

INFLUÊNCIA DA MELATONINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO CORPORAL E ÓSSEO DE RATOS

INFLUENCE OF MELATONIN ON BODY AND BONE DEVELOPMENT OF RATs

KARIME SAAD*, LUIZ CARLOS DOS REIS**

RESUMO

Objetivo: A glândula pineal produz o hormônio melatonina (MLT), que apresenta efeitos demonstrados sobre diversas células, entre elas os adipócitos e osteoblastos. Este trabalho objetivou verificar a influência da MLT no crescimento e desenvolvimento corporal e ósseo em ratos. **Método e Resultados:** Ratos Wistar machos foram submetidos a pinealectomia (PINX) ou cirurgia fictícia (CONTR) aos 5 dias do nascimento e estudados quanto ao peso e comprimento corporal; comprimento, espessura da tábua óssea e do disco epifisário da tíbia após 10, 20, 30, 60, 90 e 120 dias da operação. O peso dos animais PINX foi maior que o dos CONTR aos 100 e 120 dias. Os animais PINX tiveram ainda menor espessura da tábua óssea aos 60, 90 e 120 dias e menor espessura do disco epifisário aos 90 e 120 dias após o procedimento cirúrgico, comparados aos animais CONTR. **Conclusões:** A falta de MLT resultou em aumento do peso corporal, provavelmente pela maior captação de ácidos graxos pelos adipócitos e redução da termogênese; menor espessura da tábua óssea e disco epifisário da tíbia pela redução da atividade de condrócitos e osteoblastos. Estes efeitos poderiam ser diretos e/ou indiretos, e seu esclarecimento demanda mais estudos.

Palavras-chave: Melatonina; Glândula pineal / crescimento & desenvolvimento; Desenvolvimento ósseo; Ratos

INTRODUÇÃO

O crescimento pñdero-estatural dos animais depende do estado nutricional e também da ação de hormônios

(GH, somatomedinas, cortisol, hormônios sexuais, insulina), que atuam sobre tecidos em geral, incluindo o tecido ósseo, o principal responsável pelo crescimento linear¹⁻².

Apesar de sua aparência estática, os ossos encontram-se num estado dinâmico de formação (feita pelos osteoblastos) e reabsorção (feita pelos osteoclastos), que possibilita seu crescimento, renovação, reparação de lesões, ajustes aos estresses mecânicos e também a participação na manutenção da homeostase de cálcio plasmático, situação que é influenciada por hormônios como o paratormônio (PTH)³⁻⁵.

A melatonina (MLT) é um hormônio produzido pela glândula pineal, cujas funções incluem a sincronização de ritmos endógenos aos ritmos ambientais de claro-escuro, estímulo da secreção de insulina e da sensibilidade celular a este hormônio, inibição do eixo hipotálamo-hipófise-

* Mestre em Patologia Geral (FMTM)

** Doutor em Fisiologia (FMRP)

Departamento de Ciências Biológicas – Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade de Uberaba

Endereço para correspondência:

Disciplina de Fisiologia

Departamento de Ciências Biológicas

Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro

Praça Manoel Terra, 200

Uberaba – MG

034- 3318.5421

karimesaad@hotmail.com

Data de Submissão:

01/12/03

Data de Aprovação:

03/08/04

gônadas e estímulo da secreção de fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF)^{6,9}.

Existem evidências de que a glândula pineal influencia o tecido ósseo, tendo sido observado o surgimento de escoliose em aves, após a pinealectomia¹⁰. Estudos têm demonstrado também, ainda que a produção de MLT declina com o envelhecimento, situação que poderia relacionar-se ao surgimento e agravamento da osteoporose¹¹. Além disso, a MLT ativa a diferenciação de pré-osteoblastos e osteoblastos e a formação óssea, *in vitro*¹².

Considerando as informações presentes na literatura, o presente estudo foi realizado para verificar a influência da melatonina em condições *in vivo*, analisando o crescimento e o desenvolvimento corporal e ósseo de ratos pinealectomizados, comparados a ratos normais.

MATERIAL E MÉTODO

Animais e grupos experimentais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos, da linhagem Wistar, desde cinco dias de nascimento até 120 dias de vida, obtidos do biotério da disciplina de Fisiologia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (FMTM). Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais: grupo controle (submetidos à operação fictícia – CONTR) e grupo pinealectomizado (submetidos à retirada da pineal – PINX). Após a operação fictícia ou pinealectomia, os animais foram acompanhados, sendo pesados a cada dez dias, até 120 dias. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em um número de animais suficiente para que, após 10, 20, 30, 60, 90 e 120 dias, tivéssemos cerca de dez animais de cada grupo experimental.

