

FÁTIMA CORRÊA SANDMANN AFONSO

EFEITOS PROTETORES DA MELATONINA NA MICROARQUIETURA ÓSSEA EM
RATAS OVARIECTOMIZADAS: INSIGHTS A PARTIR DA HISTOMORFOMETRIA

CURITIBA
2025

FÁTIMA CORRÊA SANDMANN AFONSO

EFEITOS PROTETORES DA MELATONINA NA MICROARQUIETURA ÓSSEA EM
RATAS OVARIECTOMIZADAS: INSIGHTS A PARTIR DA HISTOMORFOMETRIA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Medicina Interna.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Aguiar
Moreira

Coorientador: Prof. Dr. Vicente Florentino
Castaldo Andrade

CURITIBA
2025

F256 Afonso, Fátima Corrêa Sandmann
Efeitos protetores da melatonina na microarquitura óssea em ratas ovariectomizadas: insights a partir da histomorfometria [recurso eletrônico] / Fátima Corrêa Sandmann Afonso. – Curitiba, 2025.
80 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, 2025.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Aguiar Moreira.

Coorientador: Prof. Dr. Vicente Florentino Castaldo Andrade.

1. Osteoporose. 2. Melatonina. 3. Ovariectomia. 4. Remodelação Óssea. 5. Modelos Animais de Doenças. 6. Imuno-Histoquímica. 7. Reabsorção Óssea. I. Universidade Federal do Paraná. II. Moreira, Carolina Aguiar. III. Andrade, Vicente Florentino Castaldo. IV. Título.

NLMC: WE 250

Catálogo na fonte elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFPR,
Biblioteca de Ciências da Saúde – SD, com os dados fornecidos pela autora.
Bibliotecária: Nayara Késsia Veras Lemos CRB-9/2207



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FATIMA CORREA SANDMANN AFONSO**, intitulada: **EFEITOS PROTETORES DA MELATONINA NA MICROARQUIETURA ÓSSEA EM**

RATAS OVARECTOMIZADAS: INSIGHTS A PARTIR DA HISTOMORFOMETRIA, sob orientação da Profa. Dra. CAROLINA AGUIAR MOREIRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 14 de Novembro de 2025.

Assinatura Eletrônica
17/11/2025 12:51:55.0
CAROLINA AGUIAR MOREIRA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
26/11/2025 21:33:58.0
BARBARA CAMPOLINA CARVALHO SILVA
Avaliador Externo (FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE
BELO HORIZONTE)

Assinatura Eletrônica
17/11/2025 10:23:31.0
VICTÓRIA ZEGHBI COCHENSKI BORBA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
17/11/2025 13:20:53.0
TAYANE MUNIZ FIGHERA
Avaliador Externo (HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE)

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio José Sandmann (*in memoriam*) e Branca Gonçalves Corrêa, pelo exemplo de dedicação e valores que me guiaram. Aos meus orientadores, Carolina e Vicente, cuja orientação, paciência e incentivo tornaram possível a realização desta pesquisa. E em especial à minha pequena família Rogério Afonso, Mateus e Fabiano Sandmann Afonso, pelo apoio, pelas brincadeiras e carinho em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de todo o coração à minha orientadora, Dra. Carolina Aguiar Moreira, pelo convite para integrar o projeto sobre a melatonina e sua inter-relação com o metabolismo ósseo. Esta trajetória foi repleta de aprendizado, dedicação e busca por aprimoramento, abrindo-me as portas para uma nova e inspiradora área de atuação no campo do Metabolismo Ósseo e no Laboratório PRO (Patologia Renal e Óssea) do Instituto Pró-Renal, onde encontrei propósito, acolhimento e renovação profissional.

Ao Dr. Vicente Florentino Castaldo Andrade, meu coorientador, por todas as correções e observações nos textos desenvolvidos, pelos ensinamentos em análise estatística, pela realização das análises e elaboração dos gráficos dos nossos estudos, pelas inúmeras revisões dos artigos, pelas sugestões e por ser, junto com o Dr. Hans Graf, o meu mestre mais antigo dentro da Endocrinologia. Ambos me acolheram no SAM 4, e a partir dali a Endocrinologia passou a fazer parte da minha vida.

À Fundação Pró-Renal, ao Centro de Pesquisa Acadêmica do Instituto Pró-Renal, a todos os participantes do Centro de Pesquisa e, em especial, à Sra. Anelise Marcolin, por todo o apoio e pela oportunidade de por meio do meu trabalho no Laboratório PRO (Patologia Renal e Óssea), desenvolver minha pesquisa para o Doutorado.

Ao SEMPR — Serviço de Endocrinologia e Metabologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), centro de excelência reconhecido nacional e internacionalmente na Endocrinologia. Tenho imenso orgulho de ser filha dessa casa. No SEMPR, realizei a Residência em Endocrinologia e Metabologia, preparei-me para a prova de título, concluí o mestrado e acompanhei os ambulatórios de Obesidade, Cirurgia Bariátrica e, mais recentemente, o de Osteometabolismo.

Aos meus mestres do SEMPR: Dra. Carolina Aguiar Moreira, Dr. Cesar Luiz Boguszewski, Dr. Cleo Mesa Jr., Dr. Hans Graf, Dr. Henrique Suplicy, Dr. Hungria, Dra. Rosana Radominski, Dra. Rosângela Réa, Dr. Vicente Florentino Castaldo Andrade e Dra. Victoria Cochenski Borba.

A todos os participantes do projeto de estudo dos Efeitos da Melatonina em ratas *Wistar* ovariectomizadas, em especial à Dra. Thais Costa Casagrande, coordenadora do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Positivo (UP), por tudo o que aprendi em relação ao manejo dos animais; à médica-veterinária Dra. Ângela Reck; ao médico-veterinário Felipe Boaventura; às colegas do curso de Biomedicina — Rafaela Ceron, Rafaela Corrêa e Rafaela Vale — ; às colegas da Odontologia — Letícia Capote dos Santos e Gabrielle Gonçalves; — e à Dra. Liliane Roskamp, do Curso de Odontologia da Universidade Tuiuti do Paraná.

À Dra. Márcia Olandoski e ao Dr. Vicente Florentino Castaldo Andrade, pela condução da análise estatística, pelo esclarecimento de dúvidas e pelas discussões dos resultados.

Às professoras Maritana Mela Prodocimo e Lorena Bavia, do Laboratório de Toxicologia Celular da Universidade Federal do Paraná, pela realização das dosagens do marcador CTX e pelo valioso apoio na discussão dos resultados.

A todos os professores da Pós-Graduação, pelos ensinamentos e pela dedicação durante o período da pandemia, bem como aos colegas de turma, mesmo que “virtuais”, pelo apoio, pelas trocas e por toda a colaboração ao longo dessa jornada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (PPGMICS/UFPR), pela oportunidade de integrar este programa de excelência. Manifesto minha especial gratidão à Dra. Viviane Zétola e à Dra. Victoria Cochenski Borba pelo apoio, pelos ensinamentos e pelo incentivo ao longo dessa trajetória.

Em cada desafio, encontrei propósito; em cada conquista, a confirmação de que nada foi em vão. Agradeço a Deus por ter sustentado meus passos, iluminado meu caminho. A todas as mulheres que transformam dedicação em ciência e força em esperança.

*“Que darei ao Senhor
por toda sua bondade para comigo? (Salmo 116:12)*

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – 5-hidroxitriptamina (serotonina) (5-hydroxytryptamine (serotonin))
5-HTP – 5-hidroxitriptofano (5-hydroxytryptophan)
Aj.AR – taxa de aposição ajustada (adjusted apposition rate)
Akt – proteína quinase B (protein kinase B)
ALP – fosfatase alcalina (alkaline phosphatase)
ALT – alanina aminotransferase (alanine aminotransferase)
ANOVA – análise de variância (analysis of variance)
Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brazilian Health Regulatory Agency)
ASBMR – Sociedade Americana de Pesquisa Óssea e Mineral (American Society for Bone and Mineral Research)
ATF4 – fator de transcrição ativador 4 (activating transcription factor 4)
AUC – área sob a curva
 β -catenina – beta-catenina
BFR/BS – taxa de formação óssea por superfície óssea (bone formation rate/bone surface)
BMP – proteína(s) morfogenética(s) óssea(s) (bone morphogenetic protein(s))
BMP2 – proteína morfogenética óssea 2 (bone morphogenetic protein 2)
BMP6 – proteína morfogenética óssea 6 (bone morphogenetic protein 6)
BS – superfície óssea (bone surface)
BV/TV – volume ósseo/volume total do tecido (bone volume/tissue volume)
CEUA-UP – Comissão de Ética no Uso de Animais – Universidade Positivo (Ethics Committee on Animal Use – Positivo University)
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (National Council for the Control of Animal Experimentation)
Ct.Po.Ar – área de porosidade cortical (cortical porosity area)
Ct.Po.N – número de poros corticais (cortical porosity number)
Ct.Th – espessura cortical (cortical thickness)
CTX – telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo I (C-terminal telopeptide of type I collagen)
DMO – densidade mineral óssea (bone mineral density)
ECR – ensaio clínico randomizado (randomized clinical trial)
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético (ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA – ensaio imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay)
ER α – receptor de estrogênio alfa (estrogen receptor alpha)
ER β – receptor de estrogênio beta (estrogen receptor beta)
ERK1/2 – quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2)
ERK5 – quinase regulada por sinal extracelular 5 (extracellular signal-regulated kinase 5)
ES/BS – superfície de erosão/superfície óssea (eroded surface/bone surface)
FA – fosfatase alcalina (alkaline phosphatase)
GLUT4 – transportador de glicose tipo 4 (glucose transporter type 4)
HbA1c – hemoglobina glicada (glycated hemoglobin)
HO – histomorfometria óssea (bone histomorphometry)
hMSCs – células-tronco mesenquimais humanas (human mesenchymal stem cells)
hPBMCs – células mononucleares do sangue periférico humano (human peripheral blood mononuclear cells)

HRP –peroxidase (horseradish peroxidase)
IHQ – imuno-histoquímica (immunohistochemistry)
IMC – índice de massa corporal
ITGB1 – integrina beta-1
K2 – vitamina K2 (menaquinona) (vitamin K2 (menaquinone))
MAPK – proteína quinase ativada por mitógenos (mitogen-activated protein kinase)
MAPK1 – proteína quinase ativada por mitógeno 1 (mitogen-activated protein kinase 1)
MAPK3 – proteína quinase ativada por mitógeno 3 (mitogen-activated protein kinase 3)
MAPK7 – proteína quinase ativada por mitógeno 7 (mitogen-activated protein kinase 7)
MAR – taxa de aposição mineral (mineral apposition rate)
MMP-2 – metaloproteinase da matriz 2 (matrix metalloproteinase-2)
MOPS – estudo de prevenção de osteoporose com melatonina (melatonin osteoporosis prevention study)
MOTS – estudo de tratamento com melatonina e micronutrientes (melatonin micronutrients treatment study)
MS/BS – superfície de mineralização por superfície óssea (mineralizing surface/bone surface)
MSCs – células-tronco mesenquimais (mesenchymal stem cells)
MT1 – receptor de melatonina tipo 1 (melatonin receptor type 1)
MT2 – receptor de melatonina tipo 2 (melatonin receptor type 2)
MT3 – receptor/sítio de ligação MT3 (associado à NQO2) (MT3 binding site (associated with NQO2))
NAT – serotonina N-acetiltransferase (arylalkylamine N-acetyltransferase)
NF-κB – fator nuclear kappa B (nuclear factor kappa B)
NFKB1 – subunidade 1 do fator nuclear kappa B (nuclear factor kappa B subunit 1)
NQO2 – NAD(P)H:quinona oxirredutase 2 (NAD(P)H:quinone oxidoreductase 2)
Nrf2 – fator nuclear eritroide 2–relacionado ao fator 2 (nuclear factor erythroid 2–related factor 2)
NTx – N-telopeptídeos do colágeno (N-terminal telopeptides)
Ob.S/BS – superfície osteoblástica por superfície óssea (osteoblast surface/bone surface)
OC – osteocalcina (osteocalcin)
OPG – osteoprotegerina (osteoprotegerin)
OS/BS – superfície osteóide por superfície óssea (osteoid surface/bone surface)
OVX – ovariectomia / ovariectomizado(a) (ovariectomy / ovariectomized)
P1NP – propeptídeo N-terminal do pró-colágeno tipo I (procollagen type I N-terminal propeptide)
PERK – quinase semelhante à PKR do retículo endoplasmático (PKR-like ER kinase)
PI3K – fosfatidilinositol 3-quinase (phosphoinositide 3-kinase)
PI3K/Akt – via PI3K/Akt (PI3K/Akt pathway)
PPARγ – receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
PTH – paratormônio (parathyroid hormone)
RANK – receptor ativador do fator nuclear kappa B (receptor activator of NF-κB)
RANKL – ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (receptor activator of NF-κB ligand)

ROI – região de interesse (region of interest)
ROR/RZR – receptores órfãos relacionados ao ácido retinóico (retinoid-related orphan receptors)
RUNX2 – fator de transcrição relacionado ao runt 2 (runt-related transcription factor 2)
SHAM – cirurgia simulada (controle cirúrgico) (SHAM surgery (surgical control))
SIRT – sirtuína(s) (sirtuin(s))
Smad – proteínas Smad (Smad proteins)
SNC – sistema nervoso central (central nervous system)
SOD – superóxido dismutase (superoxide dismutase)
SOD2 – superóxido dismutase 2 (superoxide dismutase 2)
Tb.N – número de trabéculas (trabecular number)
Tb.Sp – separação trabecular (trabecular separation)
Tb.Th – espessura trabecular (trabecular thickness)
TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)
TNFRSF11B – gene da osteoprotegerina (tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B)
TNFSF11 – gene do RANKL (tumor necrosis factor ligand superfamily member 11)
VLDL – lipoproteína de densidade muito baixa (very-low-density lipoprotein)
Wnt – via Wnt (Wnt pathway)

RESUMO

A melatonina é um hormônio cuja produção declina com o envelhecimento e a menopausa, favorecendo o desenvolvimento da osteoporose. Esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da melatonina sobre a microarquitetura óssea, parâmetros laboratoriais e peso corporal em ratas *Wistar* submetidas à ovariectomia (OVX) ou cirurgia SHAM. Foram avaliadas 60 ratas adultas (20 semanas), distribuídas em dois grupos cirúrgicos: OVX (n=30) e SHAM (n=30). O peso corporal médio foi de $246,9 \pm 21,8$ g (OVX) e $239,6 \pm 14,3$ g (SHAM) no pré-operatório, e de $293,9 \pm 36,8$ g (OVX) e $255,2 \pm 14,7$ g (SHAM) antes da eutanásia. Doze semanas após a cirurgia, iniciou-se a administração diária por gavagem de melatonina (20 ou 50 mg/kg) ou placebo (1,5 mL de água filtrada). A distribuição final foi: OVX 20 mg/kg (n=9), OVX 50 mg/kg (n=9), OVX controle (n=10), SHAM 20 mg/kg (n=9), SHAM 50 mg/kg (n=9) e SHAM controle (n=8). Nos grupos OVX, a melatonina preservou significativamente a fração de volume ósseo (BV/TV: $13,18 \pm 3,63\%$ no controle; $17,10 \pm 3,38\%$ no grupo 20 mg/kg; $20,91 \pm 2,51\%$ no grupo 50 mg/kg; $p < 0,001$). A dose de 50 mg/kg mostrou-se particularmente eficaz, mantendo maior número de trabéculas (Tb.N: $2,76 \pm 0,77$ vs. $3,65 \pm 0,50$ n/mm; $p = 0,015$), reduzindo a separação trabecular (Tb.Sp: $336,86 \pm 102,46$ vs. $218,76 \pm 30,28$ μ m; $p = 0,005$) e diminuindo expressivamente a superfície de erosão (ES/BS: $6,64 \pm 3,01$ vs. $2,08 \pm 0,82\%$; $p < 0,001$). Nos grupos SHAM, a microarquitetura óssea manteve-se preservada, sem diferenças significativas em BV/TV, Tb.Th, Tb.N ou Tb.Sp. Nesse modelo, a melatonina na dose de 50 mg/kg reduziu a superfície de erosão (ES/BS: $4,36 \pm 3,54\%$ no controle vs. $1,33 \pm 0,88\%$ no grupo SHAM 50 mg/kg; $p = 0,027$), sugerindo discreto efeito antirreabsortivo. Entre os parâmetros bioquímicos, observou-se redução significativa da hemoglobina glicada (HbA1c) nos grupos OVX tratados com melatonina. O grupo OVX controle apresentou HbA1c de $0,73 \pm 0,15\%$, enquanto OVX 20 mg/kg ($0,37 \pm 0,26\%$; $p = 0,019$) e OVX 50 mg/kg ($0,36 \pm 0,24\%$; $p = 0,015$) exibiram valores menores. Não foram observadas diferenças significativas em ALT, ALP, creatinina, colesterol, triglicerídeos, proteína total ou CTX. O tratamento com melatonina não alterou significativamente a evolução do peso corporal em ambos os grupos, e não foi observada correlação entre peso e parâmetros histomorfométricos. Conclui-se que a melatonina, especialmente na dose de 50 mg/kg, preservou a microarquitetura trabecular e reduziu a reabsorção óssea em ratas ovariectomizadas, além de diminuir os níveis de HbA1c, sugerindo efeitos metabólicos adicionais. No segundo estudo, voltado à avaliação de vias moleculares envolvidas na remodelação óssea, a análise imuno-histoquímica demonstrou aumento significativo da expressão de β -catenina e MMP-2 (metaloproteinase da matriz tipo 2), sem diferença estatística para NF- κ B. Esses achados reforçam o potencial da melatonina em ativar a via Wnt/ β -catenina, promover a diferenciação osteoblástica e modular positivamente a MMP-2, enzima essencial à manutenção da matriz extracelular e à integridade trabecular. Assim, o conjunto dos resultados amplia a compreensão dos mecanismos osteoprotetores da melatonina e destaca seu potencial como agente preventivo na osteoporose da pós-menopausa.

Palavras-chave: melatonina; osteoporose; histomorfometria; ratas ovariectomizadas; remodelação óssea; imuno-histoquímica; vias moleculares; HbA1c.

ABSTRACT

Melatonin is a hormone whose production declines with aging and menopause, favoring the development of osteoporosis. This study aimed to evaluate the effects of melatonin on bone microarchitecture, laboratory parameters, and body weight in *Wistar* rats subjected to ovariectomy (OVX) or SHAM surgery. Sixty adult rats (20 weeks old) were evaluated and distributed into two surgical groups: OVX (n=30) and SHAM (n=30). The mean body weight was 246.9 ± 21.8 g (OVX) and 239.6 ± 14.3 g (SHAM) preoperatively, and 293.9 ± 36.8 g (OVX) and 255.2 ± 14.7 g (SHAM) before euthanasia. Twelve weeks after surgery, daily oral gavage administration of melatonin (20 or 50 mg/kg) or placebo (1.5 mL of filtered water) was initiated. The final distribution was: OVX 20 mg/kg (n=9), OVX 50 mg/kg (n=9), OVX control (n=10), SHAM 20 mg/kg (n=9), SHAM 50 mg/kg (n=9), and SHAM control (n=8). In the OVX groups, melatonin significantly preserved the trabecular bone volume fraction (BV/TV: $13.18 \pm 3.63\%$ in control; $17.10 \pm 3.38\%$ in 20 mg/kg; $20.91 \pm 2.51\%$ in 50 mg/kg; $p < 0.001$). The 50 mg/kg dose was particularly effective, maintaining a higher trabecular number (Tb.N: 2.76 ± 0.77 vs. 3.65 ± 0.50 n/mm; $p = 0.015$), reducing trabecular separation (Tb.Sp: 336.86 ± 102.46 vs. 218.76 ± 30.28 μ m; $p = 0.005$), and markedly decreasing erosion surface (ES/BS: 6.64 ± 3.01 vs. $2.08 \pm 0.82\%$; $p < 0.001$). In the SHAM groups, trabecular microarchitecture remained preserved, with no significant differences in BV/TV, Tb.Th, Tb.N, or Tb.Sp. In this model, melatonin at 50 mg/kg reduced erosion surface (ES/BS: $4.36 \pm 3.54\%$ in control vs. $1.33 \pm 0.88\%$ in SHAM 50 mg/kg; $p = 0.027$), suggesting a mild antiresorptive effect. Among biochemical parameters, a significant reduction in glycated hemoglobin (HbA1c) was observed in OVX groups treated with melatonin. The OVX control group showed HbA1c of $0.73 \pm 0.15\%$, while OVX 20 mg/kg ($0.37 \pm 0.26\%$; $p = 0.019$) and OVX 50 mg/kg ($0.36 \pm 0.24\%$; $p = 0.015$) exhibited lower levels. No significant differences were found in ALT, ALP, creatinine, cholesterol, triglycerides, total protein, or CTX. Melatonin treatment did not significantly affect body weight evolution in either group, and no correlation was observed between body weight and histomorphometric parameters. Overall, melatonin particularly at the 50 mg/kg dose preserved trabecular microarchitecture and reduced bone resorption in ovariectomized rats, while also lowering HbA1c levels, suggesting additional metabolic benefits. In the complementary molecular study, immunohistochemical analysis revealed a significant increase in β -catenin and MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) expression, with no statistical difference for NF- κ B. These findings reinforce melatonin's ability to activate the Wnt/ β -catenin pathway, promote osteoblastic differentiation, and positively modulate MMP-2, an enzyme essential for extracellular matrix maintenance and trabecular integrity. Together, these results expand the understanding of melatonin's osteoprotective mechanisms and highlight its potential as a preventive agent for postmenopausal osteoporosis.

Keywords: melatonin; osteoporosis; histomorphometry; ovariectomized rats; bone remodeling; immunohistochemistry; molecular pathways; HbA1c.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS	12
1.1.1	Objetivo geral.....	12
1.1.2	Objetivos específicos.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	MELATONINA	13
2.2	MELATONINA NA HOMEOSTASE CELULAR.....	14
2.3	MELATONINA NA HOMEOSTASE DO METABOLISMO ÓSSEO.....	16
2.4	MELATONINA E O ENVELHECIMENTO	19
2.5	MELATONINA E ESTROGÊNIO NA HOMEOSTASE DO METABOLISMO ÓSSEO.....	21
2.6	ANÁLISES HISTOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS	22
2.6.1	Histomorfometria Óssea.....	22
2.6.2	Imunohistoquímica	23
2.7	MODELOS ANIMAIS EM OSTEOPOROSE	24
2.8	MELATONINA EM ESTUDOS PÓS-MENOPAUSA	26
2.9	JUSTIFICATIVA DA ESCOLHA DAS DOSES DE MELATONINA.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	30
3.2	AMOSTRA E LOCAL DE ESTUDO.....	30
3.3	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	32
3.3.1	Análises hematológicas e bioquímicas	32
3.3.2	Preparação do material para Histomorfometria óssea	33
3.3.3	Histomorfometria Óssea (HO)	33
3.3.4	Dosagem de CTX	34
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4	RESULTADOS	36
4.1	ARTIGOS CIENTÍFICOS	36
4.1.1	Primeiro artigo	36
4.1.2	Segundo artigo	51
4.1.3	Terceiro artigo	58
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59

6	OPINIÃO E APRENDIZADO DO PESQUISADOR.....	60
7	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE A - PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UP).....	71
	APÊNDICE B - GRÁFICOS ANÁLISE <i>POST HOC</i>	74
	APÊNDICE C - GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS	75
	APÊNDICE D - RESUMO PUBLICADO NA REVISTA DE SAÚDE DE SANTA MARIA	76
	APÊNDICE E - ABSTRACT ASBMR 2024 (TORONTO).....	77
	APÊNDICE F - ABSTRACT ISBM 2024 (TORONTO).....	78
	APÊNDICE G - SUBMISSÃO DO SEGUNDO ARTIGO PARA A REVISTA CALCIFIED TISSUE INTERNATIONAL	79
	ANEXO A - PRÊMIO ENDOFEMININA - ENCONTRO DE ENDOCRINOLOGIA FEMININA 2022.	80

1 INTRODUÇÃO

A melatonina é uma molécula onipresente na natureza, sendo sintetizada localmente em várias células e tecidos. Além disso, é um hormônio produzido centralmente na glândula pineal dos vertebrados, especialmente em mamíferos. Sua produção pela glândula pineal ocorre à noite, com queda pela manhã. Ela é responsável pela reprodução sazonal, pela imunidade, pela proteção das células epiteliais pigmentares da retina contra danos oxidativos, pela homeostase da glicose e pela regulação do ritmo circadiano. Ela sincroniza o ciclo dia/noite, tornando-se o agente interno que controla o ciclo de luz diário e sazonal (Amaral; Cipolla, 2018).

