,05$; $p=0,83$). MEL também aumentou significativamente a carga máxima no ponto de fratura ($F=7,36$; $p < 0,05$), enquanto OVX não alterou esse parâmetro ($F=0,01$; $p=0,92$). Não foram detectadas modificações significativas no deslocamento para OVX ($F=1,19$; $p=0,28$) e MEL ($F=3,44$; $p=0,07$). Sem alterações significantes no deslocamento no ponto de fratura para OVX ($F=0,14$; $p=0,71$) e MEL ($F=0,80$; $p=0,38$). OVX e MEL também não levaram a mudanças significantes para a resiliência ($F=0,26$; $p=0,61$ e $F=2,45$; $p=0,13$), tenacidade ($F=0,37$; $p=0,55$ e $F=3,96$; $p=0,06$), e rigidez ($F=1,92$; $p=0,18$ e $F=0,94$; $p=0,34$).

Figura 19 - Representação gráfica dos parâmetros biomecânicos obtidos.

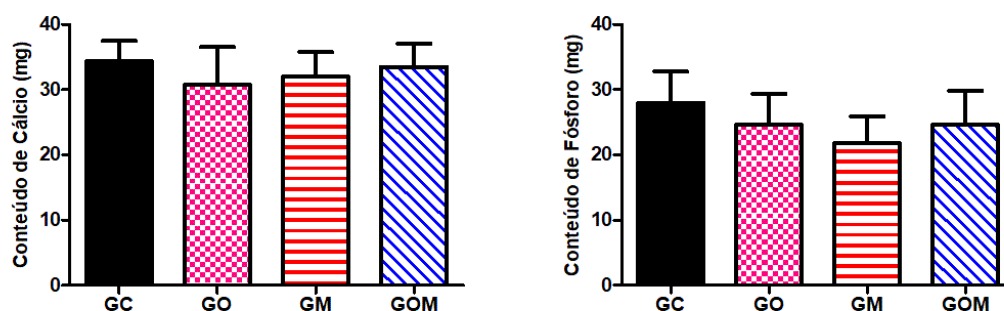


Elaborado pelo autor. Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: (GC = controle; GO = ovariectomizado; GM = melatonina; GOM = ovariectomizado + melatonina). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. N: Newton; mm: milímetros; J: Joule.

5.5 Parâmetros bioquímicos

Na figura 20 a seguir estão expressos os valores dos conteúdos de cálcio e fósforo ósseo dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais. Não foram detectadas diferenças significativas das concentrações destes elementos relacionadas à OVX ($F=0,59$; $p=0,45$ e $F=0,03$; $p=0,85$ para conteúdo de cálcio e fósforo respectivamente). MEL também não promoveu mudanças significativas ($F=0,02$; $p=0,88$ e $F=3,64$; $p=0,07$ para conteúdo de cálcio e fósforo em ordem).

Figura 20 - Representação gráfica dos parâmetros bioquímicos obtidos.



Elaborado pelo autor. Representação gráfica dos valores dos conteúdos de cálcio e fósforo das cinzas dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: (GC = controle; GO = ovariectomizado; GM = melatonina; GOM = ovariectomizado + melatonina). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. mg: miligramas.

6. DISCUSSÃO

Este experimento analisou os efeitos da administração crônica de melatonina sobre o tecido ósseo de ratas em condição hipoestrogênica. Os principais achados foram a redução da densidade óssea e mineral associada à deficiência estrogênica e um cenário de perda óssea parcialmente neutralizado quando combinado a um tratamento diário com melatonina durante 12 semanas. Isso foi evidenciado pelo aumento significativo dos parâmetros biomecânicos dos animais tratados com melatonina, em contraste com animais ovariectomizados. Aspectos como carga máxima suportada e carga máxima no ponto de fratura foram aumentados nos animais que receberam o hormônio, até mesmo em relação ao GC, permitindo dizer que houve efeito da melatonina na otimização da resistência óssea. Contudo, é importante notar que a melatonina não apresentou efeito expressivo sobre a densidade óssea e mineral, que foram reduzidas significativamente no GO em relação ao GC. Apesar disso, ao considerar as diferenças percentuais entre os grupos é possível observar que o grupo tratado com melatonina apresentou resultados mais similares ao GC e melhorados em relação ao GO como será melhor discutido adiante. Dessa forma, os resultados suportam a hipótese de que a melatonina modula as propriedades ósseas de maneira protetora, visto que

os animais que receberam o tratamento hormonal tiveram respostas fisiológicas menos divergentes dos animais sem intervenções experimentais do que àqueles ovariectomizados. Isso demonstra a potencialidade da melatonina em influenciar o mecanismo de remodelação óssea para reduzir a reabsorção óssea excessiva provocada pelo déficit de estrógenos, o que vai ao encontro de inúmeros achados semelhantes (LADIZESKY et al., 2001; LADIZESKY et al., 2003; SHARAN et al., 2017; MARIA et al., 2018; LU et al., 2021). Porém, ainda assim, deve-se considerar que neste experimento o tratamento hormonal não foi suficiente para neutralizar todas as consequências da deficiência estrogênica para a totalidade das propriedades ósseas investigadas.

Também, a partir dos resultados, nota-se que o modelo de ovariectomia foi válido e eficiente para criar um cenário que, se estendido, poderia levar a um quadro de osteopenia devido à perda óssea significativa. Essa condição é destacada pela redução significativa da DMO diante do efeito da ovariectomia, sendo essa alteração um dos principais indicadores para o diagnóstico e condizente com descrições na literatura, nas quais mudanças nas propriedades físicas se mostram como derivadas do hipoestrogenismo e capazes de serem observadas a partir do primeiro mês após a realização cirúrgica (FAIENZA et al., 2013; LIU et al., 2015; FARMAN et al., 2016; YOUSEFZADEH et al., 2020; LI et al., 2022). Como forma de confirmação do sucesso no procedimento de ovariectomia, no momento da eutanásia, foi constatada atrofia do tecido uterino nos animais submetidos à OVX em comparação àqueles não ovariectomizados (WRONSKI et al., 1987; PATLAS et al., 2000; FRANCISCO et al., 2011; SAUL et al., 2016). Também se pode validar a supressão efetiva da atividade hormonal ovariana pelo aumento da ingestão alimentar pelos animais, o que se associa às mudanças na composição corpórea e na distribuição de gordura (PALMER, CLEGG, 2015; DE CARVALHO et al., 2016), bem como diante da taxa aumentada de ganho de MC como consequência do prejuízo hormonal (BAXI et al., 2012; MEDINA-CONTRERAS et al., 2020; PEJON et al., 2022). Relacionado à MC, nossos resultados confirmam que a ovariectomia provocou mudanças neste parâmetro (Figura 16), exercendo o aumento da MC ao final dos três meses de hipoestrogenismo, mas o efeito também foi notado pela oferta de melatonina. Assim, pode-se inicialmente discutir as prováveis razões pelas quais a MC foi aumentada entre os grupos experimentais.

Além de ser uma variável que sofre alterações diante da situação adversa de deficiência estrogênica, a importância da MC para estudos que investigam o tecido ósseo se deve ao estresse mecânico que exerce sobre os ossos e a sua contribuição para o ganho de massa óssea (WRONSKI et al., 1987; FARMAN et al., 2016; JENSEN et al., 2021; POLISEL

et al., 2021). É sugerido que tensões ósseas causam diferenças no potencial elétrico ao longo do osso, induzindo ao aumento da deposição óssea em pontos de estresse compressivo (MENKES et al., 1993). Contudo, é bem documentado que a diminuição da produção de estrógenos reduz acentuadamente a atividade física espontânea diária de roedores (LIGHTFOOT, 2008; SHERK et al., 2019; PEJON, 2022), o que tem sido associado a efeitos deletérios no sistema esquelético pela redução do estímulo ósseo induzido pela menor contração muscular (RENNO et al., 2007). Diante disso, torna-se relevante ter homogeneidade na MC no início do estudo entre os grupos experimentais (BURR, ROBLING, TURNER, 2002), a qual foi verificada (Figura 15A) para melhor controle do experimento.