Procedimentos cirúrgicos

Os animais, com cinco dias de nascimento, foram submetidos à crióanestesia, que consiste em colocá-los em ambiente de baixa temperatura (-8 a -10°C) durante cerca de 15 minutos, até que não se notem mais movimentos e que a respiração e batimentos cardíacos estejam muito reduzidos. Este procedimento é aceito pela comunidade científica como método para anestesia de animais jovens de pequeno porte, sendo recomendado inclusive pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América¹³, pois o uso de anestésicos nestes animais gera alta mortalidade e, na condição de crióanestesia, eles mantêm um metabolismo baixo e a sensibilidade dolorosa encontra-se reduzida, o que possibilita a realização do procedimento cirúrgico.

Imediatamente após a retirada dos animais do ambiente frio, os mesmos foram pesados, colocados em decúbito ventral, sendo feita incisão em forma de U na calota craniana, na região da sutura parieto-occipital. Com auxílio de pinças adequadas, a pele e os tecidos subcutâneo e ósseo foram

levantados, sendo visualizada a glândula pineal logo abaixo, entre os hemisférios cerebrais e o cerebelo. Através de pinçamento suave, a pineal foi retirada, sendo rebaixados os tecidos seccionados. A sutura foi realizada com o uso de cola (Super Bonder®), que tem sido utilizada neste tipo de procedimento em razão da fragilidade dos tecidos dificultar um processo de sutura com fios.

Ainda sob a crióanestesia, os animais receberam marcação com injeção de cerca de 0,05ml de tinta Nanquim no subcutâneo, em diferentes regiões do corpo para permitir sua identificação futura. Após a operação e a marcação, os animais foram mantidos sob luz incandescente para receberem calor e obterem recuperação mais rápida.

A operação fictícia foi realizada seguindo as mesmas etapas da pinealectomia, inclusive o levantamento dos tecidos subcutâneo e ósseo, visualizando-se assim a pineal, sem, contudo, proceder a sua retirada. Todos os animais foram, então, recolocados junto com suas mães, onde permaneceram até o 30º dia de vida.

Acompanhamento e coleta de material

A partir das operações realizadas, os animais foram acompanhados, sendo sacrificados alguns deles após 10, 20, 30, 60, 90 e 120 dias do procedimento cirúrgico, para coleta de dados das dimensões corporais (peso, comprimento do corpo, comprimento das patas, comprimento das tíbias) e coleta de material ósseo para estudo morfo-métrico macroscópico (comprimento da tíbia) e microscópico (espessura da tábua óssea e do disco epifisário).

Análise estatística

Os resultados referentes aos parâmetros corporais e histomorfométricos foram organizados em planilha eletrônica (Excel – Microsoft) de acordo com o grupo experimental e o tempo decorrido (10 a 120 dias após a operação). A partir daí, procedeu-se à análise estatística descritiva (média, desvio padrão) e comparativa (análise de variância e teste de comparação de médias). A análise de variância foi realizada, seguindo-se um pós-teste de Tukey para determinação dos grupos diferentes entre si. Os resultados foram considerados diferentes de maneira estatisticamente significativa para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Entre todos os parâmetros analisados, foram detectadas diferenças estatisticamente significativas apenas quanto ao peso corporal, espessura da tábua óssea e do disco epifisário das tíbias.

Peso corporal

Houve ganho de peso proporcional entre os animais do grupo controle e experimental até 90 dias após o ato cirúrgico. A partir de 100 dias, os animais pinealectomizados passaram a ter peso maior que os do grupo controle ($p < 0,05$).