A melatonina exerce sua ação por meio de receptores específicos na membrana e nas mitocôndrias, além de atuar localmente pelas suas propriedades antioxidantes e capacidade de capturar radicais livres. Estudos realizados *in vitro* e em animais mostraram que ela tem efeitos benéficos no metabolismo ósseo. Essas pesquisas indicam que ela pode promover a diferenciação e mineralização da matriz óssea, ao mesmo tempo em que inibe a atividade dos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea. A melatonina estimula, portanto, a formação de osteoblastos, melhorando a densidade óssea. Com seu perfil de segurança, ela poderia ser considerada uma opção terapêutica potencial para prevenir a perda óssea em populações suscetíveis (Munmun; Witt-Enderby, 2021).

A osteoporose é definida como uma doença caracterizada por fragilidade e alterações na microarquitetura óssea (Radominski *et al.*, 2017). Sua etiologia mais comum é a pós-menopausa decorrente de redução do estrogênio, o qual apresenta um efeito antirreabsortivo. Caracteristicamente, a menopausa induz a um aumento da reabsorção do tecido ósseo pelos osteoclastos seguida de uma perda óssea e consequente aumento do risco de fraturas (Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2021). Entre os efeitos da melatonina, destacam-se ações no tecido ósseo amplamente documentadas, incluindo a redução da reabsorção e o estímulo à formação óssea. Adicionalmente, a melatonina promove a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos e atua como molécula sinalizadora central, modulando múltiplas vias envolvidas nesse processo — PI3K/Akt, BMP/Smad, MAPK, NF- κ B, Nrf2/HO-1, Wnt, SIRT/SOD e PERK/ATF4 — bem como aumentando a densidade mineral óssea quando associada ao estrôncio, à vitamina D3 e à vitamina K2 (Malakoti *et al.*, 2022).

A técnica de histomorfometria óssea (HO) permanece como o único método capaz de analisar o tecido ósseo nos níveis tecidual e celular, fornecendo informações inacessíveis por outras abordagens (Kulak; Dempster, 2010). Trata-se de uma ferramenta indispensável na investigação do metabolismo ósseo, com duas aplicações principais: o diagnóstico de doenças ósseas e a pesquisa científica. Estudos de HO permitem elucidar o acoplamento entre formação e reabsorção e esclarecer os papéis relativos da modelação e da remodelação óssea (Chavassieux; Chapurlat, 2022).

Poucas investigações utilizaram a técnica de HO na avaliação da melatonina na prevenção da perda óssea na pós-menopausa e no envelhecimento em ratas adultas e em animais que atingiram a maturação esquelética (pico de massa óssea). Com base nessas considerações, o objetivo deste estudo foi avaliar parâmetros estruturais e de remodelamento ósseo em ratas *Wistar* adultas submetidas à ovariectomia (OVX) ou à cirurgia SHAM e que receberam diferentes doses de melatonina por gavagem, correlacionando esses parâmetros também com o peso dos animais ao longo das semanas de tratamento e com os parâmetros laboratoriais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da melatonina sobre parâmetros estruturais e da remodelação óssea, por meio da técnica de histomorfometria óssea, em ratas ovariectomizadas (OVX) e controles submetidas à cirurgia SHAM.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar, no grupo OVX, se as doses de 20 e 50 mg/kg de melatonina preservam a microarquitetura óssea e reduzem a reabsorção em comparação ao controle.
- Avaliar, no grupo SHAM, se as doses de 20 e 50 mg/kg de melatonina interferem na microarquitetura óssea em comparação ao controle.
- Correlacionar os achados histomorfométricos de cada grupo (OVX e SHAM) com os dados de peso corporal dos animais.
- Correlacionar os achados histomorfométricos de cada grupo com os parâmetros laboratoriais, incluindo alanina aminotransferase (ALT), fosfatase

alcalina (ALP), creatinina, colesterol total, triglicerídeos, proteína total, hemoglobina glicada (HbA1c) e telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo I (CTX), marcador bioquímico da reabsorção óssea.

- Avaliar os efeitos moduladores da melatonina sobre as principais vias moleculares envolvidas na remodelação óssea — NF- κ B, β -catenina e MMP-2, a fim de esclarecer seu papel dual na atenuação da reabsorção e na promoção da formação óssea em condição de deficiência estrogênica.

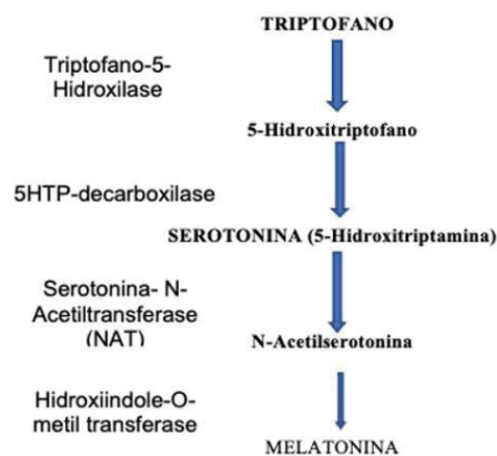
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MELATONINA

A melatonina é uma molécula com uma estrutura simples conhecida pelo nome de N-acetil-5-metoxitriptamina e existe praticamente em todos os organismos.

É derivada do triptofano, um aminoácido essencial, e que, portanto, não pode ser produzido pelo organismo. A partir da ação da triptofano-5-hidroxilase, o triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano. Esse, através da ação da 5-HTP-decarboxilase se converte em serotonina (5-hidroxitriptamina), que sofre a ação da serotonina-N-Acetiltransferase (NAT) gerando N-acetil-serotonina. Essa última molécula por ação da enzima hidroxiindole-O-metiltransferase, converte-se em melatonina (FIGURA 1).

FIGURA 1 – SÍNTESE DE MELATONINA



FONTE: Ferlazzo, 2020.

Ela é um hormônio naturalmente produzido em resposta à diminuição da luminosidade e além de fazer a regulação do ciclo sono-vigília, desempenha diversas outras funções essenciais. Uma dessas funções é a comunicação com todas as células e sistemas do organismo para indicar a chegada da noite e desencadear as mudanças fisiológicas necessárias para esse período. A melatonina é, portanto, um hormônio produzido durante o período noturno em resposta à mudança de luminosidade. Devido a sua propriedade anfifílica, ela pode penetrar células, organelas e membranas nucleares, onde interage com moléculas intracelulares, desencadeando ações que não dependem de receptores específicos. Além disso, ela também realiza ações mediadas por receptores, interagindo por exemplo com receptores de membrana e nucleares (Cipolla-Neto; Amaral, 2018). A sua produção não é regulada por mecanismos de feedback, resultando em uma concentração plasmática que não influencia sua própria produção, diferenciando-a dos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise. Também é conhecida por regular outras funções, além do ritmo circadiano como reprodução, temperatura corporal, sistema imunológico e sistema cardiovascular (Karasek, 2002; Kotlarczyk, 2012; Amstrup, 2015a; Claustrat, 2015; Maria, 2017).

Apesar da melatonina ter sua comercialização no Brasil aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) no final de 2022 como suplemento alimentar (Anvisa, 2021) e estar disponível para comercialização nas farmácias de manipulação no Brasil desde 2017, o seu uso deveria ser considerado como equivalente à reposição hormonal (Iamarino, 2024).¹

2.2 MELATONINA NA HOMEOSTASE CELULAR

A melatonina é uma molécula evolutivamente conservada, aprimorada ao longo de bilhões de anos. Inicialmente, acreditava-se que suas ações ocorriam apenas por meio de receptores localizados em membranas de células específicas, como os neurônios do Sistema Nervoso Central (SNC). Nessa linha, os receptores MT1 e MT2, membros da família dos receptores transmembrana acoplados à proteína G, foram identificados e caracterizados farmacologicamente. O MT1 possui cerca de

¹ IAMARINO, Atila. *Tudo sobre melatonina*. Não Ficção: podcast. Entrevista com José Cipolla Neto. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=Rse1bGfGajg>>. Acesso em: 28 set. 2025.

350 aminoácidos, enquanto o MT2 contém aproximadamente 363, compartilhando cerca de 60% de homologia.

Esses receptores estão amplamente distribuídos, presentes em diferentes tipos celulares e em diversas membranas celulares (Cecon, *et al.*, 2023) (Okamoto *et al.*, 2024). Além dos receptores de membrana, destaca-se o denominado MT3, localizado no citoplasma e não acoplado à proteína G, considerado equivalente à quinona redutase 2 (NQO2). A NQO2, também chamada de NAD(P)H:quinona oxirredutase 2, é uma enzima da família das flavoproteínas com papel essencial nos processos de detoxificação celular. Ela converte quinonas em formas menos reativas, prevenindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, assim, contribuindo para a proteção contra o estresse oxidativo. Alterações em sua atividade têm sido associadas à neurodegeneração, como na doença de Parkinson e Alzheimer, além de processos inflamatórios e do próprio metabolismo da melatonina, que pode modular essa enzima. Nesse contexto, a melatonina liga-se à NQO2, neutralizando parte de sua atividade deletéria e reforçando seu papel protetor (Calamini, 2022).

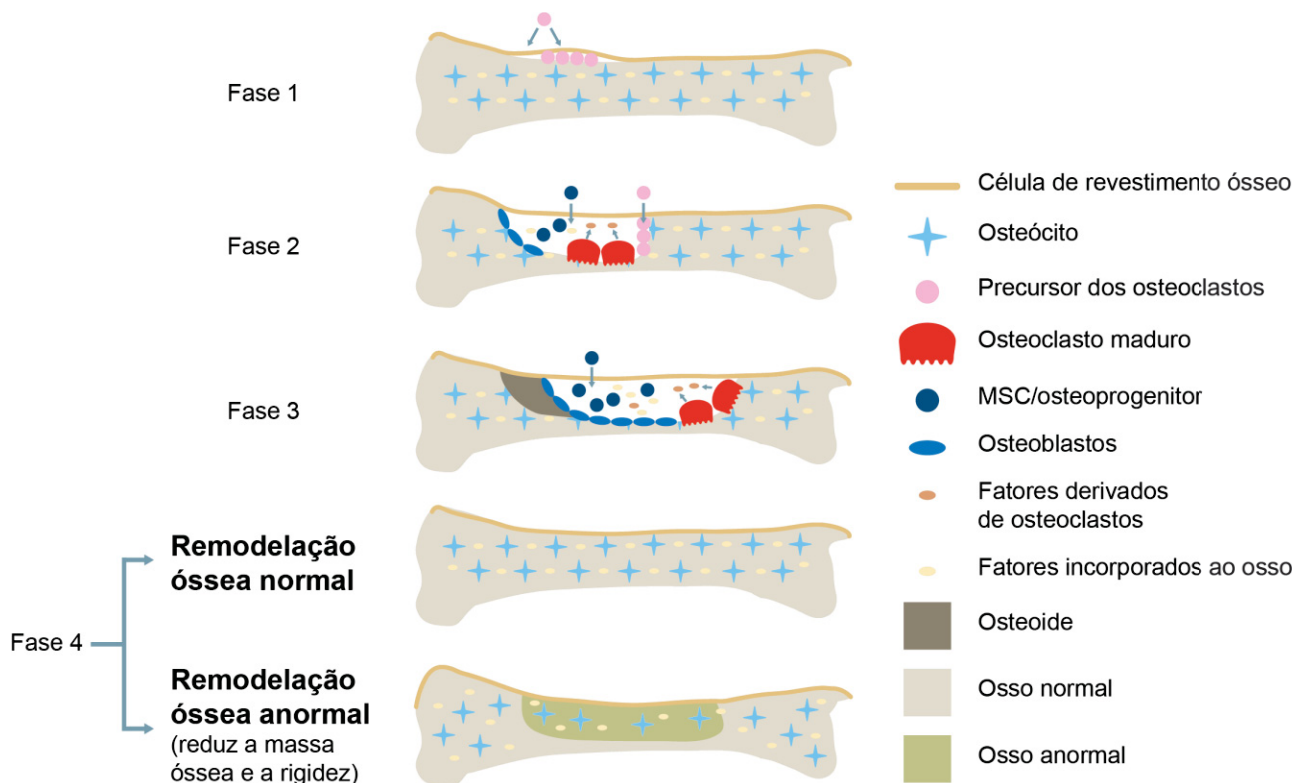
A melatonina integra o relógio circadiano e o metabolismo celular: além de “zeitgeber”(temporizador), funciona como monitor homeostático do estado energético por vias dependentes de MT1/MT2 e ações intracelulares. Em condições de envelhecimento ou dessincronia circadiana, sua queda associa-se ao maior risco metabólico, indicando papel modulador sobre a homeostase celular (Challet, 2024). Também por sua ação antioxidante e capacidade de neutralizar radicais livres, acumula-se nas mitocôndrias, onde pode interagir com os receptores mitocondriais MT1/2. Entre seus mecanismos, destaca-se a ativação do fator de transcrição NRF2, proteína que regula a expressão gênica, fundamental para a defesa das células contra o estresse oxidativo, envolvido nas defesas antioxidantes e na modulação da inflamação. Evidências demonstram que, ao ativar o receptor MT1 localizado na membrana externa mitocondrial, a melatonina previne a apoptose induzida por peróxido de hidrogênio em células epiteliais pigmentares da retina, além de inibir a liberação de citocromo C pró-apoptótico associada ao estresse. Adicionalmente, a melatonina estimula a expressão da superóxido dismutase 2 (SOD2), uma das principais enzimas antioxidantes mitocondriais. Assim, seus efeitos, sejam diretos ou mediados por receptores MT1/2, reforçam o papel protetor da melatonina sobre a função mitocondrial (Brzezniakiewicz-Janus *et al.*, 2025).

Estudos iniciais já apontavam que, pela sua elevada lipossolubilidade, a melatonina consegue atravessar facilmente membranas biológicas e interagir com receptores citoplasmáticos e nucleares, incluindo os receptores órfãos relacionados ao ácido retinóico (ROR/RZR- α), envolvidos na regulação transcricional de genes associados à sincronização do ritmo circadiano (Pandi-Perumal *et al.*, 2008). Posteriormente, demonstrou-se sua elevada eficácia em neutralizar radicais livres dentro das mitocôndrias, conferindo proteção contra o estresse oxidativo (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2011). Mais adiante, destacou-se que a melatonina pode modular a atividade de receptores nucleares da família ROR α e ROR β , embora ainda haja debate quanto à especificidade e ao caráter direto dessa ligação (Sládek *et al.*, 2021).

2.3 MELATONINA NA HOMEOSTASE DO METABOLISMO ÓSSEO

A remodelação óssea é um processo dinâmico e coordenado que assegura a renovação estrutural do esqueleto ao longo da vida, sendo essencial para substituir o osso antigo e danificado por osso novo e manter a homeostase mineral e mecânica. Esse ciclo compreende fases distintas e interdependentes: 1. Ativação, quando os osteoclastos são recrutados e iniciam a reabsorção do tecido ósseo; 2. Reabsorção, na qual degradam a matriz mineralizada formando uma cavidade e reversão, momento em que precursores de osteoblastos são atraídos ao sítio de reabsorção; 3. Formação, quando os osteoblastos depositam matriz osteóide que será posteriormente mineralizada; e 4. Fase quiescente, em que osteoblastos remanescentes tornam-se células de revestimento ou osteócitos, desempenhando funções regulatórias no equilíbrio do cálcio e como sensores mecânicos (Feng; McDonald, 2011; Rodrigues *et al.*, 2013). A regulação desse equilíbrio envolve fatores sistêmicos, como hormônios (PTH, estrógeno, vitamina D), e locais, em especial o eixo RANK/RANKL/OPG, crucial na diferenciação e atividade de osteoclastos e osteoblastos (Feng; McDonald, 2011). Estudos recentes acrescentam que os osteoclastos liberam fatores de acoplamento (“clastocinas”) que promovem a atividade osteoblástica, configurando uma regulação bidirecional mais complexa (Novack; Feng, 2023). Além disso, citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo atuam como mediadores negativos do equilíbrio esquelético, revelando a importância da interface entre remodelação óssea e sistema imune (Sharma *et al.*, 2023; Ma *et al.*, 2025). Finalmente, a adaptação mecânica, isto é, a resposta óssea a estímulos de carga e microdanos, permanece como aspecto central da remodelação, garantindo que o osso se ajuste funcionalmente às demandas estruturais (Tarumi *et al.*, 2023) (FIGURA 2).

FIGURA 2 – MODELO ATUAL DE REMODELAÇÃO ÓSSEA



Fase 1: início/ativação da remodelação óssea num local específico. Fase 2: reabsorção óssea e recrutamento de células mesenquimais (MSCs) e osteoprogenitores. Fase 3: diferenciação osteoblástica e síntese de osteoide. Fase 4: mineralização do osteoide e finalização do processo de remodelação óssea.

FONTE: Elaborada pela autora. Adaptada de Susan Ott, 2023.

A melatonina desempenha um papel na remodelação óssea, principalmente através de seus receptores, sendo o receptor de melatonina tipo 2 (MT2) expresso em células-tronco mesenquimais (MSCs), osteoblastos e osteoclastos. A melatonina promove a diferenciação osteoblástica a partir das MSCs, estimulando sua sobrevivência e diferenciação, enquanto inibe a diferenciação osteoclastogênica das células-tronco hematopoiéticas. A osteoprotegerina (OPG) e o ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa Beta (RANKL), produzidos pelas células

osteoblásticas, e por uma subpopulação de osteócitos controlam a produção de proteínas que regulam criticamente a osteoclastogênese (FU *et al.*, 2023). Além disso, existe uma função importante para a sinalização Wnt/ β -catenina em osteócitos. A β -catenina presente nos osteócitos é necessária para a expressão do fator antiosteoclastogênico OPG, sendo que os osteócitos expressam RANKL e OPG em níveis comparáveis ou até superiores aos osteoblastos.

A melatonina (MLT) suprime o RANKL, regulando positivamente a OPG, exercendo, assim, um forte efeito antirreabsortivo (Kramer *et al.*, 2010) (TABELA 1).

TABELA 1 – RESUMO DAS AÇÕES DA MELATONINA NO TECIDO ÓSSEO

+ Estimula a diferenciação osteoblástica a partir das células MSCs
+ Estimula a sobrevivência osteoblástica
- Inibe a diferenciação de osteoclastos a partir de células hematopoiéticas
- Suprime o RANKL† osteoclastogênico
+ Regula positivamente a osteoprotegerina* antiosteoclastogênica

Abreviações: RANKL- ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa Beta (NF- κ B);

*Osteoprotegerina- proteína solúvel sintetizada pelos osteoblastos e osteócitos, age como um receptor competitivo ligando-se ao RANKL e assim impedindo a ligação ao RANK, diminuindo a ação dos osteoclastos.

FONTE: Elaborada pela autora. Adaptada de Lu, *et al.*, 2021.

Como já citado, o hormônio melatonina exerce um efeito de relógio circadiano para todos os tecidos periféricos, incluindo o osso, mantendo o metabolismo ósseo em sincronicidade com o ciclo diurno e mantendo a homeostase do microambiente local (Majidinia, 2018). As reduções nos seus níveis associadas à idade são consideradas fatores contribuintes para a perda óssea e osteoporose durante o envelhecimento. De fato, a melatonina apresenta um efeito dual sobre a esquelito, estimulando a formação de osso novo através de várias vias ao ativar o receptor específico de membrana MT2 e, com isso, regulando positivamente a expressão genética da fosfatase alcalina, das proteínas morfogenéticas ósseas BMP2 e BMP6,

da osteocalcina e da osteoprotegerina, promovendo a osteogênese. Adicionalmente, inibe o ligante do receptor ativador do fator nuclear NF-kappa B (RANKL), reduzindo a diferenciação das células-tronco hematopoiéticas para formação dos osteoclastos e consequentemente, a reabsorção óssea (Li *et al.*, 2019). A melatonina pode atuar através de 2 receptores específicos de membrana (MT1 e MT2), como já citado, que regulam a sinalização intracelular, provocando efeitos específicos intracelulares (Zibolka *et al.*, 2015; He *et al.*, 2016). Esse hormônio também tem ações dependentes e independentes dos seus receptores em mamíferos e influencia diversos efeitos fisiológicos por meio de diferentes vias de sinalização. Além disso, a melatonina pode proteger contra toxinas e reagentes tóxicos ao neutralizar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Pietschmann *et al.*, 2016) (FIGURA 3).

2.4 MELATONINA E O ENVELHECIMENTO

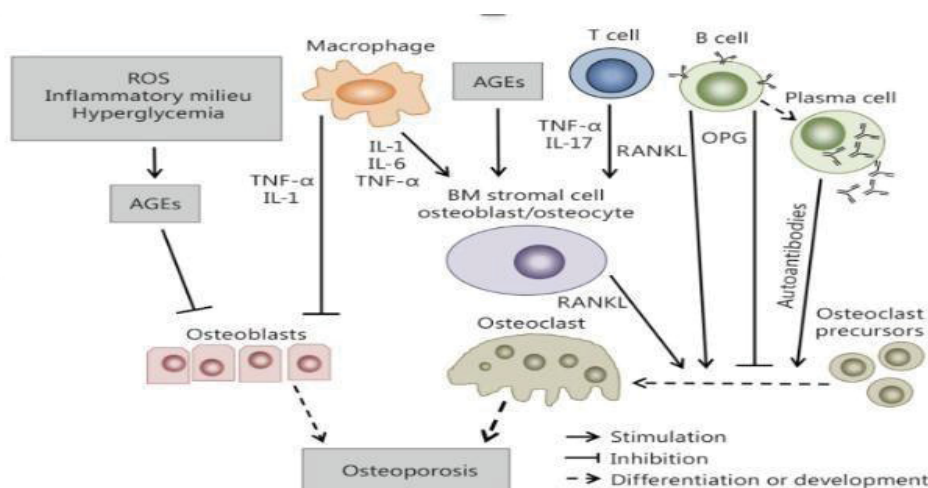
O fenômeno do estado inflamatório crônico e sistêmico de baixa intensidade associado ao envelhecimento, denominado “inflamm-aging” por Claudio Franceschi, foi relacionado a doenças relacionadas à idade (Franceschi, 2014). A inflamação crônica subclínica e os distúrbios imunológicos coexistem no processo de inflamação relacionada ao envelhecimento. Estudos epidemiológicos mostram que com o avanço da idade há um desequilíbrio na perda de osso antigo e na formação de osso novo. A inflamação relacionada ao envelhecimento pode ser um dos fatores contribuintes para esse desequilíbrio e para a subsequente perda excessiva de tecido ósseo (Pietschmann *et al.*, 2016).

Marcadores do processo inflamatório relacionado ao envelhecimento fornecem aos clínicos os dados necessários para a avaliação de risco de osteoporose (Xia *et al.*, 2016). O envelhecimento envolve também mudanças circadianas, como problemas de sono, o que pode levar a inflamação e distúrbios metabólicos.

A coexistência anatômica e fisiológica dos linfócitos B e das unidades formadoras de osso na medula óssea sugere uma interação osteo imunológica. Estudos recentes indicam que as células B regulam ativamente o eixo RANK/RANKL/OPG, e que a produção de RANKL/OPG por células B é alterada em condições como a perda óssea associada à deficiência de estrogênio. Adicionalmente, o estresse oxidativo e a formação de produtos de glicação avançada ligam a inflamação à destruição óssea. Linfócitos B residem/amadurecem na medula

óssea e participam da osteoimunologia. Eles podem produzir RANKL e OPG, modulando a atividade dos osteoclastos. Na deficiência de estrogênio, há alteração nesse balanço (aumentando RANKL/e reduzindo OPG), favorecendo a reabsorção óssea (Pietschmann *et al.*, 2016).