Após 14 dias da intervenção cirúrgica, a média da MC do GO ($271,20 \pm 35,68g$) se aproximou do valor do GC ($271,60 \pm 28,36g$) e aumentou rapidamente nas semanas seguintes, com menor variação após 5 semanas. Diante disso, pode-se discutir um aspecto que é capaz de influenciar a variação da MC nos grupos experimentais: o estresse provocado pela realização diária da gavagem orogástrica, podendo levar a repercussões como mudanças no padrão alimentar (BONNICHSEN, DRAGSTED, HANSEN, 2005; DE MEIJER et al., 2010; BAILEY, 2018). Intervenções, em especial quando perduram por longos períodos, são potencialmente responsáveis por impactos fisiológicos, comportamentais e emocionais e, ainda que a gavagem orogástrica seja menos invasiva, quando comparada à injeção intraperitoneal durante longos períodos ou implantação subcutânea, pode induzir ao estresse, sendo observado níveis séricos elevados de hormônios relacionados (KRAHN, GOSNELL, MAJCHRZAK, 1990; BALCOMBE, BARNARD, SANDUSKY, 2004).

Nesse contexto, tem-se cenários em que o estresse provocado em animais experimentais por frequentes intervenções induz tanto ao aumento quanto à diminuição da MC. A pesquisa de Murphy et al (2001) retrata uma redução significativa de MC em ratas ovariectomizadas que receberam administração diária de solução veículo por gavagem, em comparação aos animais levemente anestesiados também submetidos diariamente à intervenção. De maneira semelhante, outros pesquisadores descrevem que a gavagem orogástrica repetitiva em uma dieta rica em gordura, realizada por nove semanas, diminuiu significativamente o ganho de MC, ingestão alimentar, peso do fígado e adiposidade, em comparação aos animais controle que não foram sujeitos à técnica (DE MEIJER et al, 2010). Porém, é frequente na literatura resultados em que se tem ganho de MC induzido pela ovariectomia em animais condicionados a repetição da gavagem orogástrica. Na pesquisa, com duração de 8 semanas, foi observado que tanto grupos ovariectomizados submetidos à

gavagem com solução veículo quanto àqueles sem gavagem, em comparação com animais controles, mostraram aumento significativo da MC de 13% ($p < 0,01$) e 18% ($p < 0,01$), respectivamente, em relação as suas médias precedentes à cirurgia, de forma a concluir que o aumento de MC é consequência da ovariectomia (LIANG et al., 2016).

Em nosso experimento, nos preocupamos em realizar a adaptação dos animais ao procedimento, visando habituá-los ao horário e forma de manuseio, visto estudos que realizaram a gavagem orogástrica de soluções aquosas e evidenciam a aclimatação ao método como garantia do bem-estar animal (TURNER et al., 2012). De fato, notamos que a habituação dos animais às intervenções facilitou a cooperação voluntária. Ao final do experimento, podemos observar o maior ganho de MC do GO (39 ± 19 g) e GOM (56 ± 15 g) frente ao GC (32 ± 13 g), o que é característico da insuficiência estrogênica. Porém, esperava-se encontrar maior diferença entre o GO e o GC, uma vez que é frequentemente relatado na literatura um maior ganho de MC combinado a uma maior deposição de gordura visceral em situação de déficit de estrógenos (JIANG; SACCO; WARD, 2008; KALU, 1991; RETTBERG; YAO; BRINTON, 2014). Dessa forma, frente às pesquisas apresentadas, não se pode descartar a possibilidade de modulação desta variável pelo estresse induzido em todos os grupos pelo método de administração hormonal utilizado, ainda que a aclimatação ao manuseio tenha ocorrido no experimento. Esse ocorrido desperta interesse em nosso grupo acerca de futuros experimentos que possam se debruçar também sobre análises relacionadas ao estresse dos procedimentos ora utilizados.

Acerca do GOM, nossos resultados não corroboram com as investigações mais recentes acerca da atuação da melatonina sobre a MC em contexto adverso de hipostrogenismo. Neste estudo, o tratamento com melatonina não foi capaz de prevenir o aumento de MC nos animais. O hormônio, conhecido classicamente por sua função regulatória do ciclo circadiano (REITER, TAN, FUENTES-BROTO, 2010), exerce papéis importantes em vários processos fisiológicos. Há inúmeras pesquisas que investigam sua atuação no metabolismo energético (CIPOLLA-NETO et al., 2014), englobando estudos realizados por nosso grupo (BECK et al., 2015; BECK et al., 2016; BECK et al., 2018; FARIA et al., 2021), sua participação em processos inflamatórios (HARDELAND, 2019) e, em contexto de déficit de estrógenos, tem sido amplamente demonstrado sua ação em regular a ingestão alimentar e seu papel na redução do ganho de MC induzido pelo hipostrogenismo (SANCHEZ-MATEOS et al., 2007; BAXI et al., 2012;). A revisão de tal papel por Guan et al. (2021) reúne estudos que demonstram sua capacidade em suprimir a adipogênese e a revela como um agente promissor na intervenção da obesidade. Ainda, em pesquisas conduzidas em

modelo animal pinealectomizados (PX), observa-se aumento significativo de MC, o que não acontece em grupos suplementados com o hormônio, enfatizando a relevância da melatonina nesta área (PRUNET-MARCASSUS et al., 2003).

Diante de tantas evidências na literatura, mas a não observância desse efeito da melatonina sobre a MC em nossos resultados, pode-se considerar vários fatores que, quando conciliados, resultaram em maior MC, porém não atrelada ao aumento do tecido adiposo como comumente associado nesse contexto. Um dos fatores é a ação benéfica da melatonina no desenvolvimento muscular, tecido este que tem significativa contribuição sobre a MC, sendo o músculo esquelético correspondente a 40% da MC. Estudos sugerem que a melatonina pode manter as fibras musculares através de uma variedade de ações e, conseqüentemente, atenuar, reduzir ou prevenir a perda de massa muscular, além de evitar a apoptose das células musculares esqueléticas em razão do estresse oxidativo (CHEN, YOU, SHAN, 2020; JIN et al., 2021). Além disso, a propriedade antioxidante da melatonina e sua capacidade em eliminar radicais livres se estende ao sistema esquelético. Com isso, vários estudos descrevem seus efeitos benéficos no tecido ósseo, sendo associada à redução do mecanismo de reabsorção óssea e aumento da massa mineral óssea (AMSTRUP et al., 2013). Assim, tem-se um cenário que tanto o desenvolvimento do tecido muscular quanto o ósseo, como conseqüências da ação hormonal, podem ter contribuído para a não redução da MC ao final de nosso experimento. Dessa forma, experimentos futuros de nosso grupo certamente observarão a composição corporal e não somente a massa corpórea total.

Tratando-se das propriedades do tecido ósseo, o modelo de ovariectomia em rato experimental é recomendado pela World Health Organization (1998) e Food and Drug Administration (2016) como método operatório confiável de indução da deficiência de estrógenos para se testar terapias pré-clínicas relacionadas à perda óssea. Com a redução dos níveis séricos do hormônio, há aumento na taxa de renovação do tecido com predomínio da reabsorção óssea em relação à formação óssea, como detalhadamente abordado na introdução e aprofundamento na literatura deste trabalho. Esse desequilíbrio metabólico que se segue à diminuição de estrógenos provoca elevada perda de massa óssea, destruição e alterações progressivas dos parâmetros ósseos e deterioração da microarquitetura do tecido, o que predispõe ao risco aumentado de zonas de estresse e fraturas (RIGGS, KHOSLA, MELTON III, 1998; LADIZESKY et al., 2003; AMSTRUP et al., 2013). Ainda, a redução da massa óssea pode ser acompanhada da perda de massa muscular esquelética, condição denominada sarcopenia (SAUL et al., 2016), intensificando o risco de lesões ósseas. Diante da

complexidade para se avaliar a qualidade óssea, características como a composição do tecido, design estrutural e resistência mecânica são importantes indicadores.

Nas medidas biométricas (Figura 17), não foram observadas acentuadas variações para os parâmetros (comprimento, diâmetro maior e diâmetro menor) relacionados à OVX, apesar de alterações na composição do tecido ósseo que serão posteriormente discutidas, o que demonstra que o desenvolvimento ósseo não foi modificado pela situação adversa hipoestrogênica durante o percurso deste experimento. Em contrapartida, Fonseca et al. (2012) demonstraram que a idade dos animais e a concentração de estrógenos influenciam na geometria do fêmur. No estudo, ratas com cinco meses de idade foram ovariectomizadas ou falsamente operadas e mantidas em laboratório por nove meses, sendo identificado um comprimento femoral maior para as primeiras ($p < 0,01$), mostrando que o déficit hormonal acelerou o aumento desta propriedade. Porém, pode-se entender o cenário como adaptações do tecido ósseo para compensar respostas osteometabólicas que ocorrem após a depleção hormonal a fim de melhorar a resistência óssea, já que a distribuição espacial da massa óssea (geometria e microarquitetura) está entre os aspectos determinantes da qualidade óssea (BOUXSEIN, KARASIK, 2006). Também, conforme discutido, tem-se a comum contribuição do ganho de MC e seu efeito piezoelétrico na promoção dessas adaptações (MENKES et al., 1993), ainda que esse parâmetro não tenha sido relatado pelos pesquisadores.