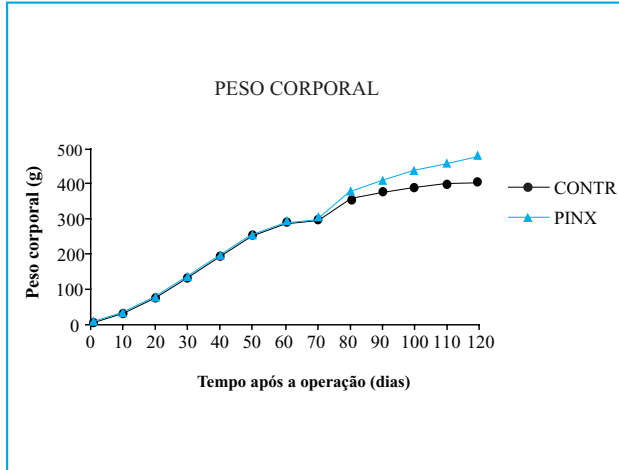


Gráfico 1 - Evolução do peso corporal (g) nos animais controle (CONTR) e pinealectomizados (PINX) (média ± desvio padrão da média), do dia do procedimento até 120 dias após a operação (*: diferente em relação ao grupo controle; $p < 0,05$).

Espessura da tábua óssea

As medidas da espessura da tábua óssea nos animais do grupo controle e pinealectomizados, em tempos definidos após a pinealectomia ou operação fictícia, estão apresentadas no Gráfico 2, onde se observa menor espessura nos animais pinealectomizados após 60, 90 e 120 dias do ato cirúrgico, comparados aos animais do grupo controle.

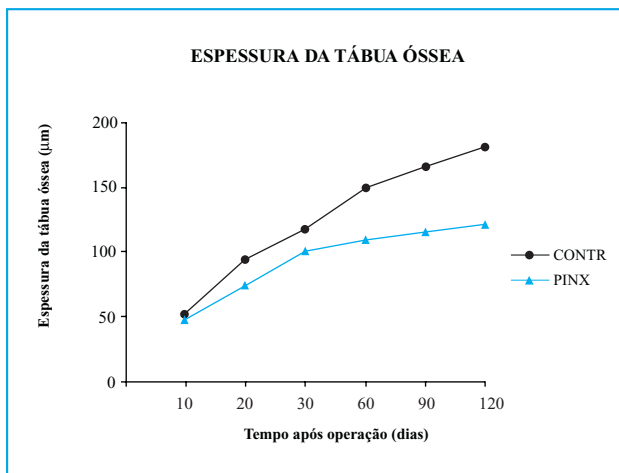


Gráfico 2 - Evolução da espessura da tábua óssea (mm) nos animais controle (CONTR) e pinealectomizados (PINX) (média ± desvio padrão da média), dos 10 aos 120 dias após o procedimento cirúrgico (*: diferente em relação aos animais controle; $p < 0,05$).

Espessura do disco epifisário

As medidas da espessura dos discos epifisários dos animais do grupo controle e pinealectomizados estão apresentadas no Gráfico 3, onde se observa menor espessura nos discos dos animais pinealectomizados após 90 e 120 dias da intervenção cirúrgica, comparados aos animais do grupo controle.

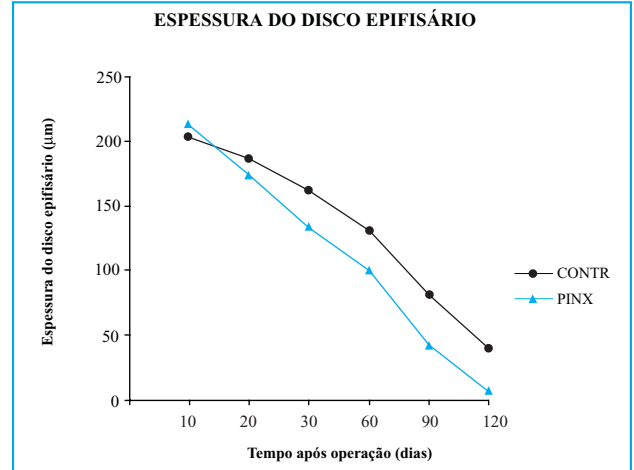


Gráfico 3 - Evolução da espessura do disco epifisário (mm) nos animais controle (CONTR) e pinealectomizados (PINX) (média ± desvio padrão da média), dos 10 aos 120 dias após o procedimento cirúrgico (*: diferente em relação aos animais controle; $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Os animais obtiveram pequeno aumento de peso entre o dia da operação (dia zero) e dez dias após. Esta fase é de crescimento bastante rápido nos animais. Entretanto, o fato de terem sido submetidos a um procedimento cirúrgico, associado à pequena idade dos animais, pode ter contribuído para um ganho menor do peso. A partir de 20 dias após a intervenção cirúrgica, até cerca de 90 dias, o peso aumentou rapidamente, tendendo a estabilizar-se após este período. Não foram observadas, nestes períodos, diferenças entre os animais do grupo controle e pinealectomizados.