FIGURA 3 – COMPONENTES DO SISTEMA IMUNOLÓGICO NA PATOGENESE DA OSTEOPOROSE



Abreviações: Legenda: ROS = espécies reativas de oxigênio; AGEs = produtos finais de glicação avançada; TNF-α = fator de necrose tumoral alfa; BM stromal cell = célula estromal da medula óssea; RANKL = ligante do receptor ativador do NF-κB; T cell = linfócito T; B cell = linfócito B; IL-1 = interleucina-1; IL-6 = interleucina-6.

FONTE: Pietschmann *et al.*, 2016

A redução da melatonina plasmática tem um papel crucial no envelhecimento, causando, muitas vezes, uma falta de sincronização do relógio circadiano sistêmico, o que pode acarretar falta de proteção das células contra danos. Ela reduz inflamação e resistência à insulina, sendo importante no processo de envelhecimento saudável. Seus níveis são baixos em doenças como síndrome metabólica, cardiovasculares e neurodegenerativas. Estudos sugerem que doses terapêuticas de melatonina (2-10 mg/dia) podem ser benéficas, mas doses mais altas (cerca de 100 mg/dia) seriam necessárias para efeitos citoprotetores, exigindo mais pesquisas (Cardinalli, 2021). Sendo assim, a melatonina desempenha um papel importante na remodelação óssea, além de sincronizar o metabolismo ósseo com o ciclo circadiano, mantendo a homeostase do microambiente ósseo. Com o envelhecimento e o hipoestrogenismo, a redução da secreção desse hormônio está associada à perda óssea e à osteoporose. A inflamação crônica associada ao envelhecimento, conhecida

como “inflamm-aging”, tem sido apontada como um fator relevante no desequilíbrio da renovação óssea (Bagherifard, *et al.* 2023). Nesse contexto, a melatonina, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e citoprotetoras, vem sendo considerada como um potencial agente terapêutico para preservar a saúde óssea na osteoporose pós-menopausa e na perda óssea relacionada ao envelhecimento. Ainda assim, permanecem incertezas quanto à real magnitude desses efeitos, e não há, até o momento, uma definição clara sobre a dose ideal ou a duração necessária da suplementação para que benefícios clínicos possam ser efetivamente observados.

2.5 MELATONINA E ESTROGÊNIO NA HOMEOSTASE DO METABOLISMO ÓSSEO

A interação entre melatonina e estrogênio no tecido ósseo representa um campo emergente e promissor de investigação em saúde óssea. Ambos os hormônios desempenham papéis centrais na regulação da remodelação óssea: o estrogênio atua controlando a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, estimulando a formação e inibindo a reabsorção. Na menopausa, a deficiência estrogênica provoca desequilíbrio nesse processo — com ativação excessiva da reabsorção óssea — e pode evoluir para o desenvolvimento de osteopenia e osteoporose (Yang *et al.*, 2022).

Estudos recentes sugerem que a melatonina pode modular a ação do estrogênio no osso, influenciando a expressão ou funcionalidade de receptores de estrogênio ($Er\alpha$ e $Er\beta$) em células ósseas e interagindo com suas vias de sinalização (Zhao *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2018). Além disso, a melatonina exibe efeitos independentes, ativando receptores de membrana (MT1, MT2) e receptores nucleares do tipo ROR/RZR (já citado), que podem integrar-se às vias hormonais do estrogênio, modulando o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea (Malakoti *et al.*, 2022; Cardinali *et al.*, 2024).

Em modelos animais de deficiência estrogênica, como em ratas ovariectomizadas, a administração crônica de melatonina mostrou benefícios sobre a densidade mineral óssea, os parâmetros da microarquitetura trabecular e as propriedades biomecânicas do osso, além de regular a expressão de genes osteogênicos (RUNX2, osteocalcina) e de moléculas-chave da via OPG/RANKL (Yang *et al.*, 2022; Pejon *et al.*, 2025).

O estudo de Sadadiwala (2023), investigou a relação entre os níveis séricos de estrogênio e melatonina e a densidade mineral óssea (DMO) em mulheres pós-menopáusicas, demonstrando que ambos os hormônios apresentam correlação positiva e significativa com a massa óssea. Em um delineamento caso-controle envolvendo 48 participantes, as mulheres com osteopenia exibiram concentrações séricas reduzidas de estrogênio e melatonina em comparação ao grupo controle com DMO normal. Os autores observaram um coeficiente de correlação que indicou forte associação entre esses hormônios e a DMO. Os resultados reforçam que a queda simultânea dos níveis de estrogênio e melatonina após a menopausa pode contribuir para o comprometimento da remodelação óssea e o desenvolvimento de osteopenia e osteoporose, ressaltando o papel conjunto dessas substâncias na manutenção da homeostase esquelética em mulheres pós-menopáusicas (Sadadiwala; Sadadiwala, 2023).

Ainda assim, os mecanismos moleculares dessa interação permanecem pouco elucidados, sendo necessários novos estudos para determinar em que medida a melatonina altera a expressão ou ativação dos receptores nucleares de estrogênio, quais cofatores de transcrição são modulados e se os efeitos osteo protetores dependem da presença de estrogênio ou se podem ocorrer de maneira independente. Em resumo, a melatonina desponta como um modulador potencial da sinalização estrogênica no osso, reforçando a proteção esquelética em contextos de deficiência hormonal, embora muitos detalhes moleculares ainda aguardem investigação aprofundada.

2.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS

2.6.1 Histomorfometria Óssea

A histomorfometria óssea é uma técnica de avaliação do tecido ósseo que permanece tendo um papel importante na prática clínica e na pesquisa, apesar do avanço de outros métodos para diagnóstico de doenças ósseas. Ela auxilia no diagnóstico de causas raras de osteoporose, na classificação da osteodistrofia renal e em situações em que ocorre defeito de mineralização como na osteomalácia. A biópsia óssea é fundamental para demonstrar os efeitos das drogas sobre o tecido ósseo e tem sido utilizada em ensaios clínicos que investigaram os principais agentes

para o tratamento da osteoporose — incluindo bisfosfonatos, denosumabe, teriparatida e romosozumabe — quando necessária para esclarecer os mecanismos de ação dessas medicações na remodelação óssea (Chavassieux *et al.*, 2022). A histomorfometria é um exame histológico realizado em biópsias calcificadas, destinado a fornecer informações qualitativas sobre a microestrutura e quantitativas sobre a remodelação do tecido ósseo. Tradicionalmente realizada em cortes bidimensionais (2D), a análise tridimensional (3D) é possível por meio da teoria da estereologia (Dempster, 2013).

A histomorfometria óssea reúne um conjunto padronizado de medidas e abreviações (ASBMR) que descrevem, sobretudo em osso trabecular e, também, no osso cortical (mais abundante no esqueleto e associado ao risco de fraturas não vertebrais), a quantidade de tecido, sua arquitetura e a atividade de remodelação. Os parâmetros dividem-se em estáticos e dinâmicos. Os parâmetros estáticos caracterizam a quantidade e a organização do tecido ósseo nas diferentes fases do ciclo de remodelação, incluindo o volume ósseo trabecular (BV/TV, %), espessura trabecular (Tb.Th, μm), número trabecular (Tb.N, n/mm), separação trabecular (Tb.Sp, mm), espessura cortical (Ct.Th, mm), superfície osteóide (OS/BS, %), espessura osteóide (O.Th, μm), superfície reabsorvida (ES/BS, %) e, no córtex, área e porosidade (Ct.Po.N, mm^{-2} ; Ct.Po.Ar, %) — com possibilidade de análise endocortical e periosteal. Os parâmetros dinâmicos estimam a velocidade dos processos celulares envolvidos na remodelação óssea e requerem dupla marcação por tetraciclina em biópsias em humanos e o marcador calceína em animais: a superfície de mineralização (MS/BS, %) reflete a fração de superfície com mineralização ativa (superfície com dupla marcação + metade da simples, sobre superfície óssea (BS); a taxa de aposição mineral (MAR, $\mu\text{m}/\text{dia}$) corresponde à distância entre os bordos de marcações dividida pelo intervalo entre doses; e a taxa de formação óssea (BFR/BS, $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$) resulta de MS (superfície de mineralização)/BS x MAR, podendo ser ajustada à superfície osteóide para expressar a taxa de aposição óssea ajustada (Aj.AR), fornecendo, em conjunto, um retrato integrado da formação e da reabsorção óssea (Kulak; Dempster, 2010).

2.6.2 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica (IHQ) é uma técnica laboratorial que combina princípios histológicos e imunológicos, utilizada para identificar e localizar antígenos específicos

em cortes teciduais por meio da ligação entre anticorpos e marcadores cromogênicos ou fluorescentes (Ramos-Vara, 2005). Essa metodologia permite a visualização da distribuição e intensidade de expressão de proteínas dentro da arquitetura celular, sendo amplamente aplicada em pesquisas biomédicas para o estudo de processos fisiológicos e patológicos. No campo da biologia óssea, a IHQ é essencial para investigar proteínas envolvidas na diferenciação osteoblástica e osteoclástica, bem como mediadores inflamatórios e fatores de remodelação tecidual, como NF- κ B, β -catenina e metaloproteinases da matriz (MMPs), cuja regulação influencia diretamente o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea (Reiter *et al.*, 2016; Guan *et al.*, 2022). Dessa forma, a imunohistoquímica constitui uma ferramenta fundamental para compreender os mecanismos celulares e moleculares que modulam a homeostase do tecido ósseo.

2.7 MODELOS ANIMAIS EM OSTEOPOROSE

Os modelos animais de osteoporose são importantes para avaliar o efeito de novos tratamentos, onde a rata ovariectomizada é o modelo mais apropriado, sendo que encontraremos como nomenclatura utilizada na literatura a abreviatura de “animal OVX”, que foi a mesma utilizada em nosso estudo.

No artigo de Yousefzadeh e colaboradores, publicado em 2020, são abordadas algumas características necessárias para uma adequada condução do experimento animal. Segundo os autores, podem ser utilizadas as ratas da linhagem *Sprague-Dawley* e *Wistar*, sendo que aos seis meses de vida parece ser o momento adequado para realização da ovariectomia que vai conduzir a rata a um quadro de menopausa com consequente perda óssea. Nessa idade as ratas atingiram maturidade esquelética e sexual, demonstram uma melhor resposta em relação à perda óssea com evolução para menor conectividade trabecular comparativamente a animais mais jovens entre três e seis meses, além de apresentarem um nível de marcadores de remodelação óssea no sangue e na urina de maneira mais estável. Além disso, nesse caso, as respostas de perda de osso trabecular em tibia proximal, vértebra lombar e fêmur seriam semelhantes às que acontecem em humanos. Lembrando que para estudos em que a medicação será administrada durante um menor período, a tibia proximal seria o local adequado para avaliação da osteoporose, onde a deficiência estrogênica vai induzir a perda óssea e, dessa forma, novos

agentes podem ser estudados para prevenção e tratamento da osteoporose (Yousefzadeh, *et al.*, 2020).

Outros autores referenciam que, para o estabelecimento de novas estratégias para prevenção e tratamento da osteoporose estudos pré-clínicos, são fundamentais, onde modelos animais de osteoporose são ferramentas apropriadas, sendo o modelo de rato ovariectomizado o mais utilizado (Turner, 2001). Como já citado, esse modelo simula a perda óssea induzida pela deficiência de estrogênio e mostra manifestações clínicas da osteoporose pós menopausa (Jee; Yao, 2001; Kimmel, 2001). As ratas habitualmente não entram em menopausa até os 18-24 meses de idade, quando estarão idosas para estudos de metabolismo ósseo (Brooks *et al.*, 2016). As ratas não experimentam uma menopausa natural, e a ovariectomia é desta forma utilizada para indução da menopausa em ratos (Turner, 2001). A idade das ratas desempenha, portanto, um papel fundamental para a padronização do modelo no momento da ovariectomia (Francisco *et al.*, 2011). Ressalta-se, ainda, que o osso do animal é semelhante ao humano, sendo composto de 60% de minerais (95% de cálcio e fósforo como cristais de hidroxapatita), 40% de componente orgânico (90 % de colágeno do tipo I). Em ossos de ratos a duração dos ciclos de remodelação óssea que inclui as quatro fases: ativação, reabsorção, reversão e formação óssea, duram em torno de seis dias, o que equivale a um período de remodelação em humanos em torno de 200 dias. Ratas com menos de seis meses apresentam perda óssea mais acentuada após a ovariectomia, menor remodelação osteonal (de Havers) e trabecular e menor sensibilidade das vértebras lombares em comparação aos ossos longos, características que podem introduzir viés e aumentar a variabilidade dos resultados. Ratos entre seis e nove meses, apresentam uma queda no crescimento esquelético e os ratos de seis meses mostram a melhor resposta osteoporótica (menor conectividade trabecular e maiores mudanças de osso trabecular em forma de haste) em comparação com ratos de três e dez meses de idade. Efeitos de confusão de crescimento ósseo longitudinal e envelhecimento que são observados em ratos com menos de três meses e mais de nove meses não são observados nos animais aos seis meses.

Os efeitos nos ossos não são uniformes entre os sítios ósseos (Francisco *et al.*, 2011) e a cirurgia de ovariectomia não induz perda óssea em alguns locais como metáfise distal da tíbia e vértebras caudais. Além disso perdas ósseas significativas no úmero, fêmur, tíbia e coluna são observadas quatro semanas após a ovariectomia,

sendo que esses locais são mais sensíveis quanto à perda óssea (Liu *et al.*, 2015). As regiões de interesse (ROI) em ossos de ratos concentram-se na tíbia proximal, vértebras lombares e fêmur, pois estudos mostram redução de tecido ósseo de ~80% na tíbia proximal, 25–30% na vértebra lombar e 5–7% no fêmur proximal 90 dias após a ovariectomia (Wronski *et al.*, 1989). Além disso, o tempo para atingir 50% de perda óssea pós-ovariectomia é de aproximadamente 30–60 dias para a tíbia proximal e 180–270 dias para o corpo vertebral lombar e o colo do fêmur (Wronski *et al.*, 1989). Portanto, a tíbia proximal é preferencial para estudos de curto prazo que avaliam parâmetros ósseos. No nosso estudo, aguardamos 12 semanas para indução da osteoporose e início da administração da melatonina e 19 semanas após a ovariectomia para realizar a eutanásia.

2.8 MELATONINA EM ESTUDOS PÓS-MENOPAUSA

São três os estudos clínicos publicados na literatura e registrados no site do governo americano www.clinicaltrials.gov. Num primeiro estudo de Kotlarcyk e colaboradores de 2012, estudo MOPS (*Melatonin osteoporosis prevention study*) foi utilizada a dose noturna de 3 mg de melatonina por seis meses. Nesse estudo, foram avaliadas 18 mulheres (com idade entre 45 a 54 anos) que foram randomizadas para receber melatonina (3 mg, via oral, n=13) ou placebo (n=5) todas as noites durante seis meses. A densidade óssea foi medida por ultrassom de calcâneo. Os níveis dos marcadores de turnover ósseo (osteocalcina [OC] para formação óssea e N-telo peptídeos do colágeno [NTx] (para reabsorção óssea) foram medidos bimestralmente no soro. Os resultados desse estudo não mostraram mudanças significativas (seis meses em relação à linha de base) na densidade óssea, NTx ou OC entre os grupos; no entanto, a razão NTX/OC mostrou-se favorável à redução na reabsorção óssea (Kotlarcyck *et al.*, 2012).

Outro estudo de Amstrup e colaboradores de 2015, que utilizou a dose de 1 mg e 3 mg à noite por 12 meses, demonstrou melhora na densidade mineral óssea (DMO) no colo do fêmur e na espessura trabecular na tíbia em mulheres na pós-menopausa com osteopenia. A reposição da melatonina foi associada à uma suplementação oral de 800 mg de cálcio e 20 µg de vitamina D3. Após um ano de tratamento, a DMO no colo do fêmur aumentou 0,5% com 1 mg e 2,3 % com 3 mg de melatonina

comparativamente ao grupo placebo. Os marcadores de turnover ósseo, no entanto, não foram afetados pela melatonina, embora o cálcio urinário de 24 h tenha reduzido em 3,7% no grupo que utilizou a melatonina (Amstrup *et al.*, 2015a). Nesse mesmo grupo, a melatonina não teve um efeito significativo na força muscular ou equilíbrio como documentado em outro artigo da mesma autora (Amstrup *et al.*, 2015b) e a avaliação nesse mesmo grupo, demonstrou uma diminuição significativa na massa gorda e um aumento na massa magra, mas o IMC não se modificou (Amstrup *et al.*, 2016).

O estudo de Maria e colaboradores de 2017, MOTS (*Melatonin micronutrientes treatment study*), relatado como translacional, avaliou o uso da melatonina, citrato de estrôncio, vitamina D 3 e vitamina K 2 (MK7), em relação à densidade mineral óssea, renovação de marcadores ósseos e qualidade de vida da saúde de mulheres osteopênicas na pós-menopausa. Foi um estudo clínico randomizado (ECR) duplo-cego durante um ano e avaliou ainda o efeito da melatonina em cultura de osteoblastos e osteoclastos. Foram estudadas 22 mulheres osteopênicas, na pós-menopausa com idades entre 49 a 75 anos. O tratamento com MSDK aumentou a DMO na coluna lombar (4,3%) e no colo do fêmur esquerdo (2,2%), com uma tendência de aumento no quadril esquerdo total ($p=0,069$). O tratamento com MSDK aumentou os níveis séricos de P1NP (propeptídeo terminal do colágeno do tipo 1, marcador de formação óssea) e reduziu o turnover ósseo avaliado pela dosagem de CTX (interligadores terminais do colágeno do tipo 1, marcador de reabsorção óssea). Células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs) e monócitos de sangue periférico humano (hPBMCs) expostos ao MSDK, cultivados em culturas *transwells* ou em camadas, demonstraram aumento na osteoblastogênese, diminuição na osteoclastogênese, aumento nos níveis de OPG (TNFRSF11B) e diminuição nos níveis de RANKL (TNFSF11). Nos osteoblastos em culturas *transwells*, o MSDK aumentou os níveis de pERK1/2 (MAPK1/MAPK3) e RUNX2; diminuiu os níveis de ERK5 (MAPK7); e não afetou a expressão de NF- κ B (NFKB1) e β 1integrina (ITGB1). Nos osteoblastos em camadas, o MSDK também diminuiu a expressão das proteínas metabólicas PPAR γ e GLUT4. Em MSCs derivadas de tecido adiposo humano, o MSDK induziu a osteoblastogênese (Maria, 2017).

Em termos de segurança, os ensaios foram criticados por apresentarem uma metodologia pouco expressiva na comunicação de eventos adversos e por não

considerarem previamente quais eventos adversos deveriam ser relevantes. Além disso, apenas um ensaio clínico de toxicidade, que não estava relacionado ao metabolismo ósseo, considerou a segurança da melatonina como desfecho primário. Nesse estudo clínico, que avaliou voluntários saudáveis, a administração oral de melatonina na dose de 10 mg/dia durante quatro semanas, não produziu resultados adversos significativos que pudessem comprometer seu uso diário nessa dose pelo período de quatro semanas (Seabra *et al.*, 2000).

Revisões das evidências clínicas, geralmente, concordam que a suplementação oral de melatonina a curto, médio e longo prazo (por dias, semanas a meses e anos, respectivamente) é segura, sendo associada apenas a efeitos adversos leves e transitórios, como tontura, sonolência, náusea e dor de cabeça. Nenhuma dose foi associada a efeitos adversos graves. No entanto, a melatonina tem sido ligada a distúrbios endócrinos, como no metabolismo da glicose, bem como disfunções cardiovasculares (variabilidade na frequência cardíaca e pressão arterial), aparentemente em resposta à dosagem, horário da dosagem e, possivelmente, interações entre melatonina e medicamentos anti-hipertensivos.

Portanto, a eficácia e segurança da melatonina em humanos ainda gera controvérsias. Primeiramente, a escassez de ensaios duplo-cegos, randomizados e controlados por placebo dificulta a obtenção de conclusões definitivas sobre os efeitos da suplementação de melatonina, especialmente devido à falta de números o que afeta o poder estatístico (Ferlazzo, 2020).

2.9 JUSTIFICATIVA DA ESCOLHA DAS DOSES DE MELATONINA

As doses de 20 e 50 mg/kg foram selecionadas considerando que roedores apresentam metabolismo e depuração muito mais acelerados do que humanos, exigindo quantidades proporcionalmente maiores por quilo para alcançar a exposição sistêmica (AUC) necessária ao efeito biológico de interesse. Em farmacologia pré-clínica, a questão central não é apenas “quantos mg/kg?”, mas sim qual a exposição alvo (AUC/Cmax ao longo da noite) é necessária para modular a remodelação óssea (Zhao *et al.*, 2022).

Na literatura, doses na faixa de 20–50 mg/kg têm sido amplamente utilizadas em roedores quando se busca prova de conceito em tecidos sob forte controle circadiano, como o osso. Tais doses compensam a rápida depuração, aumentam a

probabilidade de observar diferenças significativas nos desfechos histomorfométricos e permanecem dentro de limites de segurança para o animal (Pejon *et al.*, 2025; Yang *et al.*, 2022). Além disso, o uso de duas doses bem espaçadas permite testar uma relação dose–resposta, partindo da hipótese de que 50 mg/kg apresentaria maior efeito que 20 mg/kg, mantendo a viabilidade prática (volumes seguros de gavagem) e aderindo aos princípios da experimentação animal (Cardinali *et al.*, 2024). No contexto translacional, não se migra diretamente de mg/kg de roedor para humano. A estratégia correta é construir uma ponte por exposição, reproduzindo no humano a exposição noturna (AUC) que se mostrou eficaz em roedores. Isso resulta em doses muito menores (tipicamente 3–10 mg por noite), preferencialmente em formulações de liberação prolongada para sustentar níveis plasmáticos durante o sono e respeitar a cronofarmacologia, ou seja, administração próxima ao início do período de repouso (Malakoti *et al.*, 2022).

A conversão alométrica simples (como $6/37 \approx 0,162$) tem valor apenas teórico e não é aplicável clinicamente para melatonina, devido às diferenças nas vias metabólicas entre espécies. Portanto, a escolha de 20 e 50 mg/kg em roedores se justifica para garantir exposição suficiente diante da alta depuração, maximizar o poder estatístico para detectar efeitos no osso e, ao mesmo tempo, facilitar a extrapolação translacional baseada em parâmetros farmacocinéticos, preservando segurança e relevância clínica (Xu *et al.*, 2018).

Com base na literatura, hipotetiza-se que, em condição de hipoestrogenismo (modelo OVX), a melatonina seja capaz de reduzir a reabsorção óssea e preservar a microarquitetura trabecular em comparação ao placebo. Espera-se ainda um efeito dependente da dose, com 50 mg/kg superior a 20 mg/kg, enquanto em ratas SHAM os efeitos sejam discretos ou ausentes (Zhao *et al.*, 2022; Cardinali *et al.*, 2024).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Este estudo é um estudo experimental, pré-clínico, randomizado e controlado.

3.2 AMOSTRA E LOCAL DO ESTUDO

O trabalho foi realizado no Biotério da Universidade Positivo (UP), em parceria com o laboratório PRO (Patologia Renal e Óssea) do Instituto Pró-Renal, a PPGMICS (Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná) e o SEMPR (Serviço de Endocrinologia e Metabologia da Universidade Federal do Paraná).

Os animais testados eram ratas da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*) provenientes do Biotério da UP, Campus do Campo Comprido, em Curitiba-PR. Todos os procedimentos, que envolvem experimentação animal, foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Experimentação Animal, de acordo com o Guia dos Institutos Internacionais de Saúde para o cuidado e uso de animais de laboratório e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Positivo, aprovados sob protocolo número 550-19 (Apêndice I). Após a aprovação, foram avaliadas fêmeas adultas com peso corpóreo de $246,9 \pm 21,8$ (OVX) e $239,6 \pm 14,3$ (SHAM) pré-ovariectomia e $293,9 \pm 36,8$ (OVX) e $255,2 \pm 14,7$ (SHAM) pré-eutanásia. Com 20 semanas de vida foram submetidas à ovariectomia (n=30) e à cirurgia SHAM (n=30), nas dependências do Biotério da UP. Os animais foram alojados em duplas ou trios, em caixas sob condições padrão de temperatura e umidade controladas, expostos a um período de 12 horas ciclo claro/escuro, com acesso à dieta alimentar com ração Labina (Presense®) e água filtrada *ad libitum*.