Diante dos nossos dados, é notado um aumento do crescimento femoral associado à MEL. O GM exibiu ~2,96%, ~4,13% ~1,30% a mais na média de comprimento femoral em relação ao GC, GO e GOM respectivamente. Conforme apresentado por Ostrowska et al. (2001), ratos PX tiveram a secreção do hormônio de crescimento (GH) suprimida, tendo sido aumentada com a administração de melatonina e atingindo as maiores concentrações médias diárias em animais com a glândula pineal preservada. Esses resultados exibem a participação da MEL na produção do GH, reconhecido por seu importante papel no crescimento longitudinal ósseo (OHLSSON et al., 1998). Dessa forma, consegue-se elucidar como a administração hormonal pode ter influenciado na geometria do fêmur, característica esta que não é estacionária, mas sujeita a mudanças conforme a massa óssea e o conteúdo mineral do tecido, o que corrobora com outras pesquisas. O crescimento ósseo consideravelmente lento, mas não completo, de ratos dos três aos seis meses de idade também pode ser considerado (KALU et al., 1989; PATLAS et al., 2000; FRANCISCO et al., 2011).

A composição do tecido ósseo envolve componentes minerais, orgânicos e um teor de água, sendo as propriedades mecânicas do osso, como resistência à compressão e rigidez, dependentes da sua composição e estrutura (DOBLARÉ, GARCIA, GÓMEZ, 2004).

Mudanças nas propriedades físicas ósseas se relacionam às alterações da densidade óssea e mineral do tecido, as quais são utilizadas para se estimar a magnitude de lesões em caso de doenças ósseas degenerativas (MUHAMMAD et al., 2013). Ao término das 12 semanas de intervenções, foi possível identificar em nosso estudo que os animais ovariectomizados experimentaram diminuição na densidade óssea e mineral de ~4,60% e ~12,45%, respectivamente, em relação ao GC. Contudo, MEL não promoveu resultados significantes sobre estas variáveis, de modo que ao avaliar o GOM, ainda assim foi verificada redução de ~2,79% e ~8,92% na densidade óssea e mineral, respectivamente, em relação ao GC, evidenciando tanto o impacto negativo do déficit de estrógenos quanto um efeito protetor da melatonina ao impedir uma redução mais acentuada da densidade óssea e mineral como nos animais apenas ovariectomizados. Além disso, ao comparar os dois grupos submetidos à ovariectomia, tem-se que GOM apresentou aumento de ~1,87% e ~3,87% na densidade óssea e na DMO em comparação com o GO, reforçando o efeito benéfico da melatonina, demonstrando seu potencial em mitigar a perda óssea induzida pela deficiência de estrógenos.

No entanto, diversas pesquisas mostram que a suplementação de melatonina resulta em correlação positiva entre os níveis plasmáticos do hormônio e a densidade óssea (XU et al., 2018; IGARASHI-MIGITAKA et al., 2020; LI et al., 2022). Em estudo recente, foi demonstrado por Sharan et al. (2017) seus efeitos benéficos na proliferação e diferenciação osteoblástica, agindo predominantemente por meio dos seus receptores MT2 que regulam, de maneira autônoma, a função dos osteoblastos e são expressos mais vezes no osso que os receptores MT1. Igarashi-Migitaka et al. (2020) também detectaram MT2 em células osteoclásticas, sendo descrito o mecanismo de inibição da formação osteoclástica pela melatonina. Ao ativar o MT2, a melatonina regula positivamente a expressão gênica dos marcadores osteogênicos ALP, OCN, BMPs, além da OPG que inibe o ativador do receptor do ligante NF-kB, RANKL, suprimindo a osteólise (MALAKOTI et al., 2022). Ainda, frente a característica antioxidante e anti-inflamatória, tem-se sua ação independente de seus receptores como um eliminador de radicais livres, evitando o estresse oxidativo que é associado ao aumento da reabsorção óssea e à baixa massa óssea por estimular a relação RANKL/OPG (AMSTRUP et al., 2013; LI et al., 2019), e como um inibidor da produção de outras citocinas pró-inflamatórias, controlando a atividade dos osteoclastos (XU et al., 2018).

Mas nem todas as pesquisas envolvendo administração exógena de melatonina conduzem a resultados positivos na DMO. Tratando-se da via intraperitoneal, Murat e Onder (2019) administraram MEL a 5 mg/kg/dia durante três semanas em animais submetidos à OVX e/ou PX que, após eutanásia, tiveram a DMO do fêmur mensurada por DXA em

subregiões que compreenderam a área proximal, o corpo (diáfise) e área distal. Comparado ao grupo falsamente operado, os pesquisadores não encontraram valores aumentados na DMO nos grupos de animais OVX e PX que receberam MEL exógena, ao passo que o grupo submetido às duas intervenções cirúrgicas apresentou valores de DMO significativamente maiores apenas na sub-região distal femoral. Possivelmente, os resultados encontrados no experimento ocorreram devido ao tempo de duração da oferta e à dose de melatonina, que podem não ter sido suficientes para alcançar resultados significativos. A eficácia da MEL para evitar a perda óssea em animais OVX é bem suportada por estudos recentes que ofertaram 100 mg/kg em água durante oito semanas (GUAN et al., 2022) e doses maiores de 30 mg/kg/dia por injeção intraperitoneal ao longo de 12 semanas (LI et al., 2022). Assim, nota-se que a dose escolhida e a duração das intervenções são elementos importantes para se encontrar alterações relacionadas aos parâmetros ósseos.

Outro fator de importância é a técnica de administração de substância utilizada. Com base nos resultados, MEL não foi eficiente em promover alterações significantes sobre alguns parâmetros ósseos como a densidade óssea e mineral apresentada. Diante disso, pode-se discutir a biodisponibilidade hormonal em razão da oferta de melatonina de forma oral. Estudos apontam que, diferente da administração via intraperitoneal, em que a substância fica biodisponível em média 70%, a via oral pode representar metade da biodisponibilidade (YELESWARAM et al., 1997). Dessa forma, a quantidade de melatonina ofertada por gavagem orogástrica pode não ter sido suficiente para ocasionar modificações significativas nos aspectos biofísicos do osso. Contudo, considerando que o tecido ósseo não é um órgão simples de ser modulado, são encontrados resultados inconclusivos e divergentes acerca da duração mínima necessária de um protocolo, sua dosagem e técnica de administração para se observar efeitos nas propriedades ósseas. Trabalhamos com uma dosagem de 10 mg/kg/dia, visto a existência substancial de pesquisas que utilizaram essa concentração e relatam sua segurança por gavagem oral e os efeitos protetores do hormônio nas respostas fisiológicas em experimentos com animais (USLU et al., 2007; BAXI et al., 2012; HERNÁNDEZ-PLATA et al., 2015; GHAREGHANI et al., 2018). Além disso, como até o momento não há um consenso sobre o tempo ideal de duração da oferta, optamos por 12 semanas de administração da melatonina, período este que correspondeu a um tempo intermediário entre muitas pesquisas com durações do tratamento medicamentoso que variam entre 4 semanas a 6 meses (KOTLARCZYK et al., 2012; TRESGUERRES et al., 2014; HUANG et al., 2021).

Com relação às demais propriedades ósseas mensuradas, no teste de flexão a três pontos testamos a resistência mecânica do osso e, conseqüentemente, sua capacidade em

resistir a fraturas. Os resultados do teste (Figura 19) apontam relações positivas entre a melatonina e as tensões de cargas máximas medidas, indicando efeitos benéficos do hormônio na resistência óssea. Os grupos GM e GOM apresentaram maiores valores biomecânicos como na carga máxima suportada com aumento de ~12,54% e ~13,65%, respectivamente, em contraste com o GO, mostrando que apesar do déficit de estrógenos, animais ovariectomizados, quando receberam MEL, resultaram em melhoria das propriedades mecânicas. O GO, conforme exposto pelas propriedades físicas, exibiu aumento da desmineralização óssea e maior percentual de água no osso, mas seus parâmetros mecânicos foram menos expressivos. Apesar do efeito não significativo, os valores de carga máxima estão reduzidos no GO, com diminuição de ~3,19% em relação ao GC.