Após 100 a 120 dias, os animais de ambos os grupos continuaram ganhando peso, sendo que, neste período, observou-se que os animais pinealectomizados ganharam peso com um ritmo maior que os animais do grupo controle. Esse fato pode ser devido à participação da melatonina no controle do peso corporal em animais adultos, especialmente influenciando o tecido adiposo, conforme descrito na literatura. A pinealectomia causa intolerância à glicose e menor resposta de adipócitos à insulina, podendo estar associado ao ganho de peso em ratos pinealectomizados¹⁴. Ratos considerados de meia idade, cuja secreção de melatonina tende a ser menor, tiveram redução da adiposidade visceral quando tratados com melatonina, que poderia atuar pela influência direta ou indireta sobre os adipócitos¹⁵.

As hipóteses para explicar o efeito da ausência da melatonina produzindo maior adiposidade poderiam incluir a perda do efeito termotrófico da melatonina¹⁶, ou ainda a maior atividade da lipoproteína lipase (enzima necessária à captura de ácidos graxos para o interior dos adipócitos) quando a temperatura corporal está um pouco abaixo do normal¹⁷.

Foi ainda demonstrado recentemente que a melatonina, juntamente com a insulina e a dexametasona, aumen-

tam a produção de leptina por adipócitos peri-epididí-mais de ratos *in vitro*¹⁸. Desse modo, seria possível supor que a ausência da melatonina pudesse reduzir a produção de leptina, o que produziria uma situação de maior ingestão alimentar e menor gasto, com conseqüente ganho de peso, visto que a leptina é um hormônio capaz de reduzir a ingestão alimentar e, ao mesmo tempo, ativar a lipólise⁷.

Nos animais estudados, não realizamos análise para diferenciar se o ganho de peso foi em decorrência de maior quantidade de tecido adiposo ou um ganho de peso por aumento proporcional dos diversos tecidos. Mas as informações da literatura permitem supor que o ganho de peso deve ter ocorrido basicamente pelo aumento da adiposidade.

As medidas do comprimento do animal, da pata e da tíbia foram realizadas para verificar a influência da ausência da melatonina sobre o crescimento ósseo. Caso a influência da pinealectomia fosse grande o suficiente para afetar a proliferação celular e a formação do material ósseo, poderíamos esperar que houvesse influência sobre o tamanho dos ossos longos (tíbia e alguns ossos da pata) e curtos (alguns ossos da pata e da coluna vertebral). Os resultados demonstraram não haver diferença significativa entre os comprimentos corporais dos animais, bem como do comprimento das patas e das tíbias dos animais pinealectomizados, comparados aos dos animais do grupo controle.

Quanto aos parâmetros estudados pela análise das lâminas de tíbias, verificamos redução da espessura da tábua óssea a partir de 60 dias e do disco epifisário a partir de 90 dias nos animais que sofreram a retirada da pineal, quando comparados aos animais do grupo controle. A menor espessura da tábua óssea nos animais pinealectomizados poderia ser devida a um efeito direto da melatonina sobre as células ósseas, ou ainda à interação da melatonina com outros hormônios e fatores de crescimento, influenciando indiretamente estas células^{5,9}.

É provável, portanto, que a ausência de melatonina, gerada pela pinealectomia, possa ter reduzido o estímulo para a produção de IGFs e PTH, com conseqüente menor atividade mitogênica de condrócitos, resultando numa menor espessura do disco de crescimento nos ratos, observáveis a partir de 90 dias após o procedimento cirúrgico.

CONCLUSÕES

Houve maior ganho de peso corporal após 100, 110 e 120 dias da retirada da pineal, que poderia ser devido a aumento da adiposidade pela maior captação de ácidos graxos por adipócitos e menor atividade termogênica, provocada pela ausência de melatonina e/ou redução da leptina.

A ausência da melatonina pela pinealectomia reduziu a espessura do disco epifisário medida após 90 e 120 dias e a espessura da tábua óssea medida após 60, 90 e 120 da intervenção cirúrgica. Estes efeitos poderiam ser decorrentes da falta de ação estimuladora da melatonina sobre

os condrócitos e/ou ainda menor ação de fatores estimuladores da mitogênese destas células, como IGFs, leptina e PTH, cuja secreção seria ativada em situação normal pela presença da melatonina.