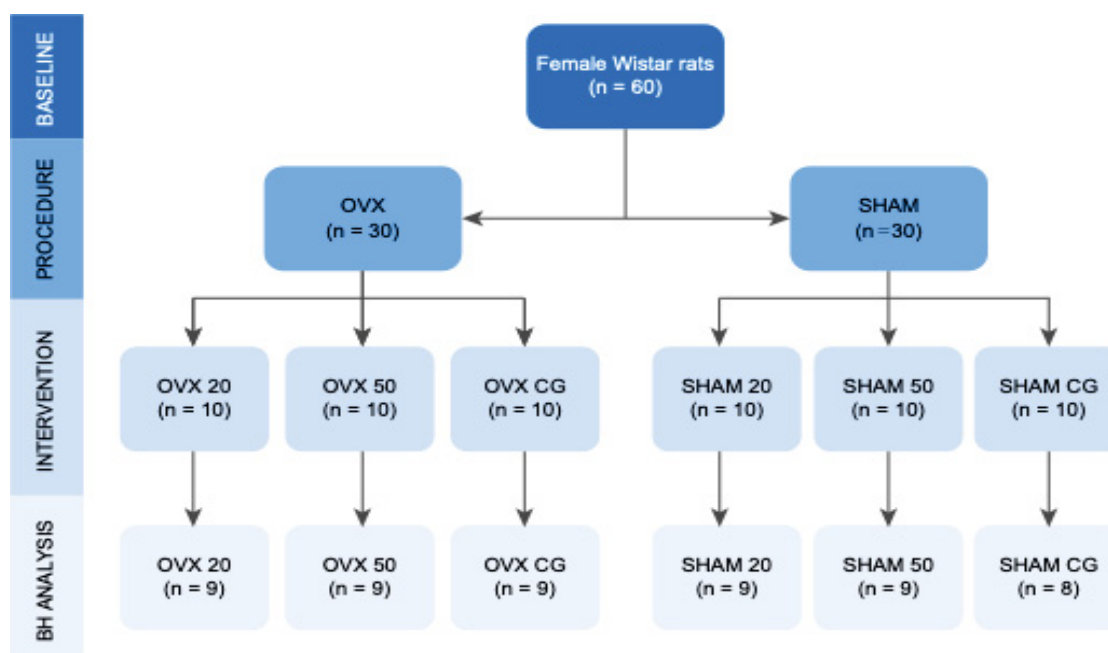
O trabalho *in vivo* foi dividido em Fase I e Fase II, sendo que a primeira fase correspondeu ao período de indução da menopausa (com 20 semanas, sendo que doze semanas após a ovariectomia, foi iniciada a administração de doses variáveis de melatonina conforme a distribuição dos grupos como mostra a figura a seguir (FIGURA 4).

A administração da melatonina ou medicação placebo (1,5 mL de água fluorada) por gavagem foi diária durante oito semanas e ocorreu sempre entre 18 e

19 horas. Foi utilizada Melatonina líquida ($C_3H_{16}N_2O_2$, peso molecular 232,28 g/mol, fabricante Tianjin Harmony Technology, lote fabricante ML 190903, lote de produção 0245/0720) e na concentração de 10 mg/mL manipulada, não diluída da Farmácia Fraganza, em Curitiba-PR, Brasil. A solução salina administrada respeitou os mesmos volumes dos grupos de tratamento.

O objetivo na Fase I foi o de induzir a menopausa em 30 destes animais, por meio da retirada do ovário e do útero (Grupo OVX). A cirurgia SHAM foi realizada também em 30 ratas, com o objetivo de submeter o animal ao mesmo procedimento anestésico e estresse físico causado pela ovariectomia. Duas ratas do grupo SHAM não resistiram à cirurgia, o que resultou num total de 28 animais neste grupo (FIGURA 4).

Figura 4 – Fluxograma de alocação das ratas Wistar por procedimento e dose de melatonina (20 mg/kg, 50 mg/kg, controle)

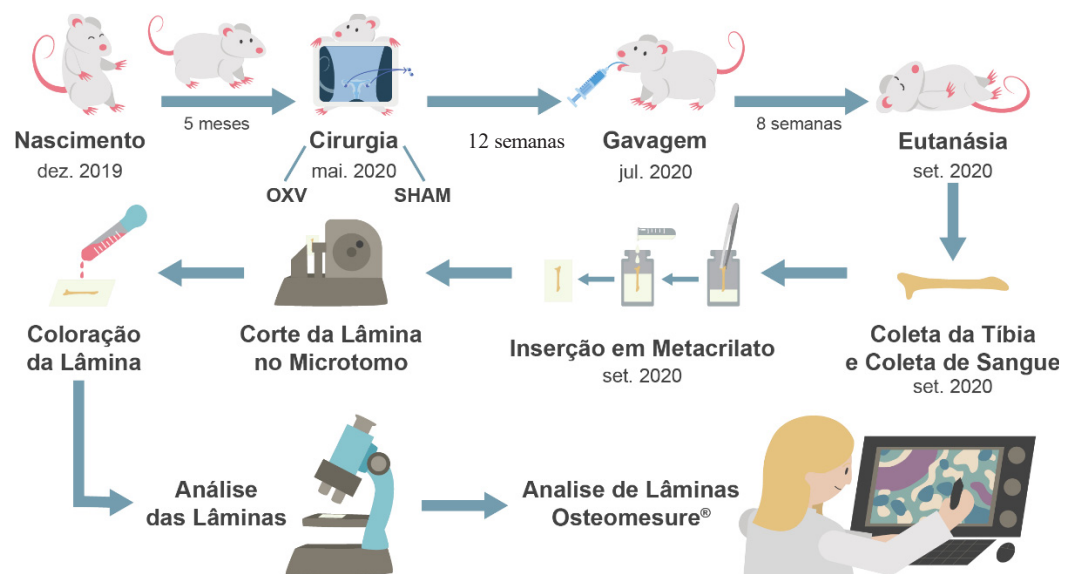


Fonte: Elaborada pela autora (2025).

A segunda fase do estudo ocorreu em 21 e 22 de setembro de 2020. Os animais foram inicialmente colocados em câmara de CO_2 até atingirem inconsciência (perda dos reflexos), garantindo anestesia profunda; quando necessário, administrou-se dose adicional de anestésico para assegurar ausência de dor. Nessa condição, realizou-se punção intracardíaca com seringa de 5,0 mL e agulha 25 × 7 mm para a coleta de 5,0 mL de sangue total por animal. A coleta configurou exsanguinação terminal, resultando no óbito do animal ainda sob anestesia. Em seguida, procedeu-se à dissecação do membro posterior direito para remoção da tíbia. As amostras ósseas

foram acondicionadas em álcool etílico e identificadas pelo número do animal (FIGURA 5).

Figura 5 – Linha do tempo do estudo: nascimento, cirurgia (OVX/SHAM), gavagem por 8 semanas, eutanásia e processamento histológico até a análise histomorfométrica



Fonte: Elaborada pela autora (2025).
Ilustrações/arte: @amarilando

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1. Análises hematológicas e bioquímicas

Por meio da punção intracardíaca foi realizada a coleta de 5 mL de sangue. Um total de 0,5 mL foi armazenado em tubo coletor com EDTA, sendo realizado o hemograma em contador automático, Hematologia Mindray BC-2800 Vet®. Um total de 4,5 mL foram armazenados em tubo coletor com ativador de coágulo. Este material foi centrifugado no mesmo dia, em centrífuga de tubos Hoffmann Lab. HCL4® para a separação do soro, que foi armazenado em -70°C. Este material foi posteriormente analisado em aparelho Bioquímico Mindray BS-230® com kits bioquímicos da marca

Labtest®. Os tubos foram devidamente etiquetados com os dados de cada animal. A avaliação laboratorial incluiu alanina-aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), creatinina, proteínas totais, albumina, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (VLDL), triglicerídeos e hemoglobina glicada.

3.3.2 Preparação do material para Histomorfometria óssea

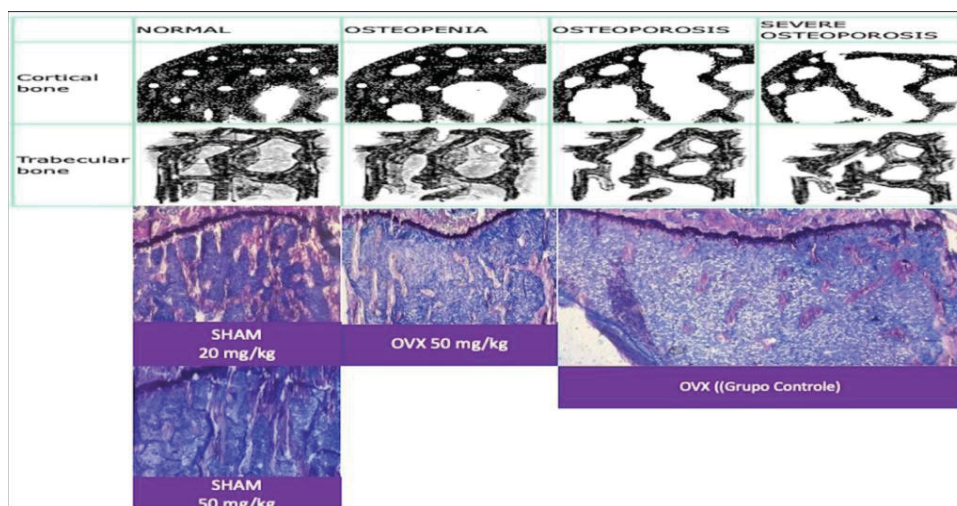
As amostras de tíbia permaneceram inicialmente em etanol a 70% por 20 dias (fixação). Em seguida, foram submetidas ao preparo para emblocamento por resina, utilizando respectivamente: álcool absoluto (99%) por 10 dias, Xilol por 24 horas, solução A (metil metacrilato, diisobutilftalato e peróxido de benzoíla) por 10 dias, solução a 1% (metil metacrilato e peróxido de benzoíla) por 10 dias e solução a 2% (diisobutilftalato e peróxido de benzoíla) por sete dias. Após finalizado esse processo de troca de soluções, as amostras foram colocadas em uma pré-base de solução a 2%, feita em frasco de vidro de 100 mL, já polimerizada em estufa para posterior inclusão. O frasco foi completado com solução a 2%, lacrado para total vedação e colocado em estufa a 37°C por três dias. Com o bloco polimerizado o frasco foi quebrado e submetido a cortes em micrótomo rotativo Leica ® RM2165 com espessura de 6 mm para lâmina corada com azul de toluidina a 1%. Todo o preparo e processamento foi realizado no Laboratório PRO da Fundação Pró-Renal.

3.3.3 Histomorfometria óssea (HO)

Todas as análises de HO foram realizadas pelo mesmo investigador usando um microscópio (Nikon Labophot II, Tóquio, Japão) equipado com câmera de vídeo colorida de alta resolução UV (Olympus DP71, Center Valley, PA, EUA). O sistema de análise de imagem utilizado foi o Osteomesure (Osteometrics, Inc., Atlanta, GA, EUA). A análise foi realizada no Laboratório PRO (Patologia Renal e Óssea) da Fundação Pró-Renal em Curitiba, Paraná, Brasil. Foram analisados: a) parâmetros estruturais, como volume ósseo (BV/TV), espessura trabecular (Tb. Th), número de trabéculas (Tb. N) e separação entre as trabéculas (Tb. Sp); b) parâmetros estáticos de remodelação óssea (espessura osteóide [O. Th]), superfície osteóide (OS/BS), superfície de erosão (ES/BS), e superfície osteoblástica (Ob.S/BS) (KULAK & DEMPSTER, 2010), cujos índices foram expressos de acordo com as recomendações

do Comitê de Nomenclatura da *American Society of Bone and Mineral Research* (ASBMR) (DEMPSTER *et al.*, 2013) (QUADRO 1).

Quadro 1 – Comparação esquemática das lâminas analisadas pela técnica histomorfometria óssea



Acervo de lâminas de Sandmann-Afonso F. C. & Moreira C. A.

Comparação entre diagramas em preto e branco da University of Washington (Seattle), elaborados pela Prof.^a Susan Ott (uso autorizado por e-mail), que representam padrões de osso normal, osteopenia, osteoporose e osteoporose severa, e imagens coloridas representativas das lâminas do presente estudo.

No grupo OVX controle, observa-se perda do trabeculado e maior espaçamento intertrabecular, compatível com osteoporose/osteoporose severa. No grupo OVX tratado com melatonina 50 mg/kg, evidencia-se melhor preservação do trabeculado, aproximando-se do padrão de osteopenia. Nos grupos SHAM (20 e 50 mg/kg), a microarquitetura trabecular permanece praticamente preservada, semelhante ao padrão normal.

Fonte: Elaborado pela autora. Adaptado de Susan Ott, 2023

3.3.4 Dosagem de CTX

A dosagem de CTX (*cross linked C - telopeptide of type I collagen*) foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da UFPR. Utilizamos o *kit* para ensaio imunoenzimático (ELISA) E-EL-R1456 (Elabscience, USA) para determinação da concentração de CTX em soro de ratas. Inicialmente realizamos um ensaio teste para a escolha da diluição do soro, e a melhor diluição encontrada foi 1: 5 para a realização do ensaio conforme o manual. Esse *kit* utiliza o princípio de ELISA *sandwich*. A microplaca fornecida nesse *kit* foi previamente revestida com um anticorpo específico para CTX de rato. As amostras (ou padrões) foram adicionadas aos poços da microplaca, incubadas por 90 min a 37°C. Posterior a incubação, as amostras foram descartadas e, então, um anticorpo de detecção biotilado específico para CTX de rato foi adicionado em cada poço, incubado por 60 min a 37°C. A microplaca foi lavada com tampão de lavagem (fornecido pelo

fabricante) e, então, a estreptavidina conjugada com HRP (*horseadish peroxidase*) foi adicionada a cada poço da microplaca e incubado por 30 min a 37°C. A placa foi novamente lavada e a solução de substrato para a enzima adicionada na etapa anterior (TMB) foi adicionada a cada poço, incubada no escuro a 37°C. A reação enzima-substrato foi encerrada pela adição da solução de parada e a densidade óptica (DO) medida por espectrofotometria (EL800, BioTek Instruments, USA) em um comprimento de onda de 450 nm. O valor da DO é proporcional à concentração de CTX, sendo possível calcular a concentração de CTX nas amostras comparando a DO das amostras com a curva padrão. De acordo com o fabricante, o valor de referência de amostras normais de soro de rato é 12-25 ng/mL e o limite de detecção é de 0,16 ng/mL.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística e a elaboração dos gráficos foram realizadas utilizando o IBM SPSS, v. 28.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA) e o GraphPad Prism, v. 10 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro–Wilk. As variáveis quantitativas são apresentadas como médias e desvios-padrão.

Os coeficientes de correlação de Pearson ou de Spearman foram aplicados para analisar correlações entre variáveis quantitativas. Nas comparações envolvendo três grupos, empregou-se a análise de variância unidirecional (one-way ANOVA) com teste *post hoc* de Bonferroni para as variáveis que atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. As variáveis quantitativas sem distribuição normal foram comparadas pelo teste de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dunn com correção de Bonferroni para os valores de p. Um modelo de ANOVA para medidas repetidas foi utilizado para analisar os pesos dos animais nos cinco pontos de avaliação, examinando as interações entre grupos e tempo de avaliação, as diferenças entre grupos e as diferenças ao longo do tempo. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Apresentam-se nas páginas seguintes dois artigos. Um foi submetido à *Revista de Saúde de Santa Maria* de classificação B1, segundo avaliação da Plataforma Sucupira, com título " BONE-PROTECTIVE EFFECTS OF MELATONIN IN OVARECTOMIZED RATS:INSIGHTS FROM HISTOMRPHOMETRY" em 04/09/2025.

Esse artigo foi aceito e publicado na versão online também no dia 04/09/2025 (Afonso FS, Ceron R, Reck AM, Santos LC, Bavia L, Prodocimo MM, Roskamp L, Casagrande TAC, Andrade VFC, Moreira CA., 2025).

O segundo artigo tem a confirmação da submissão à revista *Calcified Tissue* como um "*short communication*", de classificação A 1 segundo a plataforma SUCUPIRA com o título " MELATONIN MODULATES β -CATENIN AND NEWLY IDENTIFIES AS A PUTATIVE TARGET IN BONE TISSUE OF OVARECTOMIZED RATS" , submetido em 07/09/2025.

Os artigos estão formatados segundo os parâmetros exigidos pelos periódicos.

4.1.1 Primeiro artigo

Mensagens	
Nota	De
Prezados Fatima Sandmann Afonso, Biomed., Dra., Em relação ao seu artigo intitulado "Bone-protective effects of melatonin in ovariectomized rats: insights from histomorphometry", submetido à revista Saúde (Santa Maria), ELE FOI ACEITO PARA PUBLICAÇÃO. Conforme orientação desse periódico, em submeter novamente o artigo com as modificações sugeridas pelos avaliadores, e colocando em destaque essas modificações, atestamos que todas foram efetuadas, e portanto o artigo foi aceito. Por problemas técnicos, na plataforma, entendemos que não houve possibilidade de anexar na primeira submissão, e portanto nós sugerimos esta nova submissão. Destacamos que a Revista Saúde (Santa Maria) sentir-se-á honrada em receber futuros trabalhos de sua autoria. Estamos a disposição para eventuais dúvidas, Att.	rhorneer 2025-09-04 08:50
Revista Saúde (Santa Maria) https://periodicos.ufsm.br/revistasauade/	

Bone--protective effects of melatonin in ovariectomized rats: insights from histomorphometry

<https://doi.org/10.5902/2236583493537>

Efeitos protetores da melatonina no osso em ratas ovariectomizadas: insights a partir da histomorfometria

F.C. Sandmann-Afonso^{1,2,3}, R. Ceron^{1,3}, A. Reck⁴, L.C. Santos^{3,5}, L. Bavia⁶, M. M. Prodocimo⁶

L. Roskamp⁵, T. A. C. Casagrande⁴, V. F. C. Andrade^{1,2,3}, C. A. Moreira^{1,2,3}

1. Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde (PPGMICS) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil
2. Serviço de Endocrinologia e Metabologia (SEMPR)- Departamento Medicina Interna da UFPR, Curitiba, PR, Brasil
3. Centro de Pesquisa Acadêmica, Instituto Pró Renal, Curitiba, PR, Brasil
4. Curso de Medicina Veterinária da Universidade Positivo, Curitiba, PR, Brasil
5. Universidade Tuiuti de Odontologia, Curitiba, PR, Brasil
6. Laboratório de Toxicologia Celular da UFPR, Curitiba, PR, Brasil

Corresponding Author

Fatima Corrêa Sandmann Afonso fatimasandmann@ufpr.br; fatimasandmann@yahoo.com.br
PRO Laboratory - Renal and Bone Pathology
Rua Vicente Machado, 2190, CEP: 80440-020, Curitiba-PR, Brasil

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

Fatima Corrêa Sandmann Afonso, Rafaela Ceron, Angela Reck, Letícia Capote, Lorena Bavia, Maritana Mela Prodocimo, Liliane Roskamp, Thais Casagrande, Vicente F. Castaldo Andrade, and Carolina de Aguiar Moreira declare no potential conflicts of interest.

Disclosure Summary

I, Fatima Corrêa Sandmann Afonso, the corresponding author designated, on behalf of myself and my coauthors, transfers and assigns the rights, titles, and interests, including copyrights and any moral rights, to the manuscript named in this submission.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

ABSTRACT

Introduction: Melatonin secretion decreases with aging and menopause, potentially impairing skeletal health by affecting bone remodeling and increasing the risk of postmenopausal osteoporosis. **Objective:** To evaluate the effects of melatonin on structural and remodeling parameters in tibiae of ovariectomized (OVX) and sham-operated (SHAM) female rats. **Methods:** Sixty female Wistar rats underwent OVX (n=30) or SHAM surgery (n=30) at 20 weeks of age. After surgery, each group was

divided into three subgroups (n=10) that received melatonin at 20 mg/kg, 50 mg/kg, or placebo via oral gavage for 8 weeks, starting 12 weeks post-surgery. At 40 weeks of age tibiae were collected for histomorphometric analysis. Results: Both 20 mg/kg and 50 mg/kg doses maintained bone volume fraction (BV/TV). The 50 mg/kg dose preserved trabecular number (Tb.N), trabecular separation (Tb.Sp), and significantly decreased eroded surface (ES/BS), indicating preserved bone microarchitecture and reduced resorption. In SHAM rats, melatonin at 50 mg/ kg also reduced ES/BS. No correlation was found between body weight and bone parameters. HbA1c levels were significantly lower in OVX rats treated with melatonin at both doses. No significant changes were observed in other biochemical markers or CTX levels. Conclusion: Melatonin, particularly at 50 mg/kg, significantly preserves bone microarchitecture and attenuates bone loss in OVX rats. Its limited effect in SHAM rats underscores its efficacy under hypoestrogenic conditions. These findings highlight the potential of melatonin as a therapeutic agent for menopause-related bone loss and metabolic complications, supporting further translational research.

Keywords: Melatonin; Histomorphometry; Hypoestrogenism; Menopause; Female Wistar Rats

RESUMO

Introdução: A secreção de melatonina diminui com o envelhecimento e a menopausa, podendo prejudicar a saúde esquelética ao afetar a remodelação óssea e aumentar o risco de osteoporose pós-menopausa. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da melatonina sobre parâmetros estruturais e de remodelação nas tíbias de ratas fêmeas Wistar ovariectomizadas (OVX) e submetidas à cirurgia SHAM. **Métodos:** Sessenta ratas Wistar foram submetidas à OVX (n=30) ou cirurgia SHAM (n=30) com 20 semanas de idade. Após a cirurgia, cada grupo foi dividido em três subgrupos (n=10) que receberam melatonina na dose 20 mg/kg, 50 mg/kg ou placebo por gavagem oral por 8 semanas, iniciadas 12 semanas após a cirurgia. Quando os animais atingiram 40 semanas de idade, as tíbias foram coletadas para análise histomorfométrica. **Resultados:** Ambas as doses (20 e 50 mg/kg) mantiveram a fração de volume ósseo (BV/TV). A dose de 50 mg/kg preservou o número de trabéculas (Tb.N), a separação entre as trabéculas (Tb.Sp) e reduziu significativamente a superfície erodida (ES/BS), evidenciando preservação da microarquitetura óssea e diminuição da reabsorção. Em ratas SHAM, a melatonina na dose de 50 mg/kg também reduziu ES/BS. Não foi observada correlação entre peso corporal e parâmetros ósseos. Os níveis de HbA1c foram significativamente menores nas ratas OVX tratadas com melatonina em ambas as doses. Não foram observadas alterações significativas em outros marcadores bioquímicos ou nos níveis de CTX. **Conclusão:** A melatonina, particularmente na dose de 50 mg/kg, preservou significativamente a microarquitetura óssea e atenuou a perda óssea em ratas OVX. Seu efeito limitado em ratas SHAM evidencia que a eficácia da melatonina é maior em condições de deficiência estrogênica. Esses achados destacam o potencial da melatonina como agente terapêutico para a perda óssea e as complicações metabólicas

relacionadas à menopausa, apoiando a realização de pesquisas translacionais adicionais.

Palavras-chave: Melatonina; Histomorfometria; Hipoestrogenismo; Menopausa, Ratas *Wistar*

INTRODUCTION

Melatonin is a molecule present in several species. It is primarily produced by the pineal gland and plays a role as a hormone in vertebrates, especially in mammals. Melatonin secretion by the pineal gland peaks at night and decreases in the morning, thereby regulating the 12h:12h light/dark cycle and circadian rhythms in response to daily and seasonal variations in light and darkness¹. In sleep processes, melatonin synchronizes circadian rhythms and improves the onset, duration, and quality of sleep². Its actions can occur through binding to receptors located on cell membranes and mitochondria, or independently through its antioxidant properties and free-radical neutralization³. Melatonin is also involved in several other processes, including metabolic, immune, reproductive, and brain functions³⁻⁵.