Com isso, pode-se cogitar efeitos mascarados da ovariectomia na biomecânica do GO. Isso porque, conforme investigado por Ammann et al. (1996), dimensões ósseas como diâmetros e espessura cortical têm importantes papéis na determinação da resistência óssea e, portanto, do risco de fratura. No estudo, as relações entre a resistência e a DMO relativa e dimensões ósseas foram avaliadas em ratas ovariectomizadas. Os pesquisadores relatam que é possível notar aumento do diâmetro externo da diáfise média de ossos longos em animais hipoestrogênicos, o que foi novamente evidenciado por Ammann e Rizzoli (2003). Além disso, há relatos na literatura sobre aumento do diâmetro da diáfise e da espessura cortical óssea como uma forma compensatória frente aos desequilíbrios osteometabólicos como forma de restaurar a fragilidade óssea (SEEMAN, DELMAS, 2006; SEEMAN, 2008). Ademais, é indicado que a área femoral mais frequentemente impactada em condições adversas é a região do contingente trabecular ósseo, principalmente o colo femoral e a superfície que se estende do trocânter maior ao trocânter menor (LENART, LORICH, LANE, 2008). O estudo recente de Li et al. (2023) detectou, 12 semanas após OVX, a perda de massa óssea e a diminuição da densidade óssea trabecular na porção distal dos fêmures examinados. O estudo também fez uso da técnica de western blot para medir os níveis de expressão de proteínas ligadas à formação e reabsorção óssea. Entre elas, OPG apresentou níveis mais baixos em animais com deficiência de estrógenos e sem tratamento. Paralelamente, foi observado uma elevação nos níveis de RANKL, corroborando um cenário de perda óssea acelerada. Vale considerar, no entanto, que nossos resultados revelaram aumento significativo do percentual de água no osso, enquanto reduzia a proporção de material mineral associado a OVX. Essas alterações são indicadores da qualidade óssea e permitem fazer inferências sobre a microestrutura trabecular, sugerindo uma estrutura óssea potencialmente mais porosa e, conseqüentemente, mais vulnerável a fraturas.

A resistência óssea também pode ser avaliada de acordo com a concentração dos minerais Ca e P que estão envolvidos na mineralização do tecido ósseo. Níveis elevados de Ca e P no soro sanguíneo são marcadores importantes de reabsorção óssea (ARABACI et al., 2015). Isso porque o aumento gradativo da perda óssea em uma situação adversa, é caracterizado pela redução de células osteoblásticas e diminuição da absorção de tais minerais pelo sistema esquelético, comprometendo sua rigidez (ZHU, LIU, REN, 2018). Foi verificado no presente estudo diminuição da concentração de Ca no tecido ósseo do GO, cerca de ~10,5% em relação ao GC, apoiando o efeito prejudicial da deficiência de estrógenos na reabsorção óssea de Ca, o que já foi apontado em várias pesquisas (CARDINALI et al., 2003). Em comparação ao GOM, a redução da média do conteúdo de Ca do GO foi de ~8,23%, indicando potencial cenário terapêutico da melatonina que, segundo investigado por Nakano et al. (2019), além de atuar no número e atividade das células ósseas, é um hormônio capaz de mediar a secreção de calcitonina no corpo, regulando o metabolismo do cálcio.

A partir dos resultados, pode-se demonstrar parcialmente a efetividade da melatonina em preservar a homeostase do tecido ósseo apesar dos efeitos negativos da ovariectomia. Tratando-se do modelo de rata OVX e da condição crônica do nosso experimento, a administração de melatonina demonstrou impactos em várias propriedades ósseas, frequentemente em oposição aos efeitos provocados pela OVX. Reunindo os parâmetros mensurados nas análises ósseas realizadas, MEL aumentou significativamente o comprimento do fêmur, demonstrando uma possível atuação em vias anabólicas ósseas que promovem a formação do tecido ósseo, ao passo que o desenvolvimento ósseo não foi modificado pela situação adversa hipoestrogênica durante o percurso deste experimento. No que tange às propriedades biomecânicas, MEL exibiu aumentos significativos na carga máxima suportada pelo osso em condições de flexão em três pontos na diáfise femoral. MEL também aumentou o percentual de material orgânico no osso, o que pode apontar para o seu papel na regulação da matriz orgânica do tecido ósseo, possivelmente melhorando sua qualidade e resiliência. Em contraste, MEL não apresentou efeitos significativos em aspectos como densidade óssea e mineral. Isso sugere que, embora a melatonina tenha exibido capacidade em modular algumas vias anabólicas, ela não atuou de forma generalizada para melhorar todas as propriedades ósseas.

Especificamente, ela não evitou o efeito negativo de desmineralização óssea associado à OVX. Contudo, deve-se reconhecer que nem todas as mudanças na estrutura óssea se refletem em alterações na densidade e composição bioquímica e é possível notar que a MEL contrabalanceou indicativos de perda óssea e degradação da matriz provocados pela

OVX. É o caso do aumento da porcentagem de água no osso nos animais em condição hipoestrogênica, o que é característico de um tecido ósseo mais poroso e, conseqüentemente, mais suscetível a fraturas. Com isso, tais dados apontam para o potencial da melatonina como método farmacológico nesse contexto de desequilíbrio, sendo capaz de neutralizar algumas respostas adversas ósseas provocadas pelo hipoestrogenismo e permitir que animais ovariectomizados apresentem propriedades ósseas mais próximas aos animais com níveis fisiológicos de estrógenos. Portanto, de modo geral, enquanto a OVX causou degradação óssea generalizada, MEL beneficiou certas propriedades ósseas, mas não compensou de maneira completa todos os efeitos deletérios da escassez de estrógenos na saúde do tecido. Nosso protocolo de administração da substância se mostrou efetivo em reduzir conseqüências negativas provocadas pela ovariectomia e concordamos que os conhecimentos acerca dos efeitos da MEL sobre o tecido ósseo em condição de hipoestrogenismo puderam ser aprofundados. Resultados mais expressivos e homogêneos sobre todo o tecido ósseo talvez possam ser identificados a partir de mudanças metodológicas, visto que ainda não há uma dose, duração e meio de uso da substância considerados ideais.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos, foi identificado significativa perda óssea em situação de déficit de estrógenos com redução da densidade óssea e mineral, aumento do teor de água óssea e diminuição do conteúdo mineral, propriedades que condicionam a qualidade óssea. Contudo, a administração de melatonina preveniu parcialmente os prejuízos ósseos apontados, sendo favorecida a resistência óssea dos animais que receberam a oferta hormonal, a qual foi evidenciada pelo teste mecânico, em que houve aumento significativo da carga máxima e da carga máxima no ponto de fratura suportada pelo osso. No entanto, o tratamento com o hormônio não foi efetivo para neutralizar ou reverter todas as conseqüências negativas da condição de déficit de estrógenos na saúde do tecido ósseo. Entre as propriedades, a melatonina não mostrou efeito significativo sobre valores de densidade óssea e mineral, os quais foram reduzidos nos animais OVX, condição esperada pela intensificação da reabsorção óssea que ocorre na escassez de estrógenos. Porém, ainda assim, o tratamento demonstrou um potencial efeito protetor da melatonina ao manter os valores dessas propriedades em níveis percentuais menos divergentes dos animais sem intervenções experimentais do que no grupo de animais apenas ovariectomizados. Ainda, quanto ao quadro de hipoestrogenismo, por mais que não sejam mudanças significantes, foi perceptível a menor força sustentada pelo osso, além de variações nas concentrações de minerais detectadas nos animais em estado de

prejuízo de estrógenos. Assim, entende-se que a melatonina foi parcialmente eficaz em preservar a homeostase osteometabólica apesar do efeito negativo da ovariectomia. Portanto, este estudo revelou que o tratamento crônico com melatonina manifestou evidências da potencialidade do hormônio na proteção da deterioração da qualidade óssea no contexto das desordens osteometabólicas provocada pela OVX, mas não foi suficiente para neutralizar todas as suas consequências em todas as propriedades analisadas.