Portanto, podemos concluir que a pineal, por meio da secreção da melatonina, influencia o desenvolvimento ósseo de ratos, afetando provavelmente condrócitos e osteoblastos de maneira direta e/ou indireta. Entretanto, maiores estudos devem ser realizados para esclarecer os mecanismos pelos quais esta influência se faz e suas possíveis implicações fisiológicas e patológicas.

ABSTRACT

Five days old Wistar male rats were either pinealectomized or submitted to a sham operation. The animals were followed up to 120 days after surgery, being weighed and measured every 10 days. Groups of animals were then sacrificed at 10, 20, 30, 60, 90, and 120 days after the surgery. Thicknesses of the bone board and the epiphyseal plate of the tibia were measured. **Results:** (1) The average weight of the pinealectomized animals was greater than that of the control animals between 100 and 120 days after surgery; (2) There was no difference between the groups in the lengths of the body and of the back paw of the animals; (3) The length of the tibia was the same in both groups but the thickness of bone board after 60, 90, and 120 days of the surgery and the thickness of the epiphysial plate after 90 and 120 days of the surgery were smaller in the pinealectomized animals when compared with the control groups. **Conclusion:** the pineal gland, through the secretion of melatonin, participates in the bone development in rats by unknown mechanisms.

Keywords: Melatonin; Pineal gland / growth & development; Bone development; Rats

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Bonjour JP, Ammann P, Chevalley T, Rizzoli R. Protein intake and bone growth. *Can J Appl Physiol* 2001; 26:153-66.
- 2- Whitfield JF, Morley P, Willick GE. Bone growth stimulators. New tools for treating bone loss and mending fractures. *Vitam Horm* 2002; 65:1-80.
- 3- Karsenty G. Bone formation and factors affecting this process. *Matrix Biol* 2000; 19:85-9.
- 4- Braddock M, Houston P, Campbell C, Ashcroft P. Born again bone: tissue engineering for bone repair. *News Physiol Sci* 2001; 16:208-13.
- 5- Ogawa T, Yamagiwa H, Hayami T, Liu Z, Huang KY, Tokunaga K et al. Human PTH(1-34) induces longitudinal bone growth in rats. *J Bone Miner Metabol* 2002; 20:83-90.

INFLUÊNCIA DA MELATONINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO
CORPORAL E ÓSSEO DE RATOS

- 6- Korf HW, Stehle JL. The pineal organ, its hormone melatonin and the photoneuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1998; 146:1-100.
- 7- Barzilai N, Wang J, Massilon D, Vuguin P, Hawkins M, Rossetti L. Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J Clin Invest* 1997; 100:3105-10.
- 8- Alonso R, Prieto L, Hernandez C, Mas M. Antiandrogenic effects of the pineal gland and melatonin in castrated and intact prepuberal male rats. *J Endocrinol* 1978; 79:77-83.
- 9- Vriend J, Sheppard MS, Bala RM. Melatonin increases serum insulin-like growth factor-I in male Syrian hamsters. *Endocrinology* 1988; 122:2558-61.
- 10- Machida M, Dubouset J, Imamura Y, Yamada T, Kimura J. Role of melatonin deficiency in the development of scoliosis in pinealectomised chickens. *J Bone Joint Surg* 1995; 77:134-8.
- 11- Sandyk R, Anastasiadis PG, Anninos PA, Tsagas N. Is postmenopausal osteoporosis related to pineal gland functions? *Intern J Neurosci* 1992; 62:215-25.
- 12- Roth JA, Kim BG, Wen-Lang L, Cho MII. Melatonin promotes osteoclast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 1999; 274:22041-7.
- 13- Phifer CB, Terry LM. Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents. *Physiol Behav* 1986; 38:887-90.
- 14- Lima FB, Machado UF, Bartol I. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Physiol* 1988; 275:934-41.
- 15- Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, Yellon SM, Matsumoto AM. Daily melatonin administration at middle age suppress male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology* 1999; 140:1009-12.
- 16- Padmavathamma K, Joshi BN. Thermotrophic effect of melatonin in adrenalectomized and thyroidectomized rats. *Biol Signals* 1994; 3:53-8.
- 17- Speake BK, Parkin SM, Robinson DS. Degradation of lipoprotein lipase in rat adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1985; 840:419-22.
- 18- Alonso MIC. A melatonina modifica a expressão gênica da leptina sob estimulação pela insulina em cultura primária de adipócitos. In: Resumos da XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE. Salvador, BA; 2002.