Hypoestrogenism, a condition characterized by reduced circulating estrogen levels, during menopause, leads to accelerated bone resorption, decreased bone mineral density, and increased risk of fractures, representing a major contributor to osteoporosis in women⁶. Importantly, hypoestrogenism may alter melatonin secretion patterns, suggesting a complex interplay between these hormones in maintaining skeletal health⁷. Emerging evidence indicates that melatonin supplementation may partially counteract the detrimental effects of estrogen deficiency on bone, highlighting its potential therapeutic role in hypoestrogenic states; several studies have shown beneficial effects of melatonin on bone metabolism⁸. *In vitro* studies have demonstrated that melatonin positively influences bone health by promoting osteoblastogenesis while inhibiting osteoclastic activity⁹⁻¹¹. Animal studies have also shown the effects of melatonin on bone remodeling¹². These findings indicate a potential role for melatonin in preventing osteoporosis in postmenopausal women¹³.

Bone histomorphometry, the gold-standard method for assessing bone microarchitecture and remodeling¹⁴, is widely used in research to evaluate the effect of drugs on bone tissue¹⁵. Previous studies using this technique have described changes in bone metabolism in animals administered melatonin at various doses at

different ages^{16,17}. Due to differing methodologies in these studies, questions remain about the effects and optimal doses of melatonin on bone tissue in models of hypoestrogenism and high remodeling.

Based on these considerations, the aim of the present study was to evaluate the effect of two different doses of melatonin on structural and remodeling parameters, assessed by bone histomorphometry in adult female Wistar rats subjected to ovariectomy (OVX) or SHAM surgery.

METHODS

This is a randomized, controlled, preclinical experimental study conducted in ovariectomized and SHAM-operated female Wistar rats to evaluate the effects of melatonin supplementation on bone microarchitecture and metabolic parameters. The study protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Use at Positivo University (CEUA-UP) under protocol number 550. All experimental procedures were conducted in accordance with the guidelines for animal experimentation established by the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). Adult female Wistar rats were acquired from the Animal Vivarium, and the animals were maintained in autoclaved cages with wood-shaving bedding, under standardized conditions (22°C, 12h:12h- light/dark cycle) and without access to voluntary exercise. They received *ad libitum* access to standard chow (Labina; ADM Presence, Santa Rosa, Brazil) and filtered water, which was renewed every 48 hours. The animals were subjected to ovariectomy (OVX group; n=30) or SHAM surgery (SHAM group; n=30) at the age of 20 weeks. Both procedures were performed following a pre-anesthetic protocol that included the administration of morphine (2 mg/kg), ketamine (100 mg/kg), and xylazine (20 mg/kg), with anesthesia maintained with isoflurane inhalation supported by oxygen. After confirmation of anesthesia, trichotomy and asepsis with 70% alcohol and povidone-iodine were performed. In dorsal recumbency, a midline incision was made, and the ovaries were identified, clamped, and removed. The abdominal wall was closed in two layers (muscle and skin) using 3-0 polyglactin sutures with a simple interrupted pattern and double ligature. In the SHAM group, the ovaries were left intact. Postoperative analgesia included a single subcutaneous dose of tramadol hydrochloride (5 mg/kg) and oral ibuprofen (15 mg/kg) every 12 hours for 3 days.

Each group was further categorized into three subgroups according to the allocated intervention. Two animals from the control group did not survive the surgery, and we were unable to use the tibiae of four other animals for histomorphometric analysis. The final distribution was as follows: melatonin 20 mg/kg – OVX 20 (n=9) and SHAM 20 (n=9); melatonin 50 mg/kg – OVX 50 (n=9) and SHAM 50 (n=9); and control group (CG) – OVX CG (n=10) and SHAM CG (n=8). Starting 12 weeks after surgery, the animals received their assigned daily dose of melatonin (liquid synthetic melatonin, Fraganza Compounding Pharmacy, Curitiba, Brazil) or placebo (1.5 mL of filtered water orally) via gavage, administered one to two hours prior to lights off, aligning with the beginning of the dark phase. The intervention was conducted over 8 weeks, with melatonin doses adjusted based on body weight, which was recorded at the time of surgery, at treatment initiation (12 weeks after surgery), and at 15-day intervals throughout the experimental period. Euthanasia and biochemical analysis were performed at the end of the 8-week melatonin administration period. The animals were placed in a CO₂ chamber until unconsciousness was achieved. Subsequently, a 5 mL blood sample was collected via intracardiac puncture, followed by euthanasia with a lethal dose of anesthetic. Biochemical analyses—including alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), creatinine, total protein, total cholesterol, triglycerides, glycated hemoglobin (HbA1c), and C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) were conducted using a Mindray BS-230 analyzer with Labtest kits. These tests aimed to assess the effects of melatonin or placebo on bone resorption, lipid and glycemic profiles, and potential hepatic and renal toxicity.

CTX levels were measured at the Molecular Biology Laboratory using an immunoenzymatic assay kit (E-EL-R1456, Elabscience, Houston, TX, USA) based on the sandwich ELISA principle. Bone histomorphometry was performed on the right tibia, which was removed postmortem and fixed in 70% alcohol. The samples were embedded in polymethylmethacrylate (Polysciences, USA), sectioned longitudinally at 6 µm using a Leica RM2235 microtome, and stained with toluidine blue (Merck, Germany). Analyses were conducted using a Nikon Labophot II microscope equipped with an Olympus DP71 camera and OsteoMeasure software (OsteoMetrics, USA) by a single investigator (CAM) at the Bone Pathology Laboratory in Fundação Pró-Renal. The evaluated parameters followed the ASBMR guidelines¹⁸ and included structural parameters such as bone volume fraction (BV/TV, %), trabecular thickness (Tb.Th, µm), trabecular separation (Tb.Sp, µm), and trabecular number (Tb.N, n/mm). Static

formation parameters assessed were osteoid thickness (O.Th, μm), osteoid surface per bone surface (OS/BS, %), and osteoblast surface per bone surface (Ob.S/BS, %).

Additionally, static resorption was evaluated by measuring eroded surface per bone surface (ES/BS, %). Statistical analysis and graph generation were performed using IBM SPSS v.28.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. Quantitative variables are expressed as means $\pm$ standard deviations. Pearson or Spearman correlation coefficients were used to assess associations between quantitative variables. For comparisons among three groups, one-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test was applied when assumptions of normality and homogeneity of variance were met. Non-normally distributed variables were analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test with Bonferroni correction. Repeated-measures ANOVA was used to analyze body weight over time, evaluating interactions between groups and time points. A significance level of $p < 0.05$ was adopted for all analyses.

RESULTS

Table 1 presents the results of the structural and static histomorphometric parameters for the OVX CG, OVX 20, and OVX 50 subgroups. Significant differences were observed among the groups for BV/TV ($p < 0.001$), Tb.Sp ($p = 0.005$), Tb.N ($p = 0.015$), and ES/BS ($p < 0.001$). *Post hoc* analysis showed that BV/TV was significantly higher in OVX 50 and OVX 20 compared to OVX CG ($p < 0.001$ and 0.042 , respectively). For Tb.Sp, a significant decrease was observed in the OVX 50 group compared to OVX CG ($p=0.040$), and for Tb.N, a significant increase was observed ($p=0.013$). Regarding ES/BS, significant differences were observed between OVX 50 and OVX 20 when compared to OVX CG ($p = 0.002$ and $p=0.029$, respectively).

Table 1. Structural and static histomorphometric parameters in ovariectomized rat subgroups

Parameter	OVX CG	OVX 20	OVX 50	p value
BV/TV (%)	13.18 (± 3.63)	17.10 ± (3.38)	20.91 (± 2.51)	<0.001*‡
Tb.Th (µm)	48.49 (± 8.98)	54.49 (± 7.36)	57.29 (± 8.88)	0.086
Tb.Sp (µm)	336.86 (± 102.46)	268.15 (± 57.85)	218.76 (± 30.28)	0.005* ‡
Tb.N (n/mm)	2.76 (± 0.77)	3.09 (± 0.51)	3.65 (± 0.50)	0.015*‡
O.Th (µm)	2.55 (± 0.84)	3.04 (± 1.54)	2.31 (± 0.42)	0.330
OS/BS (%)	5.93 (± 5.61)	6.64 (± 4.21)	3.16 (± 1.25)	0.195
ES/BS (%)	6.64 (± 3.01)	3.93 (±1.81)	2.08 (± 0.82)	<0.001*‡
Ob.S/BS (%)	2.04 (± 1.59)	3.01 (± 1.94)	2.92 (± 1.33)	0.374

Abbreviations: BV/TV: bone volume/tissue volume; Tb.Th = trabecular thickness; Tb.Sp = trabecular separation; Tb.N = trabecular number; O.Th = osteoid thickness; OS/BS = osteoid surface/bone surface; ES/BS = eroded surface/bone surface; Ob.S/BS = osteoblastic surface/bone surface.

Data are presented as mean ± standard deviation. * p<0.05 by one-way analysis of variance (ANOVA). ‡ *post hoc* comparisons showed statistically significant differences between subgroups as follows: BV/TV: OVX 50 vs. OVX CG (p< 0.001), OVX 20 vs. OVX CG (p=0.042); Tb.Sp: OVX 50 vs. OVX CG (p=0.040); Tb.N: OVX 50 vs. OVX CG (p=0.013); ES/BS: OVX 50 vs. OVX CG (p=0.002); OVX 20 vs. OVX CG (p=0.029).

Table 2 presents the results of the structural and static histomorphometric parameters in the SHAM CG, SHAM 20, and SHAM 50 subgroups. A significant difference was observed among the SHAM subgroups for ES/BS (p = 0.027). *Post hoc* analysis revealed that ES/BS was significantly higher in the SHAM CG subgroup compared to SHAM 50 (p = 0.026).

Table 2. Structural and static histomorphometric parameters in SHAM-operated rat subgroups

Parameter	SHAM CG	SHAM 20	SHAM 50	<i>p</i> value
BV/TV (%)	21.14 (± 2.46)	25.11 (± 5.80)	22.79 (± 4.41)	0.211
Tb.Th (µm)	44.98 (± 5.99)	48.81 (± 8.02)	45.59 (± 4.67)	0.420
Tb.Sp (µm)	156.86 (± 21.18)	148.8 (± 28.55)	161.03 (± 45.62)	0.741
Tb.N (n/mm)	5.08 (± 0.74)	5.05 (± 0.76)	5.01 (± 0.93)	0.984
O.Th (µm)	2.72 (± 0.83)	2.89 (± 0.58)	2.31 (± 0.42)	0.162
OS/BS (%)	3.40 (± 2.50)	2.51 (± 2.01)	1.33 (± 2.50)	0.547
ES/BS (%)	4.36 (± 3.54)	2.34 (± 1.34)	1.33 (± 0.88)	0.027*‡
Ob.S/BS (%)	1.95 (± 2.60)	1.48 (± 1.51)	2.13 (± 1.11)	0.331

Abbreviations: BV/TV = bone volume/tissue volume;
Tb.Th = trabecular thickness; Tb.Sp = trabecular separation;
Tb.N = trabecular number; O. Th = osteoid thickness;
OS/BS = osteoid surface/bone surface; ES/BS = eroded surface/bone surface;
Ob.S/BS = osteoblastic surface/bone surface. Data are presented as mean
± standard deviation. * One-way analysis of variance (ANOVA), $p < 0.05$.
‡ *post hoc* analysis, SHAM 50 vs. SHAM CG, $p = 0.026$.

We also compared BV/TV (%) between OVX and SHAM groups. OVX control (OVX CG) rats showed a BV/TV of $13.18 \pm 3.63\%$, significantly lower than SHAM controls (SHAM CG; $21.14 \pm 2.46\%$; $p < 0.001$).

Treatment with melatonin increased BV/TV in OVX rats: the 20 mg/kg group reached $17.10 \pm 3.38\%$ ($p < 0.001$ vs. OVX CG), and the 50 mg/kg group achieved $20.91 \pm 2.51\%$ ($p < 0.001$ vs. OVX CG; $p = 0.04$ vs. 20 mg/kg). Comparisons among SHAM subgroups showed no significant differences ($25.11 \pm 5.80\%$ vs. $22.79 \pm 4.41\%$; $p = 0.211$). These results indicate that melatonin attenuated bone loss induced by ovariectomy.

Table 3 presents the results of the biochemical analyses. HbA1c levels were significantly lower in the OVX 20 and OVX 50 subgroups compared to the OVX CG subgroup ($p = 0.006$). No other significant differences were found in the biochemical parameters within either the OVX or SHAM subgroups. Regarding HbA1c levels, *post*

hoc analysis showed significant reduction in groups OVX 50 and OVX 20 compared to OVX CG ($p=0.015$ and $p=0.019$, respectively). Additionally, no significant correlations were observed between HbA1c levels and any of the evaluated histomorphometric parameters.

Table 3. Serum biochemical markers across ovariectomized and SHAM-operated rats.

Parameter	OVX CG	OVX 20	OVX 50	SHAM CG	SHAM 20	SHAM 50
Alkaline phosphatase (U/L)	115.30 (± 43.27)	136.44 (± 49.28)	131.00 (± 49.57)	86.00 (± 39.76)	94.78 (± 28.13)	75.56 (± 30.64)
Creatinine (mg/dL)	0.46 (± 0.11)	0.46 (± 0.05)	0.49 (± 0.08)	0.39 (± 0.11)	0.34 (± 0.13)	0.41 (± 0.10)
Alanine amino transferase (U/L)	113.90 (± 122.60)	65.78 (± 20.60)	89.89 (± 51.87)	48.25 (± 17.66)	65.22 (± 21.06)	49.00 (± 32.26)
HbA1c (%)	0.73 (± 0.15)	0.37 *$\ddagger$ (± 0.26)	0.36*$\ddagger$ (± 0.24)	0.50 (± 0.11)	0.43 (± 0.22)	0.47 (± 0.10)
Cholesterol (mg/dL)	91.50 (± 14.56)	85.22 (± 10.41)	91.78 (± 15.21)	58.38 (± 15.45)	70.89 (± 12.19)	70.67 (± 14.78)
Triglycerides (mg/dL)	104.40 (± 39.57)	96.56 (± 19.24)	101.56 (± 50.66)	81.38 (± 30.21)	104.56 (± 32.39)	99.22 (± 22.58)
Total protein (g/dL)	8.13 (± 0.50)	7.80 (± 0.86)	8.03 (± 0.79)	7.08 (± 1.59)	7.82 (± 1.28)	7.59 (± 1.18)
CTX (ng/mL)	12.07 (± 5.04)	12.07 (± 2.29)	11.99 (± 5.25)	7.75 (± 2.45)	10.15 (± 3.03)	10.68 (± 2.49)

Abbreviations: Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD).

*One-way ANOVA, $p < 0.05$ showed ($p=0.06$).

$\ddagger$ Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$), followed by Dunn's *post hoc*

analysis showed significant differences in HbA1c levels between OVX 50 and OVX CG ($p=0.015$), and between OVX 20 vs. OVX CG ($p=0.019$).

No significant interaction was observed between weight assessment time points during melatonin treatment within groups ($p=0.591$) or between groups ($p=0.125$). Similarly, no significant correlations were found between body weight and histomorphometric parameters at any time point in either the OVX or SHAM groups (data not shown).

DISCUSSION

This study provides valuable insights into bone-protective effects of melatonin in ovariectomized (OVX) rats, with the 50 mg/kg dose showing superior efficacy in

mitigating osteoporotic bone loss. Key findings include significant improvements in bone volume fraction (BV/TV), trabecular number (Tb.N), reduced trabecular separation (Tb.Sp) and eroded surface (ES/BS) in OVX rats treated with 50 mg/kg melatonin, highlighting its targeted action in hypoestrogenic conditions. In SHAM-operated rats, ES/BS was significantly reduced at this dose, suggesting limited effects in non-estrogenic states.

Additionally, melatonin significantly lowered HbA1c levels in OVX rats, indicating potential metabolic benefits alongside bone protection. The observed reduction in HbA1c levels following melatonin supplementation in ovariectomized (OVX) rats, but not in SHAM-operated (SHAM) controls, can be attributed to the interplay between estrogen deficiency and the effect of melatonin on glucose metabolism. In OVX rats, the absence of estrogen leads to insulin resistance and impaired glucose homeostasis. Melatonin supplementation in this context has been shown to improve insulin sensitivity and reduce HbA1c levels^{19,20}. In this preclinical rat study, these results suggest that melatonin-particularly at 50 mg/kg- is a promising candidate for further evaluation in postmenopausal osteoporosis, however, randomized clinical trials are needed to determine a safe human dose through translational scaling and to establish efficacy and safety. The significant reduction in HbA1c levels in OVX rats suggests melatonin's role in glycemic regulation potentially through insulin modulation or antioxidant pathways^{10,21}.

In OVX rats, melatonin's effects align with prior studies showing enhanced osteoblastogenesis and reduced osteoclastic activity^{8,22-27}. The 50 mg/kg dose significantly improved BV/TV, Tb.N, Tb.Sp and ES/BS, indicating better preservation of trabecular connectivity and reduced bone resorption compared to controls. In SHAM operated rats, the reduction in ES/BS at 50 mg/kg suggests a specific antiresorptive effect, consistent with reports of melatonin's role in modulating bone remodeling^{8,25,28}. The lack of significant changes in CTX, despite reduced ES/BS, may reflect variability in bone marker measurements influenced by factors like age or fasting.²⁹⁻³² Limitations include the inability to assess dynamic bone formation due to unsuccessful calcein labeling, restricting the analysis to static histomorphometric parameters, and the testing of only two doses, limiting conclusions regarding dose dependency. Additionally, the study did not evaluate endogenous estrogen levels or the expression of its receptors (ER α and ER β)³³. Differences in pharmacokinetics between rats and humans require cautious interpretation of clinical relevance³⁴.

Strengths include using adult OVX rats to mimic postmenopausal bone loss, oral melatonin administration with dose adjustments every 15 days, and comprehensive histomorphometric and biochemical analyses. These enhance the translational relevance and robustness of the findings.

FINAL CONSIDERATIONS

In conclusion, melatonin at 50 mg/kg significantly preserves bone microarchitecture and reduces resorption in OVX rats, helping to counteract hypoestrogenism-induced bone loss, consistent with the study objectives. Its limited effect in SHAM rats confirms specificity to estrogen-deficient states, supporting its potential use in postmenopausal conditions and osteoporosis associated with menopause.

ACKNOWLEDGMENTS

The first author would like to thank the entire laboratory team and especially her supervisors, Dr. Vicente F. Castaldo Andrade and Dra. Carolina Aguiar Moreira.

FUNDING

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

1. Amaral FG, Cipolla-Neto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab.* 2018;62:472–9. doi: 10.20945/2359-3997000000066
2. Xie Z, et al. A review of sleep disorders and melatonin. *Neurol Res.* 2017; 39:559–65. doi: 10.1080/01616412.2017.1315864.
3. Cipolla-Neto J, Do Amaral FG. Melatonin as a hormone: new physiological and clinical insights. *Endocr Rev.* 2018;39:990–1028. doi: 10.1210/er.2018- 00084.
4. Goldman BD. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms.* 2001;16:283–301. doi: 10.1177/074873001129001980.

5. Ahmad SB, et al. Melatonin and health: insights of melatonin action, biological functions, and associated disorders. *Cell Mol Neurobiol.* 2023;43:2437–58. doi:10.1007/s10571-023-01324-w.
6. Hendrickx G, Boudin E, Van Hul W. A look behind the scenes: the risk and pathogenesis of primary osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11:462–74. doi: 10.1038/nrrheum.2015.48.
7. Li T, et al. Melatonin: another avenue for treating osteoporosis? *J Pineal Res.* 2019;66:e12548. doi:10.1111/jpi.12548.
8. Guan H, et al. Melatonin increases bone mass in normal, perimenopausal, and postmenopausal osteoporotic rats via the promotion of osteogenesis. *J Transl Med.* 2022;20:132. doi:10.1186/s12967-022-03341-7.
9. Kim HJ, Kim HJ, Bae MK, Kim YD. Suppression of osteoclastogenesis by melatonin: a melatonin receptor-independent action *Int J Mol Sci.* 2017;18:1142. doi:10.3390/ijms18061142.
10. Zhou L, et al. Melatonin at pharmacological concentrations suppresses osteoclastogenesis via the attenuation of intracellular ROS *Osteoporos Int.* 2017;28:3325–37. doi: 10.1007/s00198-017-4129-y.
11. Ikegame M, et al. Melatonin is a potential drug for the prevention of bone loss during space flight. *J Pineal Res.* 2019;67:e12594. doi:10.1111/jpi.12594.
12. Ladizesky MG, et al. Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. *Life Sci.* 2001;70:557–65. doi: 10.1016/S0024- 3205(01)01431-X.
13. Munmun F, Witt-Enderby PA. Melatonin effects on bone: implications for use as a therapy for managing bone loss. *J Pineal Res.* 2021;71:e12749. doi:10.1111/jpi.12749.
14. Chavassieux P, Chapurlat R. Interest of bone histomorphometry in bone pathophysiology investigation: foundation, present, and future. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:907914. doi:10.3389/fendo.2022.907914.
15. Eriksen EF, et al. Modeling-based bone formation after 2 months of Romosozumab treatment: results from the FRAME clinical trial. *J Bone Miner Res.* 2022;37:36–40. doi: 10.1002/jbmr.4457.
16. Tresguerres IF, et al. Melatonin dietary supplement as an anti-aging therapy for age-related bone loss. *Rejuvenation Res.* 2014;17:341–6. doi: 10.1089/rej.2013.1542.

17. Sharan K, Lewis K, Furukawa T, Yadav VK. Regulation of bone mass through pineal-derived melatonin-MT2 receptor pathway. *J Pineal Res.* 2017;63:e12423. doi:10.1111/jpi.12423.
18. Dempster DW, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 2013; 28:2–17. doi:10.1002/jbmr.1805.
19. Baxi DB, Singh PK, Vachhrajani KD, Ramachandran AV. Melatonin supplementation in rat ameliorates ovariectomy-induced oxidative stress. *Climacteric.* 2013;16:274–83. doi: 10.3109/13697137.2012.682108.
20. Monteiro P, et al. A glândula pineal e o metabolismo de carboidratos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2000;44(4):349–59. doi:10.1590/S0004-27302000000400009.
21. Garaulet M, et al. Melatonin effects on glucose metabolism: time to unlock the controversy. *Trends Endocrinol Metab.* 2020;31:192–204. doi:10.1016/j.tem.2019.11.011.
22. Li T, et al. Daytime administration of melatonin has better protective effects on bone loss in ovariectomized rats. *J Orthop Surg Res.* 2023;18:234. doi:10.1186/s13018-023-03695-8.
23. Huang X, et al. Melatonin suppresses bone marrow adiposity in ovariectomized rats by rescuing the imbalance between osteogenesis and adipogenesis through SIRT1 activation. *J Orthop Translat.* 2023;38:84–97. doi: 10.1016/j.jot.2022.10.002
24. Zhou MS, et al. Systemic administration with melatonin in the daytime has a better effect on promoting osseointegration of titanium rods in ovariectomized rats. *Bone Joint Res.* 2022;11:751–62. doi: 10.1302/2046-3758.1111.BJR- 2022-0017.R2.
25. Chu ZM, et al. Melatonin promotes osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in aged rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017; 21:4446–56.
26. Zheng S, et al. Melatonin accelerates osteoporotic bone defect repair by promoting osteogenesis–angiogenesis coupling. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:826660. doi:10.3389/fendo.2022.82666.

27. Pejon TMM, et al. Melatonin administration on bone properties of animals under hypoestrogenism: a systematic review. *Rev Endocr Metab Disord*. 2025; 26: 279-291. doi:10.1007/s11154-025-09953-w.
28. Chen W, et al. Melatonin improves the resistance of oxidative stress-induced cellular senescence in osteoporotic bone marrow mesenchymal stem cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2022. Jan 18;2022: 7420726. doi: 10.1155/2022/7420726.
29. Schini M, Vilaca T, Gossiel F, Salam S, Eastell R. Bone turnover markers: basic biology to clinical applications. *Endocr Rev*. 2023;44:417–73. doi:10.1210/endrev/bnac031.
30. Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover – uses and limitations. *Ann Clin Biochem*. 2014;51:189–202. doi:10.1177/0004563213515190.
31. Brown JP, Don-Wauchope A, Douville P, Albert C, Vasikaran SD. Current use of bone turnover markers in the management of osteoporosis. *Clin Biochem*. 2022;109–110:1–10. doi:10.1016/j.clinbiochem.2022.09.002.
32. Guo X, Yu X, Yao Q, Qin J. Early effects of ovariectomy on bone microstructure, bone turnover markers and mechanical properties in rats. *BMC Musculoskelet Disord*. 2022; 23. doi: 10.1186/s12891-022-05265-1.
33. Chen P, Li B, Ou-Yang L. Role of estrogen receptors in health and disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:839005. doi:10.3389/fendo.2022.839005.
34. Cardinali DP. Melatonin as a chronobiotic/cytoprotective agent in bone. Doses involved. *J Pineal Res*. 2024;76:e12931. doi:10.1111/jpi.12931.