REFERÊNCIAS

- ABOUFARD, G. M.; MADI, N. M.; EL-SAKA, M. H. Effect of melatonin on obesity and lipid profile in high fat-fed rats. **Journal of American Science**, v. 9, n. 10, 2013.
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapeineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, p. 2997-3025, 2014.
- ADEJUYIGBE, B. et al. Osteoporosis: molecular pathology, diagnostics, and therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 19, p. 14583, 2023.
- AMMANN, P. *et al.* Bone density and shape as determinants of bone strength in IGF-I and/or pamidronate-treated ovariectomized rats. **Osteoporosis International**, v. 6, n. 3, p. 219-227, 1996.
- AMMANN, P.; RIZZOLI, R. Bone strength and its determinants. **Osteoporosis International**, v. 14, n. 3, p. 13-18, 2003.
- AMSTRUP, A. K. *et al.* Melatonin and the skeleton. **Osteoporosis International**, v. 24, n. 12, p. 2919-2927, 2013.
- AMSTRUP, A. K. et al. Reduced fat mass and increased lean mass in response to 1 year of melatonin treatment in postmenopausal women: a randomized placebo-controlled trial. **Clinical Endocrinology**, v. 84, n. 3, p. 342-347, 2016.
- ANAGNOSTIS, P. et al. Estrogen and bones after menopause: a reappraisal of data and future perspectives. **Hormones**, v. 20, n. 1, p. 13-21, 2021.
- ARABACI, T. *et al.* Therapeutic effects of melatonin on alveolar bone resorption after experimental periodontitis in rats: a biochemical and immunohistochemical study. **Journal of Periodontology**, v. 86, n. 7, p. 874-881, 2015.
- ARNAL, J. et al. Membrane and nuclear estrogen receptor alpha actions: from tissue specificity to medical implications. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 3, p. 1045-1087, 2017.
- AVILA, M. E. *et al.* Effect of the 17 β -aminoestrogen pentolame on bone mineral levels in ovariectomized rats. **Proc West Pharmacol Soc.** p. 43-46. 2009.
- AVMA (American Veterinary Medical Association). AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. AVMA, Schaumburg, Illinois. Disponível em: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-01/2020-Euthanasia-Final-1-17-20.pdf>. Acesso em: 18 fevereiro 2024.
- BÄHR, I. et al. Evidence of the receptor-mediated influence of melatonin on pancreatic glucagon secretion via the G α q protein-coupled and PI3K signaling pathways. **Journal of Pineal Research**, v. 53, n. 4, p. 390-398, 2012.
- BAILEY, J. Does the stress of laboratory life and experimentation on animals adversely affect research data? A critical review. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 46, n. 5, p. 291-305, 2018.
- BALCOMBE, J. P.; BARNARD, N. D.; SANDUSKY, C. Laboratory routines cause animal stress. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 42-51, 2004.

- BAO, T. et al. Can melatonin improve the osteopenia of perimenopausal and postmenopausal women? A meta-analysis. **International Journal of Endocrinology**, v. 2019, 2019.
- BAXI, D. et al. Melatonin supplementation therapy as a potent alternative to ERT in ovariectomized rats. **Climacteric**, v. 15, n. 4, p. 382-392, 2012.
- BECK, W. R.; GOBATTO, C. A. Effects of maximum intensity aerobic swimming exercise until exhaustion at different times of day on the hematological parameters in rats. **Acta Physiologica Hungarica (Print)**, v. 100, p. 427-434, 2013.
- BECK, W. R. Resposta ergogênica da melatonina no nadir e acrofase da atividade espontânea e suas consequências na atividade da via IKK/NF- κ B e dano tecidual muscular. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, 2015A.
- BECK W. R. *et al.* Melatonin has an ergogenic effect but does not prevent inflammation and damage in exhaustive exercise. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2015B.
- BECK, W. R.; SCARIOT, P. P. M.; GOBATTO, C. A. Melatonin is an ergogenic aid for exhaustive aerobic exercise only during the wakefulness period. **International Journal of Sports Medicine**, v. 37, n. 01, p. 71-76, 2016.
- BECK W. R. *et al.* Acute melatonin administration enhances aerobic tolerance: an analysis of biochemical and hematological parameters. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 24, 2018.
- BIROCALE, A. M. et al. Bone mineral density is reduced by telmisartan in male spontaneously hypertensive rats. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 6, p. 1149-1153, 2016.
- BOLAMPERTI, S.; VILLA, I.; RUBINACCI, Alessandro. Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. **Bone Research**, v. 10, n. 1, p. 48, 2022.
- BONNICHSEN, M.; DRAGSTED, N.; HANSEN, A. Kornerup. The welfare impact of gavaging laboratory rats. **Animal welfare**, v. 14, n. 3, p. 223-227, 2005.
- BOUXSEIN, M. L.; KARASIK, D. Bone geometry and skeletal fragility. **Current osteoporosis Reports**, v. 4, n. 2, p. 49-56, 2006.
- BURR, D. B.; ROBLING, A. G.; TURNER, C. H. Effects of biomechanical stress on bones in animals. **Bone**, v. 30, n. 5, p. 781-786, 2002.
- BURR, D. B. Bone morphology and organization. In: Basic and applied bone biology. **Academic Press**, p. 3-26, 2019.
- CARDINALI, D. P.; VACAS, M. I.; BOYER, E. E. Specific binding of melatonin in bovine brain. **Endocrinology**, v. 105, n. 2, p. 437-441, 1979.
- CARDINALI, D. P. et al. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. **Journal of Pineal Research**, v. 34, n. 2, p. 81-87, 2003.
- CARRASCAL, L. et al. Role of melatonin in the inflammatory process and its therapeutic potential. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 14, p. 1563-1588, 2018.
- CAVALCANTI-DE-ALBUQUERQUE, J. P. A. et al. Role of estrogen on skeletal muscle mitochondrial function in ovariectomized rats: a time course study in different fiber types. **Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 7, p. 779-789, 2014.
- CECON, E.; OISHI, A.; JOCKERS, R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 16, p. 3263-3280, 2018.
- CHEN, B.; YOU, W.; SHAN, T. The regulatory role of melatonin in skeletal muscle. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 41, n. 2, p. 191-198, 2020.
- CHEN, L.; KO, N.; CHEN, K. Medical treatment for osteoporosis: From molecular to clinical opinions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2213, 2019.
- CHEN, W. et al. Melatonin restores the osteoporosis-impaired osteogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells by preserving SIRT1-mediated intracellular antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 146, p. 92-106, 2019.

- CHENG, C.; CHEN, L.; CHEN, K. Osteoporosis due to hormone imbalance: an overview of the effects of estrogen deficiency and glucocorticoid overuse on bone turnover. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1376, 2022.
- CHOI, D. Continuous melatonin attenuates the regressing activities of short photoperiod in male golden hamsters. **Development & Reproduction**, v. 17, n. 2, p. 111, 2013.
- CHOI, J. et al. Melatonin inhibits osteoclastogenesis and bone loss in ovariectomized mice by regulating PRMT1-mediated signaling. **Endocrinology**, v. 162, n. 6, 2021.
- CIPOLLA-NETO, J. *et al.* Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **Journal of pineal research**, v. 56, n. 4, p. 371-381, 2014.
- CUNHA, M. R. et al. Characterization of the physical and mechanical properties of femoral bone defects filled with polyanionic collagen scaffolds in ovariectomized rats. **Materials Research**, v. 13, n. 2, p. 239-244, 2010.
- CUNHA, M. R. et al. Characterization of the physical and mechanical properties of femoral bone defects filled with polyanionic collagen scaffolds in ovariectomized rats. **Materials Research**, v. 13, n. 2, p. 239- 244, 2010.
- DANIELSEN, C. C.; MOSEKILDE, L.; SVENSTRUP, B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. **Calcified tissue international**, v. 52, n. 1, p. 26-33, 1993.
- DE CARVALHO F. P., *et al.* Voluntary running decreases nonexercise activity in lean and diet-induced obese mice. **Physiology & behavior**. v. 165, p. 249-256, 2016.
- DE MEIJER, V. E. *et al.* Repetitive orogastric gavage affects the phenotype of diet-induced obese mice. **Physiology & behavior**, v. 100, n. 4, p. 387-393, 2010.
- DEIF, M. M.; FAWZY, E. M.; GAD, H. Effect of melatonin on some bone turnover markers in ovariectomized rats. **Bull. Alex. Fac. Med**, v. 43, n. 2, p. 248-257, 2007.
- DEMAYO, FRANCESCO J. et al. Mechanisms of action of estrogen and progesterone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 955, n. 1, p. 48-59, 2002.
- DERIGGI-PISANI, G. F. et al. Role of resistance training in bone macro and micro damages in an estrogen absence animal model. **Life Sciences**, v. 317, p. 121417, 2023.
- DEUTSCH-FELDMAN, M. et al. Effects of handling and vehicle injections on adrenocorticotrophic and corticosterone concentrations in Sprague–Dawley compared with Lewis rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 54, n. 1, p. 35-39, 2015.
- DOBLARÉ, M.; GARCIA, J. M.; GÓMEZ, M. J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. **Engineering Fracture Mechanics**, v. 71, n. 13-14, p. 1809-1840, 2004.
- ENNS, D. L.; TIIDUS, P. M. The influence of estrogen on skeletal muscle. **Sports Medicine**, v. 40, n. 1, p. 41-58, 2010.
- FABRICIO, V. Avaliação dos efeitos do resveratrol sobre o tecido ósseo de ratas ovariectomizadas. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, 2014.
- FAIENZA, M. F., et al. Postmenopausal osteoporosis: the role of immune system cells. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, p. 575-936, 2013.
- FARIA, V. S. Administração aguda de melatonina na performance e recuperação metabólica após esforço exaustivo: uma investigação sobre o metabolismo intermediário. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, 2021A.
- FARIA, V. S. *et al.* Acute melatonin administration improves exercise tolerance and the metabolic recovery after exhaustive effort. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2021B.
- FARIA, V. S. et al. Influence of Acute Melatonin Administration on Human Physical Performance: A Systematic Review. **Sports Health**, v. 16, n. 1, p. 70-78, 2024.
- FARMAN, H. H. et al. Female mice lacking estrogen receptor- α in hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) neurons display enhanced estrogenic response on cortical bone mass. **Endocrinology**, v. 157, n. 8, p. 3242-3252, 2016.

- FDA (US Food and Drug Administration) *et al.* Osteoporosis: nonclinical evaluation of drugs intended for treatment. Guidance for industry, 2016. Disponível em: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Osteoporosis---Nonclinical-Evaluation-of-Drugs-Intended-for-Treatment-Guidance-for-Industry.pdf>. Acesso em: 20 janeiro 2024.
- FERNÁNDEZ VÁZQUEZ, G.; REITER, R. J.; AGIL, A. Melatonin increases brown adipose tissue mass and function in Zucker diabetic fatty rats: implications for obesity control. **Journal of pineal research**, v. 64, n. 4, p. e12472, 2018.
- FONSECA, H. *et al.* Changes In Femoral Bone Geometry Compensate The Lower Bone Mass And Mineralization Degree In Ovariectomized Wistar Rats. 2012.
- FRANCISCO, J. I. *et al.* Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 2, p. 189-196, 2011.
- FUENTES, N.; SILVEYRA, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 116, p. 135-170, 2019.
- GENNARI, L.; MERLOTTI, D.; NUTI, R. Aromatase activity and bone loss. *Advances in clinical chemistry*, v. 54, p. 129-164, 2011.
- GHAREGHANI, M. *et al.* Melatonin therapy reduces the risk of osteoporosis and normalizes bone formation in multiple sclerosis. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 181-187, 2018.
- GOLAN, K. *et al.* Daily onset of light and darkness differentially controls hematopoietic stem cell differentiation and maintenance. *Cell stem cell*, v. 23, n. 4, p. 572-585. e7, 2018.
- GOODMAN, H. M. **Basic medical endocrinology**. 4 ed. China: Academic Press, 2009.
- GUAN, Q. *et al.* Mechanisms of melatonin in obesity: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 218, 2021.
- GUAN, H. *et al.* Melatonin increases bone mass in normal, perimenopausal, and postmenopausal osteoporotic rats via the promotion of osteogenesis. **Journal of Translational Medicine**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2022.
- GUO, H. *et al.* The critical period for neuroprotection by estrogen replacement therapy and the potential underlying mechanisms. **Current Neuropharmacology**, v. 18, n. 6, p. 485-500, 2020.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- HALBE, H. W. Biossíntese dos estrogênios. **Revista de Medicina**, v. 49, n. 4, p. 226-234, 1965.
- HAMMOND, G. L. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 3, p. 431-441, 2011.
- HARDELAND, R. Aging, melatonin, and the pro-and anti-inflammatory networks. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1223, 2019.
- HERNÁNDEZ-PLATA, E. *et al.* Melatonin reduces lead levels in blood, brain and bone and increases lead excretion in rats subjected to subacute lead treatment. **Toxicology letters**, v. 233, n. 2, p. 78-83, 2015.
- HETEMÄKI, N. *et al.* Adipose tissue estrogen production and metabolism in premenopausal women. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 209, p. 105849, 2021.
- HISTING, T. *et al.* Melatonin impairs fracture healing by suppressing RANKL-mediated bone remodeling. **Journal of Surgical Research**, v. 173, n. 1, p. 83-90, 2012.
- HUANG, J. *et al.* Combined Effects of Low-Frequency Pulsed Electromagnetic Field and Melatonin on Ovariectomy-Induced Bone Loss in Mice. **Bioelectromagnetics**, v. 42, n. 8, p. 616-628, 2021.

- IGARASHI-MIGITAKA, J. et al. Oral administration of melatonin contained in drinking water increased bone strength in naturally aged mice. **Acta Histochemica**, v. 122, n. 6, p. 151596, 2020.
- IORGA, A. et al. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. **Biology of Sex Differences**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2017.
- JENSEN, V. F. H. *et al.* Changes in bone mass associated with obesity and weight loss in humans: applicability of animal models. **Bone**, v. 145, p. 115781, 2021.
- JIANG, J. M. Y.; SACCO, S. M.; WARD, W. E. Ovariectomy-induced hyperphagia does not modulate bone mineral density or bone strength in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 11, p. 2106-2110, 2008.
- JIN, H. *et al.* The role of melatonin in sarcopenia: Advances and application prospects. **Experimental Gerontology**, v. 149, p. 111319, 2021.
- KALU, D. N. *et al.* The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. **Endocrinology**, v. 124, n. 1, p. 7-16, 1989.
- KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and Mineral**, v. 15, n. 3, p. 175-191, 1991.
- KATZER, K. et al. Lipedema and the potential role of estrogen in excessive adipose tissue accumulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11720, 2021.
- KEENAN, M. J. et al. Comparison of bone density measurement techniques: DXA and Archimedes' principle. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 11, p. 1903-1907, 1997.
- KERLIKOWSKE, K. et al. Breast cancer risk by breast density, menopause, and postmenopausal hormone therapy use. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 24, p. 3830, 2010.
- KIM, H. J. et al. Suppression of osteoclastogenesis by melatonin: A melatonin receptor-independent action. **International journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1142, 2017.
- KIM, S. et al. Melatonin attenuates RANKL-induced osteoclastogenesis via inhibition of Atp6v0d2 and DC-STAMP through MAPK and NFATc1 signaling pathways. **Molecules**, v. 27, n. 2, p. 501, 2022.
- KOEBELE, S. V.; BIMONTE-NELSON, H. A. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. **Maturitas**, v. 87, p. 5-17, 2016.
- KOMORI, T. Animal models for osteoporosis. **European journal of pharmacology**, v. 759, p. 287-294, 2015.
- KOTLARCZYK, M. P. et al. Melatonin osteoporosis prevention study (MOPS): a randomized, double-blind, placebo-controlled study examining the effects of melatonin on bone health and quality of life in perimenopausal women. **Journal of Pineal Research**, v. 52, p. 414-426, 2012.
- KRAHN, D. D.; GOSNELL, B. A.; MAJCHRZAK, M. J. The anorectic effects of CRH and restraint stress decrease with repeated exposures. **Biological psychiatry**, v. 27, n. 10, p. 1094-1102, 1990.
- LADIZESKY, M. G. et al. Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. **Life sciences**, v. 70, n. 5, p. 557-565, 2001.
- LADIZESKY, M. G. *et al.* Melatonin increases oestradiol-induced bone formation in ovariectomized rats. **Journal of Pineal Research**, v. 34, n. 2, p. 143-151, 2003.
- LARA-CASTILLO, N. Estrogen signaling in bone. **Applied Sciences**, v. 11, n. 10, p. 4439, 2021.
- LEA, C. K. et al. Aromatase cytochrome P450 transcripts are detected in fractured human bone but not in normal skeletal tissue. **Bone**, v. 21, n. 5, p. 433-440, 1997.