4.1.2 Segundo artigo

O artigo “Melatonin modulates β -catenin and newly identifies MMP-2 as a putative target in bone tissue of ovariectomized rats” foi submetido à Revista Calcified Tissue International (Apêndice G).

Melatonin modulates β -catenin and newly identifies MMP-2 as a putative target in bone tissue of ovariectomized rats

Fátima C. Sandmann-Afonso ^{1,2,3} Vicente F.C. Andrade ^{1,2,3} and Carolina Aguiar Moreira ^{1,2,3}

¹ Graduate Program in Internal Medicine and Health Sciences at the Federal University of Paraná (UFPR)

² Renal and Bone Pathology Laboratory, Instituto Pró-Renal, Curitiba, Brazil

³ SEMPR- Division of Endocrinology and Metabolism, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná (UFPR)

Corresponding Author

Fatima Corrêa Sandmann Afonso fatimasandmann@ufpr.br;
fatimasandmann@yahoo.com.br

Renal and Bone Pathology Laboratory, Instituto Pró-Renal, Curitiba, Brazil ·
RUA VICENTE MACHADO, 2190, CEP: 80440-020, CURITIBA-PR, BRASIL

Introduction

Bone remodeling is regulated by a dynamic balance between formation and resorption, influenced by inflammatory pathways and proteolytic enzymes. TNF- α is a pro-inflammatory cytokine that stimulates osteoclast formation and activity, promoting bone resorption, whereas NF- κ B is a transcription factor activated by TNF- α and other cytokines that enhances osteoclastogenesis and inhibits osteoblastic differentiation. These mediators can inhibit the osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and promote osteoclastogenesis through multiple mechanisms, including an increase in osteoclast precursor cells and synergistic interactions with cellular cytokines. By contrast, β -catenin signaling favors osteoblastic differentiation and activity [1]. Melatonin, known for its antioxidant and anti-inflammatory properties, has been shown to modulate NF- κ B activation in various tissues. In bone, it inhibits TNF- α /NF- κ B expression, reduces pro-osteoclastogenic cytokines and inflammatory mediators, thereby limiting bone resorption, while simultaneously promoting bone formation via activation of the Wnt/ β -catenin pathway [2]. This dual action positions melatonin as a potential regulator of bone homeostasis under conditions of estrogen deficiency or inflammatory stress [3]. Matrix metalloproteinase (MMP) activity can affect the bone's ability to resist fracture. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is expressed by osteoblasts; it influences trabecular architecture, and its reduction decreases connectivity among trabeculae. MMP-2 plays a complex role in bone integrity, and increased expression impacts bone quality [4]. Using immunohistochemistry in tibial bone from ovariectomized rats, this study aimed to confirm melatonin's known modulation of β -catenin and NF- κ B and to test whether

it upregulates MMP-2, a potentially novel target implicated in extracellular-matrix remodeling.

Materials and Methods

This study is derived from a broader investigation into the bone-protective effects of melatonin in ovariectomized rats. Female Wistar rats (20 weeks old) underwent ovariectomy (OVX= 30) or sham surgery (SHAM, n= 30) at Positivo University Vivarium. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Use of Positivo University (CEUA-UO, protocol no. 550) and adhered to the guidelines of Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). Twelve weeks post-surgery, OVX rats were randomly assigned to three groups: melatonin 20 mg/kg/day (OVX 20, n=9), melatonin 50 mg/kg/day (OVX 50, n=9), or placebo (OVX CG, n=10). Melatonin or placebo (1.5mL fluorinated water) was administered daily by gavage between 18:00 and 19:00 for 8 weeks. Doses were calculated based on body weight measured at surgery, intervention start, and every 15 days. After the 8-week intervention, animals were euthanized by an approved method, and right tibiae were dissected and fixed in 70% ethanol for immunohistochemical analysis. The study was conducted in collaboration with the PRO Laboratory (Renal and Bone Pathology, Instituto Pró-Renal), the Academic Center of Instituto Pró-Renal, and Positivo University.

Immunohistochemical Analysis (IHC)

Immunohistochemistry was performed on tibial sections from OVX CG (n = 9) and OVX 50 (n = 9) groups to assess the expression of β -catenin (osteogenic signaling), NF- κ B (inflammatory processes and osteoclastogenesis), and MMP-2 (extracellular matrix remodeling). Tissues were fixed in 70% ethanol for 7 days, dehydrated in increasing ethanol concentrations, cleared in xylene, and embedded in methacrylate. Sections (6 μ m) were mounted on gelatin-coated slides, demethacrylated in xylene/chloroform, rehydrated, decalcified with 10% acetic acid, and treated with hydrogen peroxide in methanol to block endogenous peroxidase. Non-specific binding and free aldehydes were blocked with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1 M glycine. Slides were incubated for 2 h at room temperature with primary antibodies: anti- β -catenin (Dako, 1:200), anti-MMP-2 (Abcam, 1:1000), and anti-NF- κ B p50 (Abcam, 1:300). Biotinylated secondary antibodies (Vector, 1:200) and streptavidin–horseradish peroxidase (HRP) were applied, followed by visualization with 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted with Entellan® (Merck). DAB-positive areas were quantified in three fields per section using ImageJ (NIH) with color deconvolution to separate DAB from hematoxylin staining. Negative controls (omitting primary antibodies) were included to ensure specificity. Statistical analysis was performed using an unpaired, two-tailed Student's t-test in GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) after confirming data normality. Data are reported as mean $\pm$ SD, with $p < 0.05$ considered statistically significant.

Results

The postmenopausal-like osteoporosis model in rats was successfully established, with progressive loss of bone mass over time after ovariectomy. The same animals had bone volume quantified by bone histomorphometry in a previous study from our group, which documented reduced bone mass, decreased trabecular thickness and number, and increased trabecular separation in comparisons between the **OVX control (OVX CG)** and **OVX + melatonin 50 mg/kg (OVX 50)** groups (*data not shown*). In ovariectomized rats treated with melatonin (50 mg/kg), β -catenin immunoreactivity was markedly higher than in OVX controls (mean 405.3 vs. 213; difference between means 192.3 ± 29.04 ; $p < 0.0001$). Similarly, MMP-2 was significantly increased in the treated group (mean 677.7 vs. 449.3; difference between means 228.3 ± 43.28 ; $p = 0.0004$). By contrast, NF- κ B showed no significant difference between groups (mean 8.33 vs. 7.33; difference between means 1.00 ± 1.56 ; $p = 0.535$) (**Fig 1**).

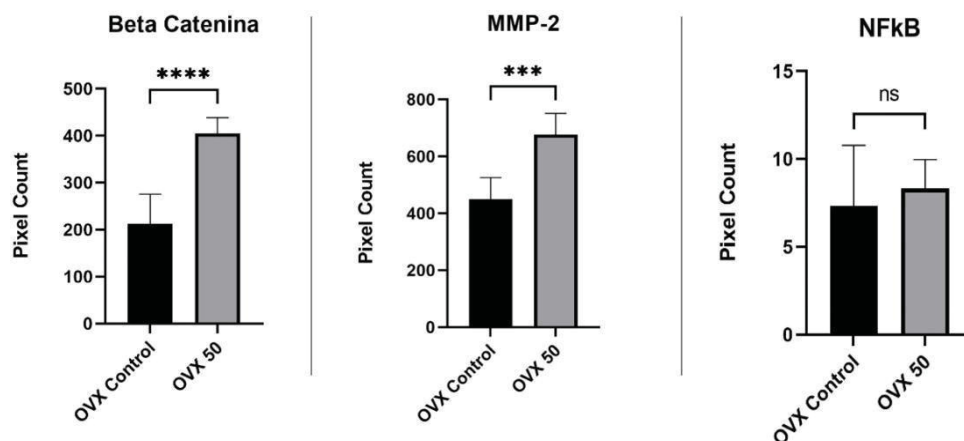


Fig 1 Immunohistochemical expression of β -catenin, MMP-2, and NF- κ B in the OVX control and OVX 50 mg/kg melatonin-treated groups. Quantification is represented as pixel intensity. The group treated with melatonin (OVX 50) showed significantly increased expression of β -catenin and MMP-2, and NF- κ B, showed no significant difference between groups. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Discussion

The most novel and impactful finding of this study is the significant upregulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in tibial trabecular bone following melatonin treatment (50 mg/kg/day) in ovariectomized (OVX) rats, suggesting a previously unreported mechanism by which melatonin modulates extracellular matrix (ECM) remodeling to potentially attenuate bone resorption and preserve trabecular microarchitecture. To our knowledge, this is the first documentation of melatonin directly influencing MMP-2 protein levels in bone tissue, extending its known

osteoprotective roles beyond anti-inflammatory and pro-osteogenic signaling. A related study in a calvarial-defect model with melatonin and recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) reported only modest effects on MMP transcripts, highlighting the influence of dose, timing, and tissue context on these outcomes [12].

Complementing this discovery, melatonin also enhanced β -catenin expression, confirming its activation of the Wnt/ β -catenin pathway to promote osteoblastic differentiation and bone formation, consistent with recent reviews on melatonin's osteogenic modulation [5, 6]. In contrast, no significant changes were observed in NF- κ B expression, which may reflect methodological factors such as the sensitivity of immunohistochemistry (IHC) or the experimental timing, rather than pathway irrelevance; melatonin's inhibition of NF- κ B is well-established in other tissues [13].

These results support a matrix-centric model of bone homeostasis, where MMP-2, often viewed as degradative, plays physiological roles in osteogenesis and regeneration by maintaining ECM composition and mechanics [9, 10]. For example, mechanical loading paradigms, such as exercise, increase MMP-2 activity and improve biomechanical performance in trabecular bone [11]. Similarly, melatonin may "tune" ECM turnover within the osteocyte lacunar–canalicular network (LCN), preventing disruptions that impair fracture resistance and connectivity [7, 8]. Thus, in estrogen-deficient conditions, melatonin's beneficial effects could involve balanced MMP-2 activity to sustain normal remodeling without excessive proteolysis, integrating signaling shifts toward formation with matrix preservation.

Limitations of this study include the reliance on IHC for quantification, which may not capture dynamic changes in NF- κ B activation, and the absence of direct measurements of bone microarchitecture or biomechanical strength to confirm the proposed mechanism. Additionally, only the higher melatonin dose (50 mg/kg) was analyzed via IHC, limiting dose-response insights. Future research should explore these aspects, including longitudinal studies of LCN dynamics and clinical trials evaluating melatonin supplementation in postmenopausal osteoporosis to translate these findings into therapeutic strategies.

CONCLUSION

The novel contribution of this report is the demonstration that melatonin increases MMP-2 signaling in bone. Contemporary literature underscores that matrix remodeling and the osteocyte lacunar–canalicular network (LCN) are central to bone quality and connectivity, and that disturbances in LCN/ECM dynamics compromise trabecular architecture and strength. Although several reviews have discussed LCN remodeling and its link to bone quality, the regulation of MMP-2 by melatonin in bone has not, to our knowledge, been documented in an osteoporosis model in the tibia of ovariectomized rats. This gap justifies reporting these original findings in the format of a Short Communication. Moreover, accumulating evidence points to MMP-2 as a potential therapeutic target in bone biology, given its role in physiological ECM turnover

and regeneration. In this light, the observed melatonin-induced increase in MMP-2 not only provides mechanistic insight but also highlights a possible avenue for therapeutic intervention aimed at preserving bone quality in estrogen deficiency.

Acknowledgment

The first author of the work would like to thank the entire laboratory team and specially her supervisors,

Dr. Vicente F. Castaldo Andrade and Carolina Aguiar Moreira

References

- [1] T. Li, X. Jiang, Y. Sun, Y. Liu, J. Chen, and S. Li, "Melatonin: Another avenue for treating osteoporosis? ", *Journal of Pineal Research*, vol. 66, no. 4, p. e12548, Mar. 2019, doi: 10.1111/jpi.12548.
- [2] Y. Li, X. Li, C. Guo, H. Zhou, J. Lu, and J. Wu, "Melatonin promotes the restoration of bone defects via enhancement of miR-335-5p combined with inhibition of TNF α /NF- κ B signaling," *FASEB Journal*, vol. 37, no. S1, pp. S1–S12, 2023, doi: 10.1096/fj.202200572RRR.
- [3] H. Guan, Z. Li, W. Zhu, S. Wang, C. Dong, and L. Yin, "Melatonin increases bone mass in normal, perimenopausal, and postmenopausal osteoporotic rats via the promotion of osteogenesis," *Journal of Translational Medicine*, vol. 20, no. 1, p. 132, Dec. 2022, doi: 10.1186/s12967-022-03341-7.
- [4] J. S. Nyman, J. E. Lynch, J. M. Perrien, J. C. Thiolloy, S. B. O'Quinn, and J. M. Patil, "Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 26, no. 6, pp. 1252–1260, Jun. 2011, doi: 10.1002/jbmr.326.
- [5] Q. Sun, J. Chen, M. Xu, Z. Zhu, and L. Zhao, "Melatonin regulates osteoblast differentiation through the m6A reader hnRNPA2B1 under simulated microgravity," *Current Issues in Molecular Biology*, vol. 46, no. 9, pp. 9624–9638, Sep. 2024, doi: 10.3390/cimb46090572.
- [6] K.-H. Lu, Y.-H. Hsieh, R.-C. Lin, M.-Y. Tsai, and S.-F. Yang, "Melatonin: A potential therapy for osteoporosis with insights into molecular mechanisms," *Journal of Pineal Research*, vol. 77, no. 4, p. e70062, Jun. 2025, doi: 10.1111/jpi.70062.

- [7] G. Vahidi, C. Rux, V. D. Sherk, and C. M. Heveran, "Lacunar-canalicular bone remodeling: Impacts on bone quality and tools for assessment," *Bone*, vol. 143, p. 115663, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.bone.2020.115663.
- [8] C. A. Schurman, A. D. O'Brien, J. B. Farr, and S. M. Wallace, "Aging impairs the osteocytic regulation of collagen integrity and bone quality," *Bone Research*, vol. 12, no. 1, p. 13, Feb. 2024, doi: 10.1038/s41413-023-00303-7.
- [9] C. Khoswanto, "Role of matrix metalloproteinases in bone regeneration: Narrative review," *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, vol. 13, no. 5, pp. 539–543, Sep.–Oct. 2023, doi: 10.1016/j.jobcr.2023.06.002.
- [10] M. Wołosowicz, S. Prokopiuk, and T. W. Kamiński, "The complex role of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in health and disease," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 25, no. 24, p. 13691, Dec. 2024, doi: 10.3390/ijms252413691.
- [11] G. E. Shiguemoto, J. Prestes, R. D. Leite, J. P. Pereira, L. R. Duarte, and E. S. Perez, "Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats," *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, vol. 22, no. 5, pp. 607–617, Oct. 2012, doi: 10.1111/j.1600-0838.2010.01284.x.
- [12] M. R. Paulini, V. T. do Nascimento, L. O. Gonçalves, F. S. Casado, A. P. S. Castro, and R. A. D. Silva, "Gene expression analysis of cytokines and MMPs in melatonin and rhBMP-2 enhanced bone remodeling," *World Journal of Orthopedics*, vol. 15, no. 11, pp. 1075–1087, Nov. 2024, doi: 10.5312/wjo.v15.i11.1075.
- [13] Q. Guo, Y. Chen, J. Wu, H. Zhou, and Y. Li, "NF-κB in biology and targeted therapy: New insights and translational implications," *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 9, no. 1, p. 47, Feb. 2024, doi: 10.1038/s41392-024-01757-9.

4.1.3 Terceiro artigo

A metodologia do terceiro artigo baseia-se na análise de fragmentos ósseos encaminhados à Áustria, para o Ludwig Boltzmann Institute for Osteology (LBIO), em Viena, laboratório de referência internacional na área de pesquisa óssea, coordenado pelos pesquisadores Dr. Stéphane Blouin e Dra. Barbara Misof, responsáveis por essa etapa do projeto. Essa colaboração internacional tem como objetivo aprofundar a caracterização do tecido ósseo por meio de técnicas avançadas, incluindo quantitative backscattered electron imaging (qBEI) e espectroscopia Raman, permitindo uma avaliação detalhada da composição mineral e da microarquitetura óssea. Os resultados preliminares encontram-se em fase de processamento e análise, e os dados completos serão apresentados em um próximo artigo, com previsão de submissão em 2026

.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstraram de maneira consistente que a melatonina exerceu efeito protetor sobre o tecido ósseo, particularmente nas ratas ovariectomizadas (OVX), modelo experimental de deficiência estrogênica. A análise histomorfométrica revelou melhora significativa em parâmetros estruturais e de remodelação óssea, como o volume ósseo (BV/TV) e a espessura trabecular (Tb.Th), bem como redução da superfície de erosão (ES/BS) e da atividade osteoclástica, indicando atenuação da reabsorção óssea. Esses achados sugerem que a melatonina atua de maneira a preservar a microarquitetura trabecular e manter o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, com um efeito mais pronunciado com a dose de 50 mg/kg.

Nos grupos SHAM, que representam o ambiente fisiológico com função ovariana preservada, a melatonina não promoveu alterações deletérias na estrutura óssea, o que reforça sua segurança metabólica e o potencial de aplicação em diferentes contextos fisiológicos, como perimenopausa e envelhecimento.

O conjunto dos achados laboratoriais – incluindo a tendência à redução dos marcadores de reabsorção óssea – , embora sem diferença estatisticamente significativa no CTX, reforça a hipótese de que a melatonina atua como moduladora do remodelamento ósseo. Seus efeitos parecem estar relacionados à regulação circadiana, à modulação das vias Wnt/ β -catenina e NF- κ B, além de sua ação antioxidante mitocondrial, contribuindo para a preservação da matriz mineral e para a proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo hipoestrogenismo.

A colaboração com o Ludwig Boltzmann Institute for Osteology (LBIO), em Viena, sob coordenação dos pesquisadores Dr. Stéphane Blouin e Dra. Barbara Misof, vai nos permitir a análise complementar dos fragmentos ósseos por *quantitative backscattered electron imaging* (qBEI) e espectroscopia de Raman, técnicas avançadas que avaliam a mineralização e a qualidade do osso em nível ultraestrutural. Os resultados preliminares dessas análises reforçam a evidência de que a melatonina influencia, não apenas a quantidade de osso, mas também sua qualidade mineral, o que poderá contribuir para futuras abordagens terapêuticas voltadas à osteopenia e à osteoporose.

Dessa forma, esse conjunto de experimentos representa o primeiro estudo pré-clínico do Laboratório de Histomorfometria Óssea do Instituto Pró-Renal, e seus

resultados consolidam uma linha de pesquisa nova com potencial translacional para o uso da melatonina como agente adjuvante na prevenção da perda óssea em condições de deficiência estrogênica e envelhecimento. Os resultados complementares provenientes da Áustria serão incluídos em um terceiro artigo, com previsão de submissão em 2026, ampliando as contribuições científicas deste trabalho e fortalecendo o intercâmbio internacional em pesquisa óssea.

6 OPINIÃO E APRENDIZADO DO PESQUISADOR

A realização deste estudo representou um marco importante para o nosso laboratório, sendo o primeiro trabalho conduzido integralmente com modelo animal e envolvendo toda a equipe do Laboratório de Histomorfometria Óssea do Instituto Pró-Renal. Trabalhar com ratas OVX e SHAM trouxe inúmeros aprendizados e desafios diários, desde o manejo dos animais e a precisão na administração das doses por gavagem até o preparo e o processamento cuidadoso das amostras ósseas para análise histomorfométrica. Foi uma experiência que exigiu não apenas rigor técnico e científico, mas também resiliência, sensibilidade e ética, lembrando-nos constantemente de que a pesquisa básica carrega uma dimensão que ultrapassa os números e os gráficos.

Durante o percurso, enfrentamos dificuldades específicas, como o comprometimento da marcação com calceína, que limitou a avaliação dinâmica da formação óssea. No entanto, cada obstáculo se transformou em aprendizado, contribuindo para o aperfeiçoamento dos experimentos seguintes e para o amadurecimento científico da equipe.

Esses cinco anos de pesquisa foram marcados por uma imersão profunda na pesquisa básica, no ambiente do biotério e em todas as etapas que tornam o conhecimento possível – da rotina laboratorial à escrita científica. Foi um período de crescimento técnico e humano, de cooperação entre colegas e de aprendizado contínuo com cada erro e acerto. O envolvimento de todos os integrantes do laboratório foi essencial: cada contribuição, cada tarefa, por menor que parecesse, foi determinante para que o projeto se concretizasse.

Participar de congressos internacionais, como o ISBM e o ASBMR, e poder apresentar parte deste trabalho fora do Brasil foi inspirador e transformador.

Conversar com pesquisadores experientes e renomados da área reforçou a compreensão de que a ciência é construída em colaboração e humildade, e que o conhecimento só avança quando é compartilhado.

Ao olhar para o caminho percorrido, percebo que este projeto não apenas ampliou o entendimento sobre o papel da melatonina na remodelação óssea, mas também me ensinou que a pesquisa é um exercício de persistência – e fé na ciência, nas pessoas e em nós mesmos. Erros acontecem, como no preparo da calceína; resultados nem sempre são os esperados, mas cada etapa é essencial para o avanço coletivo do conhecimento.

Mais do que resultados ou publicações, este trabalho representou um reencontro pessoal e profissional, uma prova de que nunca é tarde para recomeçar, aprender e crescer.

Complemento, também, lembrando que foram muitas tardes gratificantes, observando lâminas, conversando, discutindo resultados e compartilhando descobertas que tornaram este percurso mais leve, afetuoso e cheio de significado. Cada etapa, cada dado analisado e cada aprendizado contribuíram não apenas para a construção deste trabalho, mas também para o meu amadurecimento humano, o fortalecimento dos laços com aqueles que caminharam ao meu lado.

O retorno à vida acadêmica, após anos de prática clínica, foi uma das experiências mais desafiadoras e gratificantes da minha trajetória. A ciência, assim como o próprio ritmo biológico que a melatonina simboliza, ensina sobre tempo, ciclos e renovação – e sobre a importância de não desistir, mesmo quando o caminho é longo.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo concluiu, por meio da técnica de histomorfometria óssea, que a melatonina preservou os parâmetros estruturais da microarquitetura e reduziu a reabsorção óssea em ratas OVX, enquanto exerceu mínimo efeito em ratas SHAM.

Em relação aos objetivos específicos:

- Observou-se redução da reabsorção óssea (ES/BS) no grupo OVX, com efeito mais pronunciado na dose de 50 mg/kg. Além disso, as doses de 20 e 50 mg/kg preservaram a microarquitetura óssea nesse grupo.
- As doses de 20 e 50 mg/kg não demonstraram alterações significativas na microarquitetura óssea nas ratas SHAM, em comparação ao controle, com exceção de redução no parâmetro de superfície de erosão, indicando ausência de impacto relevante em animais com função ovariana preservada.
- Não houve correlação entre o peso dos animais e os achados histomorfométricos, tanto nas ratas OVX quanto SHAM.
- A HbA1c foi o único parâmetro laboratorial com diferença entre os grupos, apresentando valores menores nos grupos OVX 20 e OVX 50 mg/kg em comparação ao controle; entretanto, não houve correlação entre os parâmetros histomorfométricos e os exames laboratoriais, e o CTX não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, embora tenha sido observada tendência a valores percentuais menores no grupo SHAM em relação ao OVX.
- A melatonina modulou as principais vias moleculares envolvidas na remodelação óssea, com aumento na expressão de β -catenina e MMP-2 e manutenção da inibição de NF- κ B.”

REFERÊNCIAS

ACUÑA-CASTROVIEJO, D. *et al.* Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 4, p. 365-382, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00970.x>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Anvisa autoriza a melatonina na forma de suplemento alimentar**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/anvisa-autoriza-a-melatonina-na-forma-de-suplemento-alimentar>. Acesso em: 7 jul. 2024.