- LENART, B. A.; LORICH, D. G.; LANE, J. M. Atypical fractures of the femoral diaphysis in postmenopausal women taking alendronate. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 12, p. 1304-1306, 2008.
- LESPESSAILLES, E. et al. Does exercise modify the effects of zoledronic acid on bone mass, microarchitecture, biomechanics, and turnover in ovariectomized rats?. **Calcified tissue international**, v. 85, n. 2, p. 146-157, 2009.
- LEWIECKI, E. M.; BORGES, J. L. C. Bone density testing in clinical practice. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 4, p. 586-595, 2006.
- LI, K. et al. Elevated ambient temperature retards the atrophic response of the neuroendocrine-reproductive axis of male Syrian hamsters to either daily afternoon melatonin injections or to short photoperiod exposure. **Neuroendocrinology**, v. 45, n. 5, p. 356-362, 1987.
- LI, M.; SHEN, Y.; WRONSKI, T. J. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. **Bone**, v. 20, n. 1, p. 55-61, 1997.
- LI, T. et al. Melatonin: Another avenue for treating osteoporosis? **Journal of Pineal Research**, v. 66, n. 2, p. e12548, 2019.
- LI, T. *et al.* Validation of day and night delivery of melatonin in a rat ovariectomized model of osteoporosis. 2022.
- LI, T. et al. Daytime administration of melatonin has better protective effects on bone loss in ovariectomized rats. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 18, n. 1, p. 234, 2023.
- LIANG, R. *et al.* Differential effects of selective estrogen receptor modulators on the vagina and its supportive tissues. **Menopause**, v. 23, n. 2, p. 129-137, 2016.
- LIEDERT, A. et al. Effects of estrogen receptor and Wnt signaling activation on mechanically induced bone formation in a mouse model of postmenopausal bone loss. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 21, p. 8301, 2020.
- LIGHTFOOT, J. T. Sex hormones' regulation of rodent physical activity: a review. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 126, 2008.
- LINO, A. D. de S. et al. Resistance training and caloric restriction prevent systolic blood pressure rise by improving the nitric oxide effect on smooth muscle and morphological changes in the aorta of ovariectomized rats. **PloS one**, v. 13, n. 8, p. e0201843, 2018.
- LIU, J.; HUANG, F.; HE, H. Melatonin effects on hard tissues: bone and tooth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 10063-10074, 2013.
- LIU, X. L. *et al.* Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture. **Clinical oral implants research**, v. 26, n. 4, p. 392-398, 2015.
- LU, X. et al. Insight into the roles of melatonin in bone tissue and bone-related diseases. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 47, n. 5, p. 1-19, 2021.
- LUCHETTI, F. et al. Melatonin regulates mesenchymal stem cell differentiation: a review. *Journal of pineal research*, v. 56, n. 4, p. 382-397, 2014.
- MACHHOLZ, E. et al. Manual restraint and common compound administration routes in mice and rats. **Journal of Visualized Experiments**, n. 67, p. e2771, 2012.
- MALAKOTI, F. *et al.* The role of melatonin in bone regeneration: A review of involved signaling pathways. **Biochimie**, 2022.
- MAO, H. et al. Metabolomics and physiological analysis of the effect of calcium supplements on reducing bone loss in ovariectomized rats by increasing estradiol levels. **Nutrition & Metabolism**, v. 18, p. 1-14, 2021.
- MARIA, S. *et al.* Biological effects of melatonin on osteoblast/osteoclast cocultures, bone, and quality of life: Implications of a role for MT 2 melatonin receptors, MEK 1/2, and MEK 5 in melatonin-mediated osteoblastogenesis. **Journal of Pineal Research**, v. 64, n. 3, p. e12465, 2018.

- MEDINA-CONTRERAS, J. M. L. *et al.* Ovariectomized rodents as a menopausal metabolic syndrome model. A minireview. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 475, n. 1, p. 261-276, 2020.
- MELMED, S. *et al.* **Williams textbook of endocrinology**. 13 ed. Canada: Elsevier, 2016.
- MENKES, A. *et al.* Strength training increases regional bone mineral density and bone remodeling in middle-aged and older men. **Journal of Applied Physiology**, v. 74, n. 5, p. 2478-2484, 1993.
- MEYER JR, R. A. *et al.* Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. **Journal of orthopaedic research**, v. 19, n. 3, p. 428-435, 2001.
- MILLER, V. M. *et al.* Estrogen therapy and thrombotic risk. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 3, p. 792-807, 2006.
- MOHAMAD, N.; SOELAIMAN, I.; CHIN, K. A concise review of testosterone and bone health. **Clinical Interventions in Aging**, p. 1317-1324, 2016.
- MUHAMMAD, S. I. *et al.* Bone mass density estimation: Archimede's principle versus automatic X-ray histogram and edge detection technique in ovariectomized rats treated with germinated brown rice bioactives. **Clinical Interventions in Aging**, v. 8, p. 1421, 2013.
- MUNMUN, F.; WITT-ENDERBY, P. A. Melatonin effects on bone: implications for use as a therapy for managing bone loss. **Journal of Pineal Research**, v. 71, n. 1, p. e12749, 2021.
- MURAT, Ö.; ÖNDER, Ç. The effects of exogenous melatonin administration on bone in ovariectomized and pinealectomized rats. **Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology**, v. 46, n. 6, p. 933-937, 2019.
- MURPHY, S. J. *et al.* The effect of brief halothane anesthesia during daily gavage on complications and body weight in rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 40, n. 2, p. 9-12, 2001.
- NAKANO, M. *et al.* Suppressive effect of melatonin on osteoclast function via osteocyte calcitonin. **Journal of Endocrinology**, v. 242, n. 2, p. 13-23, 2019.
- NELSON, L. R.; BULUN, S. E. Estrogen production and action. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, n. 3, p. S116-S124, 2001.
- OAKLEY, O. R. *et al.* Estradiol synthesis in gut-associated lymphoid tissue: leukocyte regulation by a sexually monomorphic system. **Endocrinology**, v. 157, n. 12, p. 4579-4587, 2016.
- OHLSSON, C. *et al.* Growth hormone and bone. **Endocrine reviews**, v. 19, n. 1, p. 55-79, 1998.
- ORYAN, A.; MONAZZAH, S.; BIGHAM-SADEGH, A. The effects of melatonin in bone healing. **Research in Veterinary Science**, v. 3, n. 2, p. 000155, 2018.
- OSTROWSKA, Z. *et al.* Influence of pinealectomy and long-term melatonin administration on GH-IGF-I axis function in male rats. **Neuroendocrinology Letters**, v. 22, n. 4, p. 255-262, 2001.
- OZTOPUZ, O. *et al.* Melatonin ameliorates sodium valproate-induced hepatotoxicity in rats. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 1, p. 317-325, 2020.
- PACHECO-COSTA, R. *et al.* Modifications in bone matrix of estrogen-deficient rats treated with intermittent PTH. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- PALMER, B. F.; CLEGG, D. J. The sexual dimorphism of obesity. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 402, p. 113-119, 2015.
- PATERNI, I. *et al.* Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. **Steroids**, v. 90, p. 13-29, 2014.
- PATLAS, N. *et al.* Oophorectomy-induced osteopenia in rats in relation to age and time post-oophorectomy. **Cells Tissues Organs**, v. 166, n. 3, p. 267-274, 2000.