AMARAL, F. G.; CIPOLLA-NETO, J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 4, p. 472-479, 2018. DOI: <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000066>

AMSTRUP, A. K.; SIKJAER, T.; HEICKENDORFF, L.; MOSEKILDE, L.; REJNMARK, L. Melatonin improves bone mineral density at the femoral neck in postmenopausal women with osteopenia: a randomized controlled trial. **Journal of Pineal Research**, v. 59, p. 221-229, 2015a. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12252>

AMSTRUP, A. K.; SIKJAER, T.; MOSEKILDE, L.; REJNMARK, L. The effect of melatonin treatment on postural stability, muscle strength, and quality of life and sleep in postmenopausal women: a randomized controlled trial. **Nutrition Journal**, v. 14, p. 102, 2015b. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0093-1>

AMSTRUP, A. K.; SIKJAER, T.; PEDERSEN, S. B.; HEICKENDORFF, L.; MOSEKILDE, L.; REJNMARK, L. 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 (Oxford)**, v. 84, n. 3, p. 342-347, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/cen.12942>

BAGHERIFARD, A. *et al.* Melatonin and bone-related diseases: an updated mechanistic overview of current evidence and prospects. **Osteoporosis International**, v. 34, n. 10, p. 1677-1701, out. 2023. DOI: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00198-023-06836-1>

BRZEZNIAKIEWICZ-JANUS, K.; JARCZAK, J.; KONOPKO, A.; RATAJCZAK, J.; KUCIA, M.; RATAJCZAK, M. Z. Mitochondria express functional signaling ligand-binding receptors that regulate their biological responses – the novel role of mitochondria as stress-response sentinels. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 21, n. 3, p. 597-604, abr. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12015-025-10847-2> .

BROOKS, H. L.; FOLLOW, D. P.; HOYER, P. B. The VCD mouse model of menopause and perimenopause for the study of sex differences in cardiovascular disease and the metabolic syndrome. **Physiology (Bethesda)**, v. 31, n. 4, p. 250-257, jul. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1152/physiol.00057.2014>

CALAMINI, B.; FERRY, G.; BOUTIN, J. A. Melatonin binding to human NQO2 by isothermal titration calorimetry. **Methods in Molecular Biology**, v. 2550, p. 305-314, 2022. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2593-4_32 .

CARDINALI, D. P. Chapter four – Melatonin and healthy aging. **Vitamins and Hormones**, v. 115, p. 67-88, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2020.12.004>

CARDINALI, D. P. *et al.* Melatonin as a chronobiotic and cytoprotective agent in bone. **Journal of Pineal Research**, v. 77, n. 1, e12931, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12931>.

CECON, E.; BOUTIN, J. A.; JOCKERS, R. Molecular characterization and pharmacology of melatonin receptors in animals. **Receptors**, v. 2, n. 2, p. 127-147, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/receptors2020008>.

CHALLET, E. Melatonin in energy control: circadian time-giver and homeostatic monitor of cellular metabolism. **Journal of Pineal Research**, v. 76, e12961, 2024. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12961>. Acesso em: 17 out. 2025

CHAVASSIEUX, P.; CHAPURLAT, R. Interest of bone histomorphometry in bone pathophysiology investigation: foundation, present, and future. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 907914, 28 jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.907914>

CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G. Melatonin as a hormone: new physiological and clinical insights. **Endocrine Reviews**, v. 39, n. 6, p. 990-1028, 2018.

CLAUSTRAT, B.; LESTON, J. Melatonin: physiological effects in humans. **Neurochirurgie**, v. 61, n. 2-3, p. 77-84, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2015.03.002>

DEMPSTER, D. W. *et al.* Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 1, p. 2-17, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbmr.1805>

FENG, X.; McDONALD, J. M. Disorders of bone remodeling. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, p. 121-145, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130203>.

FERLAZZO, N. *et al.* Is melatonin the cornucopia of the 21st century? **Antioxidants (Basel)**, v. 9, n. 11, p. 1088, nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9111088>

FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. **The Journals of Gerontology: Series A**, v. 69, supl. 1, p. S4–S9, jun. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>

FRANCISCO, J. I.; YU, Y.; OLIVER, R. A.; WALSH, W. R. 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, fev. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/jor.21217>

FU, Q. *et al.* Reduced osteoprotegerin expression by osteocytes may contribute to rebound resorption after denosumab discontinuation. **JCI Insight**, v. 8, n. 18, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.167790>

GOBBI, G.; COMAI, S. Sleep well: untangling the role of melatonin MT1 and MT2 receptors in sleep. **Journal of Pineal Research**, v. 66, n. 3, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12544> .

GUAN, J. *et al.* Melatonin promotes bone formation and suppresses bone resorption through the regulation of circadian clock and Wnt/ β -catenin pathways in aging and osteoporosis. **Aging and Disease**, v. 13, n. 2, p. 506–520, 2022. DOI: <https://doi.org/10.14336/AD.2021.0723>.

HE, C. *et al.* Melatonin and its receptor MT1 are involved in the downstream reaction to luteinizing hormone and participate in the regulation of luteinization in different species. **Journal of Pineal Research**, v. 61, n. 3, p. 279-290, out. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12345>

IAMARINO, A. **Tudo sobre melatonina – Podcast Não Ficção**. [podcast]. YouTube, 2024. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=Rse1bGfGajg>. Acesso em: 2 maio 2025.

JEE, W. S. S.; YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 1, n. 3, p. 193-207, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15758493/> Acesso em: 17 out. 2025

KARASEK, M. *et al.* Future of melatonin as a therapeutic agent. **Neuro Endocrinology Letters**, v. 23, supl. 1, p. 118-121, abr. 2002. Disponível em: <https://www.nel.edu/userfiles/articlesnew/NEL230702X01.pdf> Acesso em: 17 out. 2025

KIMMEL, D. B. Animal models for in vivo experimentation in osteoporosis research. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. (ed.). **Osteoporosis**. 2. ed. San Diego, CA: Academic Press, 2001. p. 29-47. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-012470862-4/50038-6>

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, n. 4, p. 414-426, May.2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00956.x>

KULAK, C. A.; DEMPSTER, D. W. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 2, p. 87-98, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302010000200002>

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, mar. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2003.00021.x>

LI, T. *et al.* Melatonin: another avenue for treating osteoporosis? **Journal of Pineal Research**, v. 66, e12548, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12548>

LIU, X. L.; LI, C. L.; LU, W. W.; CAI, W. X.; ZHENG, L. W. 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, abr. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/clr.12360>

LIU, J.; CLOUGH, S. J.; HUTCHINSON, A. J.; ADAMAH-BIASSI, E. B.; POPOVSKA-GOREVSKI, M.; DUBOCOVICH, M. L. MT1 and MT2 melatonin receptors: a therapeutic perspective. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 56, p. 361-383, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124742>

LOWES, D. A.; WEBSTER, N. R.; MURPHY, M. P.; GALLEY, H. F. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. **British Journal of Anaesthesia**, v. 110, n. 3, p. 472-480, mar. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/bja/aes577>

LU, X. *et al.* Insight into the roles of melatonin in bone tissue and bone-related diseases (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 47, n. 5, p. 82, May 2021. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4915>

MA, L. *et al.* Oxidative stress and bone remodeling: an updated review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease**, v. 1871, n. 1, 166632, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2025.166632>.

MAJIDINIA, M. *et al.* The multiple functions of melatonin in regenerative medicine. **Ageing Research Reviews**, v. 45, p. 33-52, ago. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.04.003>.

MALAKOTI, F.; ZARE, F.; ZAREZADEH, R.; SADIGH, A. R.; SADEGHPOUR, A.; MAJIDINIA, M.; YOUSEFI, B.; ALEMI, F. The role of melatonin in bone regeneration: a review of involved signaling pathways. **Biochimie**, v. 202, p. 56-70, nov. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.08.008>

MALAKOTI, R. *et al.* The role of melatonin in bone regeneration. **General and Comparative Endocrinology**, v. 325, p. 113166, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2022.113166>.

MARIA, S. *et al.* Melatonin-micronutrients osteopenia treatment study (MOTS): a translational study assessing melatonin, strontium (citrate), vitamin D3 and vitamin K2 (MK7) on bone density, bone marker turnover and health-related quality of life in postmenopausal osteopenic women following a one-year double-blind RCT and on osteoblast-osteoclast co-cultures. **Ageing (Albany NY)**, v. 9, n. 1, p. 256-285, Jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.101158>

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, e12749, ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12749>

NOVACK, D. V.; FENG, X. Current perspectives on the multiple roles of osteoclasts. **FASEB Journal**, v. 37, n. 2, e22763, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.202201441R>.

OKAMOTO, M. *et al.* Melatonin receptor structure and signaling. **Journal of Pineal Research**, v. 76, n. 1, e12952, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12952>.

OTT, S. **University of Washington**. Página institucional. Disponível em: <https://faculty.washington.edu/>. Acesso em: 3 maio 2025.

PANDI-PERUMAL, S. R. *et al.* Melatonin: nature's most versatile biological signal? **FEBS Journal**, v. 275, n. 6, p. 1399-1425, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06269.x>.

PEJON, L. *et al.* Melatonin administration on bone properties of animals under hypoestrogenism: a systematic review. **Frontiers in Endocrinology**, v. 16, p. 1-13, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1491236>.

PIETSCHMANN, P.; MECHTCHERIAKOVA, D.; MESHCHERYAKOVA, A.; FOGER-SAMWALD, U.; ELLINGER, I. Immunology of osteoporosis: a mini-review. **Gerontology**, v. 62, n. 2, p. 128-137, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1159/000431091>

RADOMINSKI, S. C. *et al.* Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, supl. 2, p. 452-466, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00221>

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 4, p. 405-426, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; GALANO, A. Melatonin: exceeding expectations. **Physiology (Bethesda)**, v. 29, n. 5, p. 325-333, set. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2014>

REITER, R. J. *et al.* Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of Pineal Research**, v. 61, p. 253-278, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12360> .

REITER, R. J. *et al.* Melatonin as an anti-inflammatory agent: actions at the cell and molecular levels. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 17, p. 1751–1760, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2174/1568026616666160314232131>.

RODRIGUES, T. L. *et al.* Osteocytes and the regulation of bone remodeling: a review. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 53, n. 1, p. 73-80, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbr.2012.10.002>.

SADADIWALA, M. H.; SADADIWALA, A. Association of serum estrogen and melatonin levels with bone mineral density of post-menopausal women: a case-control study. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 11, n. 5, p. 1644-1652, 2023. DOI: <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20231330>.

SEABRA, M. L.; BIGNOTTO, M.; PINTO, L. R. Jr.; TUFIK, S. Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. **Journal of Pineal Research**, v. 29, n. 4, p. 193-200, nov. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0633.2002.290401.x>

SHARMA, R. *et al.* Pathophysiology of bone remodelling cycle: role of immune system. **Bone**, v. 181, 116340, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2023.116340>.

SHEN, Y. *et al.* Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: implications for health and disease. **Antioxidants**, v. 13, n. 1, p. 45, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox13010045>.

SINGH, A. *et al.* Association of serum estrogen and melatonin levels with bone mineral density of post-menopausal women — a case-control study. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 11, n. 3, p. 807-812, 2023. DOI: <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20230574>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. **Manual Brasileiro de Osteoporose**. 5. ed. São Paulo: SBR, 2021.

SLÁDEK, M.; NOVÁKOVÁ, M.; SUMOVÁ, A. ROR: nuclear receptor for melatonin or not? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4686, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22094686>.

TARUMI, E. *et al.* Skeletal adaptation to mechanical cues during homeostasis and repair. **Frontiers in Physiology**, v. 14, 1233920, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1233920>.

TURNER, C. H.; ROEDER, R. K.; WIECZOREK, A.; FOROUD, T.; LIU, G.; PEACOCK, M. Variability in skeletal mass, structure, and biomechanical properties among inbred strains of rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 8, p. 1532-1539, ago. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.8.1532>

WRONSKI, T. J.; WALSH, C. C.; IGNAZSEWSKI, L. A. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Bone**, v. 7, n. 2, p. 119-123, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(86\)90683-6](https://doi.org/10.1016/8756-3282(86)90683-6)

XIA, S. *et al.* An update on inflamm-aging: mechanisms, prevention, and treatment. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/8426874>

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, out. 2018. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62349-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62349-5)

XU, L. *et al.* Melatonin prevents estrogen deficiency–induced osteoporosis by promoting osteoblastogenesis and inhibiting osteoclastogenesis. **Journal of Pineal Research**, v. 64, n. 3, e12483, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12483>.

YANG, C. *et al.* The role of melatonin in the development of postmenopausal osteoporosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 975181, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.975181>.

YOUSEFZADEH, N.; KASHFI, K.; JEDDI, S.; GHASEMI, A. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. **EXCLI Journal**, v. 19, p. 89-107, 10 Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.17179/excli2019-1990>

ZHAO, D. *et al.* The potential influence of melatonin on mitochondrial quality control. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, 1120093, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1120093>.

ZHAO, D. *et al.* Assessment of the therapeutic potential of melatonin for anti-osteoporosis therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 866625, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.866625>.

ZIBOLKA, J.; MÜLHBAUER, E.; PESCHKE, E. Melatonin influences somatostatin secretion from human pancreatic δ -cells via MT1 and MT2 receptors. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 2, p. 198-209, mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12206>

APÊNDICE A – PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UP)



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Profº Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300
Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290
Fax: (41) 317-3030
ceua@up.com.br

PROTOCOLO CEUA 550

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - UP)

suturada em dois planos separados, muscular e pele, com padrão interrompido simples e os animais ficarão em observação por 4 horas. Para a analgesia pós operatória, será administrada cloridrato de tramadol, na dose de 5 mg/kg a cada 12 horas por três dias e paracetamol na água de beber, com diluição de 20 gotas em 400 mL de água, ficando com fornecimento à vontade. Após a cirurgia será esperado um intervalo de 8 semanas para redução do estrogênio e assim caracterizar a menopausa. Após este período, inicia o tratamento com MLT nas doses especificadas acima, através do método de injeção intraperitoneal. As injeções serão realizadas diariamente, entre as 18h e 19hrs, pois os ratos têm hábitos noturnos e o início da síntese da melatonina ocorre durante o período vespertino com seu pico no início da noite pela ausência de estímulo luminoso (ZUKISWA et al., 2018). Será utilizado o produto: melatonina líquida manipulada na concentração de 10mg/ml, 20mg/ml e 50mg/ml, da farmácia de manipulação Milgrama® de Curitiba – PR. Após o tratamento com MLT, será feita a administração de um fluoróforo, que é a calceína, para marcação do tecido ósseo e posterior análise dinâmica pela histomorfometria óssea. Esse processo é realizado por cinco dias seguidos antes da eutanásia dos animais, com dose de 20mg/Kg. Em ambas as etapas serão realizadas observações comportamentais sistemáticas para avaliar o screening hipocrático que fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado consciente e disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e sobre o sistema nervoso autônomo. Parâmetros (tais como: atividade geral, frênto vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta aperto cauda, contorção, posição membros posteriores, reflexo endireitamento, tonus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, morte) serão avaliados a cada 15 dias após o início da administração da melatonina. Em complemento, será realizado o teste do labirinto em cruz elevado em um labirinto em forma de Y, elevado do chão. O teste em cruz elevado (TCE) será disponibilizado pelo Biotério da Universidade Positivo. Neste teste será avaliada a estimulação provocada pela novidade produzida por um conflito entre medo e curiosidade, com tendências à esquiva e aproximação. Tal método é um instrumento útil e válido para medir a ansiedade, investigando aspectos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos dos animais. O teste será realizado com todos os 80 animais, de acordo com os seus respectivos grupos. Um dos 10 animais de cada grupo será colocado no centro do labirinto individualmente, para que explorem todo aparato durante 3 minutos. A cada troca de animal será realizada a assepsia do labirinto com algodão e álcool 70%. Todos os testes serão identificados com data e hora da execução, além da identificação do grupo a que pertencem. Neste teste serão analisadas as seguintes medidas comportamentais: (1) número de entradas nos braços abertos, (2) número de entradas nos braços fechados, (3) número total de entradas e (4) tempo de permanência no centro. A entrada em um dos braços só é considerada válida após as 4 patas do animal atravessarem o limite do braço. Consideraremos ainda as medidas etológicas que serão analisadas a partir do (5) tempo de esquadramento, (6) frequência de exploração das extremidades dos braços abertos e (7) tempo de espreitamento. O teste de reconhecimento de objetos (ORT) é utilizado para avaliar a memória em ratos e para detectar alterações neuropsicológicas após manipulação farmacológica, biológica ou genética. O ORT será disponibilizado pelo Biotério da Universidade Positivo. O teste será realizado em uma caixa de acrílico aberta na parte superior. As paredes laterais da caixa serão cobertas por cartolina preta para que não haja interferência de estímulos externos. Os animais serão ambientados na sala de experimento por aproximadamente 60 minutos. Os testes serão realizados sempre no período da tarde (14h – 18 horas). Os objetos que serão apresentados aos roedores como estímulo serão adquiridos no estabelecimento Rei dos Animais, localizado na Av. Brasília, 4660 - Curitiba, Pr e irão variar em forma, tamanho e cor. Durante os testes os objetos serão fixados ao chão da caixa para que não se movam. Para retirar qualquer interferência olfatória, a caixa e os objetos serão limpos com álcool 70% a cada troca de animal. Será realizada uma habituação dos animais à caixa de acrílico onde serão realizados os testes. Os animais serão introduzidos individualmente dentro da caixa por um período de 3 dias consecutivos durante 5 minutos. Dois objetos (A e B) próximos serão colocados aos dois cantos da caixa. O animal será colocado no


COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Profª Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300
Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290
Fax: (41) 317-3030
ceua@up.com.br

PROTOCOLO CEUA 550
PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - UP)

canto direito inferior e poderá explorar o ambiente e os objetos durante 5 minutos. O tempo de exploração de cada animal será cronometrado. Após 24 horas (memória de longo prazo) repetiremos o teste. O objeto A será mantido e o objeto B será trocado, um objeto C será colocado no lugar do B. O comportamento exploratório será definido pelo direcionamento e movimento das vibrissas dos roedores para o objeto. Qualquer outro comportamento, como olhar ao redor ou andar em círculos em volta do objeto, não será considerado exploração. Durante todo o estudo, será avaliado por checklists o ponto final humanitário (PFH) dos animais. Quando os animais apresentarem sinais clínicos que indicarem que o experimento já atingiu o objetivo esperado (ou já foi verificado que não será mais alcançado); quando os animais sentirem dor, sofrimento, distresse ou dano duradouro além do que poderia ocorrer, então o ponto final será aplicado em um baixo nível de sofrimento não deixando que o animal chegue ao estado moribundo; quando algum problema ocorre comprometendo os dados coletados em um experimento (RICHMOND, 1999). A fase II do estudo baseia-se na eutanásia das ratas, que será realizada após 8 semanas de tratamento dos animais e seguirá o seguinte protocolo: os animais serão colocadas na câmara de CO₂ e imediatamente após o animal ficar inconsciente, será realizada uma punção intra-cardíaca com seringas descartáveis de 5,0 ml e agulhas tamanho 25 x 7. Serão coletados através da punção $\pm$ 5,0 ml de sangue total por animal. Após a punção, será realizada a dissecação de uma perna de cada animal para coleta do fêmur e músculos da coxa, e tricotomia na região dorsal para posterior coleta de tecido cutâneo. As amostras de fêmur serão colocadas em frascos contendo Alcool etílico, devidamente identificados com o número do animal (1-80) e se o rato pertencia ao grupo com ou sem melatonina, com ooforectomia ou sem. As amostras de tecido cutâneo e muscular serão colocadas em frascos contendo formaldeído a 10% tamponado, por 24h. A avaliação laboratorial incluirá hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas; alanina-aminotransferase (ALT), aspartato-aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamilttransferase (GGT), creatinina, ureia, proteínas totais, colesterol total, triglicérides, albumina, glicemia e uranálise. Também será coletada urina via cistocentese para avaliação da concentração urinária de desoxipiridinolina, marcador da reabsorção óssea. As amostras obtidas de fêmur serão fixadas em álcool 70% e embebidas em metacrilato, deste modo se realizará o corte dos fêmures em micrótomo rotativo Leica RM2165 em espessura de 5-7 μ m. Posteriormente, as lâminas receberão a coloração por azul de toluidina por 10 minutos, e assim as lâminas serão montadas com etellan e vedadas com laminulas. Após o preparo do material, seguindo todos os passos citados acima, será realizada a técnica de histomorfometria óssea. As amostras de tecido cutâneo e muscular, passarão pelo procedimento padrão para preparação histopatológica, incluídos em bloco de parafina e cortes realizados em micrótomo rotativo. Posteriormente, os cortes serão fixados em lâminas e coradas com Hematoxilina - Eosina (HE) e picrosírius, corante específico de fibras colágenas. Após a obtenção do material e todo procedimento de fixação, desidratação e clareamento será realizada a polimerização do metacrilato, formando assim um bloco em volta do fragmento ósseo. Esse bloco será submetido a cortes histológicos no aparelho micrótomo e então é confeccionada a lâmina (conforme passos já relatados anteriormente), que será analisada utilizando o microscópio com luz ultravioleta acoplado a uma câmera colorida de alta resolução digital (Olympus), cursor e placa digitalizadora. Para avaliar as imagens e fazer análise quantitativa das estruturas será utilizado o software OsteoMeasure. Os seguintes parâmetros serão medidos: Estruturais: volume ósseo trabecular (BV/TV), largura das trabéculas (Tb.Th), número trabecular (Tb.N), separação das trabéculas (Tb.Sp), largura cortical (Ct.W), superfície e largura osteóide (OS/BS; O.Th), superfície reabsorvida (Er/BS), superfície de mineralização (MS/BS), taxa de aposição mineral (MAR), taxa de formação óssea (BFR) (PARFITT et al, 1987, BAST et al, 2014). Para a realização dos ensaios de imunohistoquímica por peroxidase, cortes de 7 μ m dos espécimes ósseos serão depositados em lâminas carregada positivamente (Immunoslide, Easypath®). Posteriormente, os cortes receberão banho de metacrilato, reidratados em concentrações decrescentes de etanol, e processados para a imunohistoquímica. Cortes reidratados receberão incubação xilol e clorofórmio por 30 minutos em agitação, 10 minutos de incubação com ácido acético 1%, e incubação com 3% H₂O₂ em metanol para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica será realizada em

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Rua Profº Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300
Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290
Fax: (41) 317-3030
ceua@up.com.br

PROTOCOLO CEUA 550

**PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - UP)**

tampão Citrato de Sódio 10 mM, pH 6.0, à 95° C, por 40 minutos. Possíveis ligações não específicas, bem como radicais aldeídicos livres serão bloqueados pela incubação de 5 minutos com PBS contendo 1% de BSA e por PBS contendo 0,1M de Glicina, respectivamente. Posteriormente, os cortes passarão por incubação que durará 12 horas à 4°C com os anticorpos primários. Os anticorpos primários utilizados e suas diluições serão: β -catenina (Santa Cruz Biotechnology, CA, SC53630, IgG de camundongo, diluído 1:200), NF- κ B (Santa Cruz Biotechnology, CA, SC5344, IgG de cabra, diluído 1:200), CD45 (Santa Cruz Biotechnology, CA, SC5692, IgG de cabra, diluído 1:200) e CD34 (Biocare Medical, IgG de coelho CM279). Após a incubação com os anticorpos primários, será realizada a incubação dos anticorpos secundários por 30 minutos em temperatura ambiente, sendo eles: anticorpo secundário biotinilado de coelho contra IgG de cabra (Vector Laboratories, BA-500, diluído 1:200), anticorpo secundário biotinilado de cabra contra IgG de camundongo (Vector Laboratories, BA-9200, diluído 1:300), após a incubação com os respectivos anticorpos secundários será realizada a incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase por 30 minutos. A revelação da ligação dos anticorpos primários é realizada com DAB ("3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride") (DAB substrate Kit, BD Pharmingen). A seguir, os cortes serão desidratados em bateria crescente de etanol. Após incubação em xilol, as lâminas permanentes serão montadas com Entellan (Merck®). Também serão realizados cortes histológicos hepáticos e renais em blocos de tecido correspondente, fixados em formalina e embebidos em parafina e seccionados para análise imunohistoquímica. Serão feitos três a cinco cortes histológicos de 4 mm de cada bloco. Uma lâmina será usada para imunohistoquímica do p53 (p53-DO7, Glostrup, Denmark) e outra lâmina para Ki-67 (Mm-I, Immunotech, Marseille, France), através do método do complexo da avidina- biotina- peroxidase. Para apoptose por determinação da caspase ativada, será feito o uso de anticorpo monoclonal anti-caspase ativada e coloração com Fluoro-Jade C. Brevemente, a imunodeteção envolveu o uso de cortes histológicos com 4 mm de espessura de tecido fixado em formalina e embebido em parafina, tratados com peróxido de hidrogênio a 4% (H₂O₂) em metanol por 35 minutos para eliminar a atividade endógena da peroxidase. Os cortes sofrerão a retirada antigênica por 10 minutos (microondas ou panela de pressão) e serão lavados com solução salina fosfatada e tamponada (PBS) e incubados com 10% de soro de cavalo para bloquear as ligações não específicas. Após remoção do soro, será aplicado o anticorpo monoclonal primário (à temperatura ambiente e por uma hora). Após nova lavagem com PBS, os cortes histológicos serão incubados com anticorpo secundário por 30 minutos, lavados duas vezes e tratados com o complexo de peroxidase Vectastain Elite (Vector Laboratory, Burlingame, CA) por 30 minutos. Seguindo-se nova lavagem com PBS, e incubados com diaminobenzidina a 0,05% e H₂O₂ a 0,04%, lavados com água destilada, corados com hematoxilina, e desidratados através de álcoois e xilol.

COMENTÁRIOS DO RELATOR

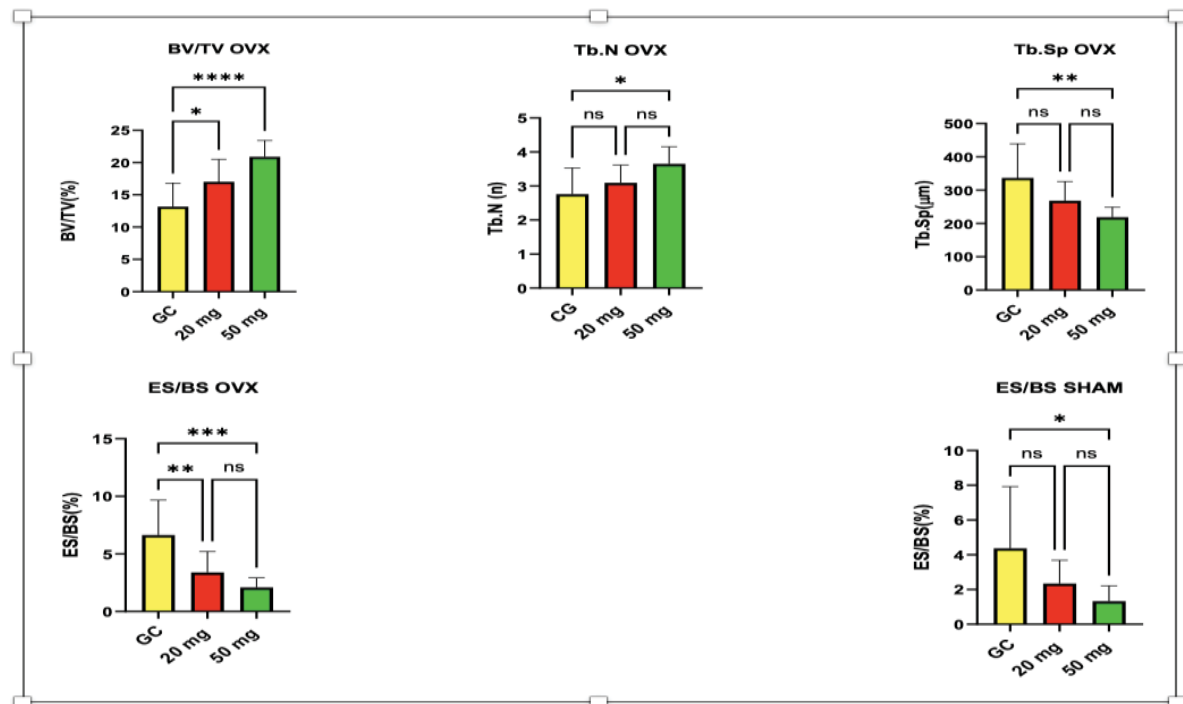
Sem comentários adicionais

PARECER

Recomenda a Aprovação

APÊNDICE B: GRÁFICOS ANÁLISE *POST HOC*

Análise *post hoc* dos parâmetros histomorfométricos estáticos em ratas OVX e SHAM tratadas com melatonina

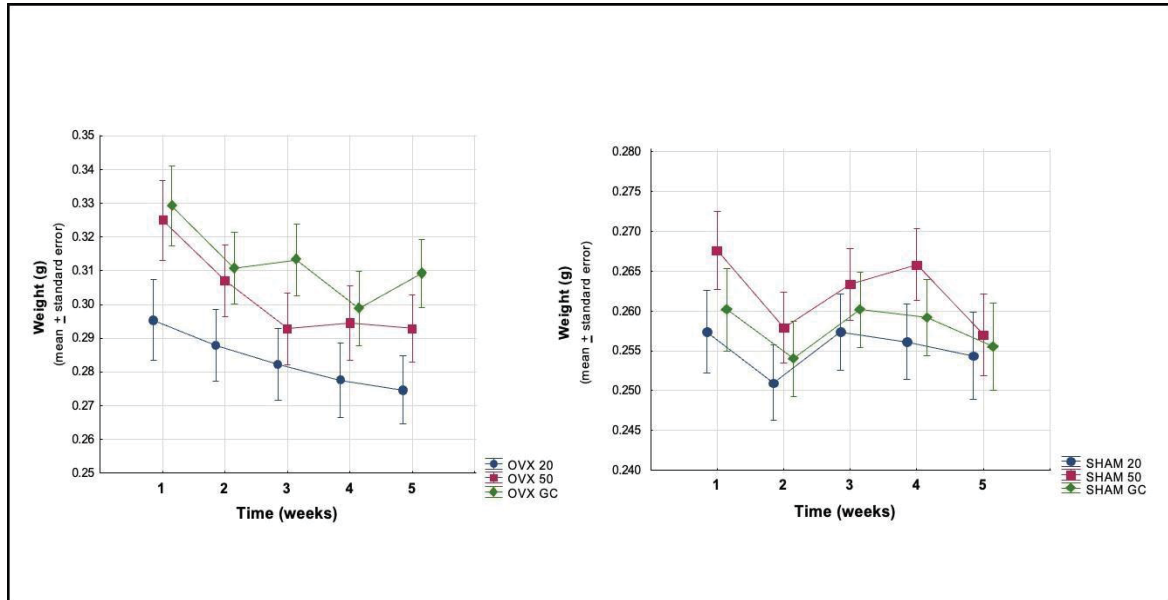


Abreviações: Representação gráfica da análise *post hoc* dos valores de volume ósseo trabecular (BV/TV, %), número trabecular (Tb.N, n/mm), separação trabecular (Tb.Sp, μm) e superfície reabsorvida (ES/BS, %) nos grupos ovariectomizados (OVX) e SHAM tratados com melatonina nas doses de 20 mg/kg e 50 mg/kg, em comparação ao grupo controle (GC). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida de teste *post hoc* ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$; ns = não significativo)

Fonte: Andrade V.F.C. (2025)

APÊNDICE C: GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS

Evolução do peso corporal das ratas durante as oito semanas de tratamento com melatonina por gavagem



Abreviações: OVX 20: ratas ovariectomizadas tratadas com melatonina 20 mg/kg; OVX 50: ratas ovariectomizadas tratadas com melatonina 50 mg/kg; OVX GC: ratas ovariectomizadas tratadas com gavagem controle (placebo); SHAM 20: ratas submetidas à cirurgia SHAM tratadas com melatonina 20 mg/kg; SHAM 50: ratas SHAM tratadas com melatonina 50 mg/kg; SHAM GC: ratas SHAM tratadas com gavagem controle (placebo).

Fonte: Olandoski, M. (2025).

APÊNDICE D – RESUMO PUBLICADO REVISTA DE SAÚDE DE SANTA MARIA

Histomorfometria Óssea em Ratas Wistar com menopausa induzida por ooforectomia e tratadas com diferentes doses de Melatonina. Introdução: O hipostrogenismo por ocasião da menopausa tem relação temporal com a redução da síntese de melatonina (MLT) pela glândula pineal. Estudos sugerem que a MLT tenha uma ação dual, com inibição da reabsorção e estímulo da formação óssea. Entretanto não existem estudos de histomorfometria óssea (HO) que comprovem uma prevenção da perda de massa óssea em animais. Como a MLT apresenta efeitos favoráveis em vários tecidos, a sua reposição poderia ser benéfica na pós-menopausa. Objetivo: Avaliar em modelo animal de osteoporose os parâmetros estruturais e da remodelação em tíbias de ratas tratadas com diferentes doses de MLT pela técnica de HO. Metodologia: O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob o parecer CEUA 550, tendo utilizado os protocolos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Sessenta Ratas da linhagem Wistar (adultas com pico de massa óssea) foram submetidas à ooforectomia (grupo OVX, n = 30) e à cirurgia placebo (grupo SHAM, n= 30) com 20 semanas de vida. Elas foram subdivididas em 6 grupos (n=10), e após 9 semanas do procedimento cirúrgico, receberam as doses de 20 mg, 50 mg/kg de MLT ou placebo por gavagem, por oito semanas. A eutanásia foi feita na 28ª semana de vida e as tíbias coletadas seguiram o processamento padrão para HO. A leitura das lâminas foi realizada através do programa Osteomeasure® pelo mesmo pesquisador. Resultados: Os grupos SHAM, MLT 20 e 50 mg/kg apresentaram um aumento no volume ósseo, ([BV/TV], p= 0,001) e no número de trabéculas ([Tb.N], p=0,001), com menor espaçamento entre as trabéculas ([Tb.Sp], p= 0,001) em relação ao grupo controle (GC). Não houve diferença entre os grupos SHAM MLT 20 e 50 mg/kg peso. Houve aumento na superfície de erosão ([ES/BS], p= 0,041) no GC em relação ao grupo SHAM 50 mg/kg peso. Em relação ao grupo ooforectomizado (OVX), observou-se um aumento no volume ósseo, ([BV/TV], p= 0,012) no grupo de 20 e 50 mg/kg. Houve aumento significativo na superfície de erosão [ES/BS] no grupo controle em relação aos grupos OVX 20 mg e 50 mg/Kg peso, p= 0,001. Conclusão: O uso da MLT se correlacionou com melhores parâmetros estruturais e da microarquitetura óssea sugerindo um potencial efeito benéfico da MLT na prevenção da perda óssea relacionada ao envelhecimento e ao hipostrogenismo.

APÊNDICE E – ABSTRACT ASBMR 2024 (TORONTO)

ASBMR 2024

SUN-124

Bone histomorphometry in female Wistar rats treated with different doses of Melatonin Fatima Correa Sandmann-Afonso^{*1,2,3}, Rafaela Ceron¹, Angela Reck⁴, Leticia Capote dos Santos¹, Lorena Bavia⁵, Maritana Mela Prodocimo⁵, Liliane Roskamp⁶, Thais Andrade Costa Casagrande⁴, Vicente Florentino Castaldo Andrade^{1,2,3} and Carolina Aguiar Moreira^{1,2,3}, ¹Academic Research Center, Pro Renal Institute, Brazil, ²Postgraduate in Internal Medicine and Health Sciences at Federal University of Parana, Brazil, ³Endocrine Division (SEMPR), Department of Internal Medicine Federal University of Parana, Brazil, ⁴College of Veterinary Medicine at Positivo University, Brazil, ⁵Laboratory of Cellular Toxicology at Federal University of Parana, Brazil, ⁶Tuiuti University of Parana School of Dentistry, Brazil

Hypoestrogenism during menopause is associated with decreased melatonin (Melt) production by the pineal gland, a decline that also occurs with aging. Melatonin interacts with bone receptors, particularly in the bone marrow where bone cell precursors are located. This hormone plays a protective role in the skeleton mainly by reducing bone resorption. The objective of this study was to evaluate, in an animal model of osteoporosis, the structural and remodeling parameters in tibias of female Wistar rats treated with different doses of Melt by the Bone Histomorphometry (BH). This study is a cross-sectional observational and analytical study. The project was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA) under number 550. Sixty female Wistar rats underwent ovariectomy (OVX, n = 30) and SHAM surgery (SHAM, n = 30) at 20 weeks of life. They were subdivided into 6 groups (n=10), and after 11 weeks, received doses of 20 mg, 50 mg/kg of Melt or placebo by gavage, for eight weeks. Euthanasia was performed at the 41st week of life, and the tibias were collected for analysis. The OVX group showed an increase in bone volume ([BV/TV], $p < 0.001$), in the number of trabeculae ([Tb. N], $p = 0.035$) with 50 mg/kg compared to the control group (CG). There was an increase in erosion surface ([ES/B], $p = 0.002$) and trabecular separation ([Tb. Sp], $p = 0.020$) in the CG compared to the OVX group 50 mg/kg. In the SHAM animals, the Melt 20 and 50 mg/kg groups showed an increase in BV/TV ($p = 0.001$) and in the Tb. N ($p = 0.005$), with less spacing between trabeculae Tb. Sp ($p = 0.002$) compared to the CG. There was no difference between the doses in the SHAM group, and there was no significant increase in erosion surface ([ES/BS], $p = 0.080$) in the CG compared to the SHAM 20 and 50 mg/kg groups. The animals were weighed every fifteen days after the start of Melt administration. Anova showed that there was no significant interaction between the moments of weight assessment and the groups, indicating that the weight progressions of the 3 SHAM groups ($p=0.448$) and the 3 OVX groups ($p=0.591$) were not different. Furthermore, there was no significant correlation between weight and bone histomorphometry parameters in both groups. The use of Melt was linked to enhancements in structural and bone microarchitecture parameters, suggesting that this hormone could play a key role in reducing bone loss associated with estrogen deficiency and aging.

Disclosures: R. Peters, None

APÊNDICE F – ABSTRACT ISBM 2024 (TORONTO)

P-082 Fatima Sandmann-Afonso, MD and Carolina Aguiar Moreira, MD, PhD

Bone histomorphometry in female Wistar rats treated with different doses of Melatonin

Fatima Correa Sandmann-Afonso*^{1,2,3}, Rafaela Ceron¹, Angela Reck⁴, Leticia Capote dos Santos¹, Lorena Bavia⁵, Maritana Mela Prodocimo⁵, Liliane Roskamp⁶, Thais Andrade Costa Casagrande⁴, Vicente Florentino Castaldo Andrade^{1,2,3} and Carolina Aguiar Moreira^{1,2,3}
(1) Academic Research Center, Pro Renal Institute, Curitiba, Brazil, (2) Postgraduate in Internal Medicine and Health Sciences at Federal University of Parana, Curitiba, Brazil, (3) Endocrine Division (SEMPR), Department of Internal Medicine Federal University of Parana, Curitiba, Brazil, (4) College of Veterinary Medicine at Positivo University, Curitiba, Brazil, (5) Laboratory of Cellular Toxicology at Federal University of Parana, Curitiba, Brazil, (6) Tuiuti University of Parana School of Dentistry, Curitiba, Brazil

Hypoestrogenism during menopause is associated with decreased melatonin (Melt) production by the pineal gland, a decline that also occurs with aging. Melatonin interacts with bone receptors, particularly in the bone marrow where bone cell precursors are located. This hormone plays a protective role in the skeleton mainly by reducing bone resorption. The objective of this study was to evaluate, in an animal model of osteoporosis, the structural and remodeling parameters in tibias of female Wistar rats treated with different doses of Melt by the Bone Histomorphometry (BH). This study is a cross-sectional observational and analytical study. The project was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA) under number 550. Sixty female Wistar rats underwent ovariectomy (OVX, n = 30) and SHAM surgery (SHAM, n = 30) at 20 weeks of life. They were subdivided into 6 groups (n=10), and after 11 weeks, received doses of 20 mg, 50 mg/kg of Melt or placebo by gavage, for eight weeks. Euthanasia was performed at the 41st week of life, and the tibias were collected for analysis. The OVX group showed an increase in bone volume ([BV/TV], $p < 0.001$), in the number of trabeculae ([Tb. N], $p = 0.035$) with 50 mg/kg compared to the control group (CG). There was an increase in erosion surface ([ES/B], $p = 0.002$) and trabecular separation ([Tb. Sp], $p = 0.020$) in the CG compared to the OVX group 50 mg/kg. In the SHAM animals, the Melt 20 and 50 mg/kg groups showed an increase in BV/TV ($p = 0.001$) and in the Tb. N ($p = 0.005$), with less spacing between trabeculae Tb. Sp ($p = 0.002$) compared to the CG. There was no difference between the doses in the SHAM group, and there was no significant increase in erosion surface ([ES/BS], $p = 0.080$) in the CG compared to the SHAM 20 and 50 mg/kg groups. The animals were weighed every fifteen days after the start of Melt administration. Anova showed that there was no significant interaction between the moments of weight assessment and the groups, indicating that the weight progressions of the 3 SHAM groups ($p=0.448$) and the 3 OVX groups ($p=0.591$) were not different. Furthermore, there was no significant correlation between weight and bone histomorphometry parameters in both groups. The use of Melt was linked to enhancements in structural and bone microarchitecture parameters, suggesting that this hormone could play a key role in reducing bone loss associated with estrogen deficiency and aging.

APÊNDICE G – SUBMISSÃO DO SEGUNDO ARTIGO PARA A REVISTA CALCIFIED TISSUE INTERNATIONAL

O segundo artigo foi submetido à Revista Calcified Tissue International.

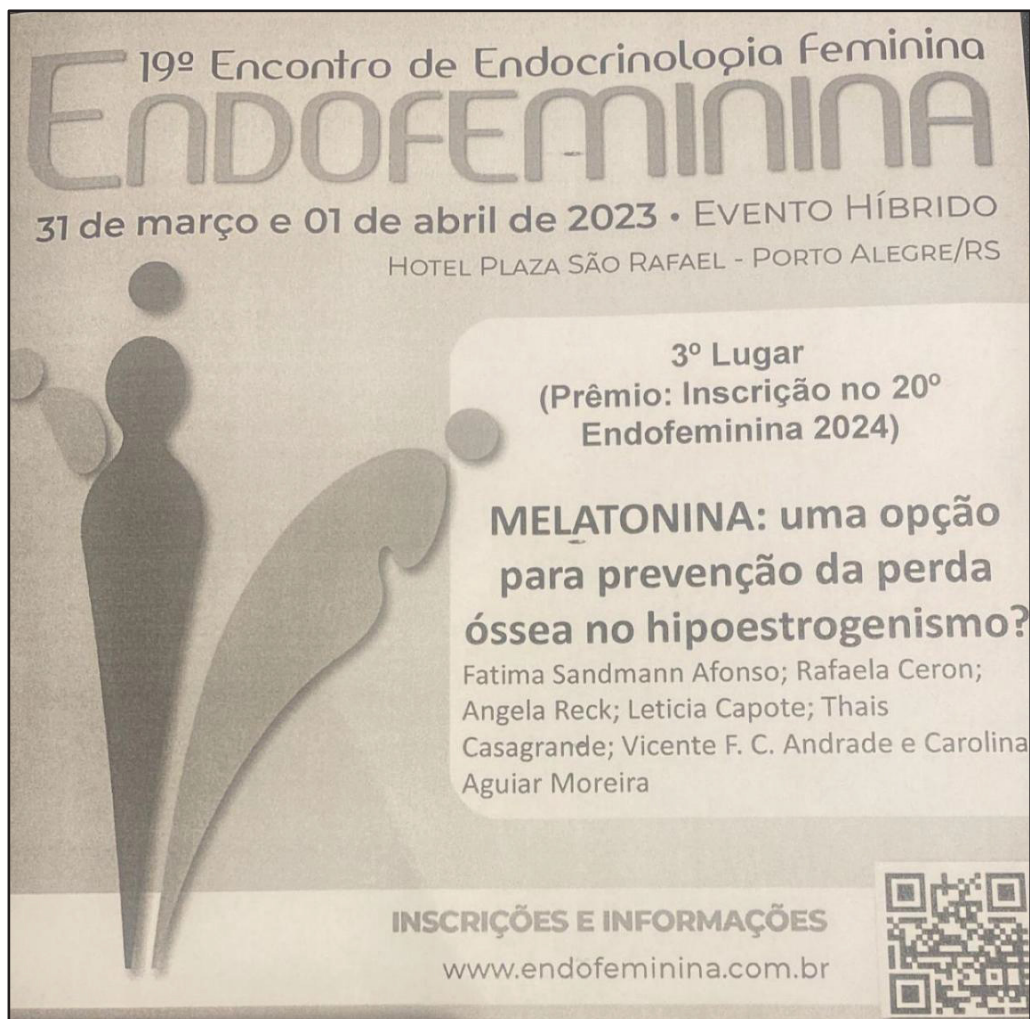
Calcified Tissue International

Melatonin modulates β -catenin and newly identifies MMP-2 as a putative target in bone tissue of ovariectomized rats

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	CTIN-D-25-00587
Full Title:	Melatonin modulates β -catenin and newly identifies MMP-2 as a putative target in bone tissue of ovariectomized rats
Article Type:	Original Article
Funding Information:	
Abstract:	Melatonin is known for its antioxidant and anti-inflammatory effects on bone tissue, primarily through modulation of NF- κ B and Wnt/ β -catenin signaling pathways. However, its impact on extracellular matrix metalloproteinases, particularly MMP-2, remains poorly understood. In this study, ovariectomized (OVX) rats were treated with melatonin (50 mg/kg/day for 8 weeks), and tibial sections were analyzed using immunohistochemistry with quantitative image analysis. Melatonin significantly increased β -catenin expression (405.3 ± 29.0 vs. 213.0 ± 29.0 , mean $\pm$ SD; $p < 0.0001$) and MMP-2 expression (677.7 ± 45.1 vs. 449.3 ± 45.1 ; $p = 0.0004$) compared to OVX controls, with no significant changes in NF- κ B expression. These findings confirm melatonin's enhancement of β -catenin signalling and reveal a novel upregulation of MMP-2 in bone tissue. We propose that melatonin may modulate extracellular matrix remodeling via MMP-2, potentially contributing to reduced bone resorption and preservation of trabecular microarchitecture, although the precise mechanism warrants further investigation.
Corresponding Author:	Fatima Sandmann- Afonso, M.D Federal University of Parana Health Sciences Sector: Universidade Federal do Parana Setor de Ciencias da Saude BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Federal University of Parana Health Sciences Sector: Universidade Federal do Parana Setor de Ciencias da Saude
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Fatima Sandmann- Afonso, M.D
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Fatima Sandmann- Afonso, M.D Vicente Florentino Castaldo Andrade, PHD Carolina Aguiar Moreira, PHD
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	To the Editor, Calcified Tissue International I am pleased to submit for your consideration the manuscript entitled: "Melatonin modulates β -catenin and newly identifies MMP-2 as a putative target in bone tissue of ovariectomized rats." This " Short Communication " derives from an experimental study in rodents (Original Research) in which the effects of melatonin on bone tissue were previously evaluated by histomorphometry. In the present study, we extended this work by analyzing β -catenin, NF κ B, and MMP-2 through immunohistochemistry. The study was carried out at the Bone Histomorphometry Laboratory of Instituto Pró-Renal, Curitiba, Brazil, in collaboration with Positivo University, and was approved by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA 550). The authors declare no conflict of interest related to this work. We believe these results represent an original contribution to the field of bone

**ANEXO A – PRÊMIO ENDOFEMININA ENCONTRO
DE ENDOCRINOLOGIA FEMININA 2022**



19º Encontro de Endocrinologia Feminina
ENDO FEMININA
31 de março e 01 de abril de 2023 • EVENTO HÍBRIDO
HOTEL PLAZA SÃO RAFAEL - PORTO ALEGRE/RS

3º Lugar
(Prêmio: Inscrição no 20º
Endofeminina 2024)

**MELATONINA: uma opção
para prevenção da perda
óssea no hipoestrogenismo?**

Fatima Sandmann Afonso; Rafaela Ceron;
Angela Reck; Leticia Capote; Thais
Casagrande; Vicente F. C. Andrade e Carolina
Aguiar Moreira

INSCRIÇÕES E INFORMAÇÕES
www.endofeminina.com.br