- PEJON, T. M. M. Efeito do treinamento aeróbio de natação no conteúdo de GLUT4 e FAT CD36 e metabolismo energético de ratas ovariectomizadas. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.
- PEJON, T. M. M. et al. Moderate intensity swimming training on bone mineral density preservation under food restriction in female rats. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 26, n. 4, 2020.
- PEJON, T. M. M. et al. Effect of 12-wk training in ovariectomised rats on PGC-1 α , NRF-1 and energy substrates. **International Journal of Sports Medicine**, 2022A.
- PEJON, T. M. M. *et al.* Effects of moderate-intensity physical training on skeletal muscle substrate transporters and metabolic parameters of ovariectomized rats. **Metabolites**, v. 12, n. 5, p. 402, 2022B.
- PEJON, T. M. M. et al. Effects of 12-weeks of daily melatonin administration on inflammatory markers and adipose tissue mass of rats under hypoestrogenism. **Medicina**, v. 60, n. 5, p. 740, 2024.
- PFEILSCHIFTER, J. et al. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 1, p. 90-119, 2002.
- POLISEL, E. E. C. et al. Effects of high-intensity interval training in more or less active mice on biomechanical, biophysical and biochemical bone parameters. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2021.
- PORCARI, J.; BRYANT, C.; COMANA, F. **Exercise physiology**. FA Davis, 2015.
- PRUNET-MARCASSUS, B. *et al.* Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5347-5352, 2003.
- RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, M. P. et al. Melatonin promotes angiogenesis during repair of bone defects: a radiological and histomorphometric study in rabbit tibiae. **Clinical oral investigations**, v. 17, n. 1, p. 147-158, 2013.
- RASMUSSEN, D. D. *et al.* Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. **Endocrinology**, v. 140, n. 2, p. 1009-1012, 1999.
- REITER, R. J. et al. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, n. 1, p. 376-386, 2000.
- REITER, R. J.; TAN, D.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: a multitasking molecule. **Progress in Brain Research**, v. 181, p. 127-151, 2010.
- RENNO, A. C. M. *et al.* Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. **Experimental gerontology**, v. 42, n. 6, p. 517-522, 2007.
- RETTBERG, J. R.; YAO, J.; BRINTON, R. D. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 8-30, 2014.
- RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON III, L. J. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. **Journal of bone and mineral research**, v. 13, n. 5, p. 763-773, 1998.
- ROTH, J. A. *et al.* Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 31, p. 22041-22047, 1999.
- SADADIWALA, M. H.; SADADIWALA, A. Effects of melatonin on bone: a case control study. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 10, n. 8, p. 1703, 2022.
- SANCHEZ-MATEOS, S. *et al.* Melatonin and estradiol effects on food intake, body weight, and leptin in ovariectomized rats. **Maturitas**, v. 58, n. 1, p. 91-101, 2007.
- SANTOS, M. A. et al. Effects of different doses of soy isoflavones on bone tissue of ovariectomized rats. **Climacteric**, v. 17, n. 4, p. 393-401, 2014.

- SAUL, D. *et al.* Effect of the lipoxygenase inhibitor baicalein on muscles in ovariectomized rats. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2016, 2016.
- SEEMAN, E. Modeling and remodeling: the cellular machinery responsible for the gain and loss of bone's material and structural strength. **Principles of Bone Biology**, p. 1-28, 2008.
- SEEMAN, E.; DELMAS, P. D. Bone quality: the material and structural basis of bone strength and fragility. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 21, p. 2250-2261, 2006.
- SHARAN, K. *et al.* Regulation of bone mass through pineal-derived melatonin-MT 2 receptor pathway. **Journal of Pineal Research**, v. 63, n. 2, p. e12423, 2017.
- SHARP, J. L. *et al.* Stress-like responses to common procedures in male rats housed alone or with other rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 41, n. 4, p. 8-14, 2002.
- SHERK, V. D. *et al.* Impact of Exercise and Activity on Weight Regain and Musculoskeletal Health PostOVX. **Medicine and science in sports and exercise**, n.12, p. 2465-2473, 2019.
- SIMPSON, E. R. Sources of estrogen and their importance. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 86, n. 3-5, p. 225-230, 2003.
- SLOMINSKI, R. M. *et al.* Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 2, p. 152-166, 2012.
- SOUSA, C. E. C. de. Caracterização do eixo imune-pineal: mecanismo de ação do controle da função pineal pela citocina pró-inflamatória TNF. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, 2011.
- STILLWELL, W. An introduction to biological membranes: composition, structure and function. **Elsevier**, 2016.
- SUN, Y. *et al.* Risk factors and preventions of breast cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 11, p. 1387, 2017.
- TAN, D. *et al.* Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1472, n. 1-2, p. 206-214, 1999.
- TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1504-1508, 2000.
- THOMAS, A. P. *et al.* Administration of melatonin and metformin prevents deleterious effects of circadian disruption and obesity in male rats. **Endocrinology**, v. 157, n. 12, p. 4720-4731, 2016.
- TOUITOU, Y. Human aging and melatonin. Clinical relevance. **Experimental Gerontology**, v. 36, n. 7, p. 1083-1100, 2001.
- TRESGUERRES, I. F. *et al.* Melatonin dietary supplement as an anti-aging therapy for age-related bone loss. **Rejuvenation research**, v. 17, n. 4, p. 341-346, 2014.
- TU, K. N. *et al.* Osteoporosis: a review of treatment options. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 43, n. 2, p. 92, 2018.
- TURNER, P. V. *et al.* Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 600-613, 2011.
- TURNER, P. V. *et al.* Oral gavage in rats: animal welfare evaluation. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 51, n. 1, p. 25-30, 2012.
- USLU, S. *et al.* Constructive effect of exogenous melatonin against osteoporosis after ovariectomy in rats. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 29, n. 5, p. 317-325, 2007.
- VILAR, L. *et al.* **Endocrinologia clínica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
- WANG, B. *et al.* Regulation effects of melatonin on bone marrow mesenchymal stem cell differentiation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 2, p. 1008-1015, 2019.

- WHO (World Health Organization) *et al.* Guidelines for preclinical evaluation and clinical trials in osteoporosis. 1998. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42088/9241545224_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 02 fevereiro 2024.
- WHO Scientific Group on Prevention and Management of Osteoporosis. Prevention and management of osteoporosis: report of a WHO scientific group. World Health Organization, 2003. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42841/WHO_TRS_921.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 13 fevereiro 2024.
- WRONSKI, T. J. *et al.* Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. **Calcified Tissue International**, v. 40, n. 3, p. 155-159, 1987.
- WRONSKI, T. J. *et al.* Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. **Calcified tissue international**, v. 45, n. 6, p. 360-366, 1989.
- WRONSKI, T. J.; CINTRON, M.; DANN, L. M. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Calcified tissue international**, v. 43, n. 3, p. 179-183, 1988.
- XIE, Ying *et al.* Melatonin enhances osteoblastogenesis of senescent bone marrow stromal cells through NSD2-mediated chromatin remodelling. *Clinical and Translational Medicine*, v. 12, n. 2, p. e746, 2022.
- XU, L. *et al.* Melatonin suppresses estrogen deficiency-induced osteoporosis and promotes osteoblastogenesis by inactivating the NLRP3 inflammasome. **Calcified Tissue International**, v. 103, n. 4, p. 400-410, 2018.
- YAMAZAKI, I.; YAMAGUCHI, H. Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 4, n. 1, p. 13-22, 1989.
- YANG, K. *et al.* The role of melatonin in the development of postmenopausal osteoporosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 975181, 2022.
- YELESWARAM, K. *et al.* Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. **Journal of Pineal Research**, v. 22, n. 1, p. 45-51, 1997.
- YOUSEFZADEH, N. *et al.* Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. **EXCLI journal**, v. 19, p. 89, 2020.
- ZARROW, X. *Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques*. New York: Academic Press, 1964.
- ZHU, F.; LIU, Z.; REN, Y. Mechanism of melatonin combined with calcium carbonate on improving osteoporosis in aged rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 16, n. 1, p. 192-196, 2018.

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Melatonina como potencializadora dos efeitos do treinamento físico sobre parâmetros biomoleculares do metabolismo energético sob hipoestrogenismo", protocolada sob o CEUA nº 1694190521 (ID 001569), sob a responsabilidade de **Wladimir Rafael Beck e equipe; Taciane Maria Melges Pejon** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 23/08/2021.

We certify that the proposal "Melatonin as potentiator of the physical training effects on biomolecular parameters of energy metabolism under hypoestrogenism", utilizing 135 Heterogenics rats (135 females), protocol number CEUA 1694190521 (ID 001569), under the responsibility of **Wladimir Rafael Beck and team; Taciane Maria Melges Pejon** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 08/23/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 08/2021 a 08/2023

Área: Centro de Ciências Biológicas E da Saúde

Origem: [Biotério Central da UFSCar](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [40 a 45 dias](#)

N: [135](#)

Linhagem: [wistar](#)

Peso: [120 a 150 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico / Departamento de Ciências Fisiológicas / UFSCar.

São Carlos, 23 de agosto de 2021

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos