



Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>



Artigo de revisão

Ação da melatonina no tecido cartilaginoso

Priscila Rodrigues Armijo^a, Rejane Daniele Reginato^b, Carla Cristina Maganhin^a,
Luiz Fernando Portugal Fuchs^c, Ricardo Santos Simões^c, Edmund Chada Baracat^c
e José Maria Soares Júnior^{a,*}

^a Departamento de Ginecologia, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), São Paulo, SP, Brasil

^b Departamento de Morfologia, UNIFESP/EPM, São Paulo, SP, Brasil

^c Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 10 de abril de 2013

Aceito em 29 de abril de 2013

On-line em 21 de julho de 2013

Palavras-chave:

Melatonina

Glândula pineal

Cartilagem

Estresse oxidativo

Osteoartrite

R E S U M O

Os autores fazem uma revisão que mostra a ação da melatonina sobre o tecido cartilaginoso. Referem sua estrutura química, seu local de síntese, seus receptores e sua ação. Relatam que os níveis baixos da melatonina na menopausa poderiam ser um importante fator no desenvolvimento e na manutenção da osteoporose, visto que em ratas a sua reposição leva a um aumento da densidade mineral óssea e da espessura da cartilagem articular. Sugerem uma possível ação benéfica da melatonina na proteção das lesões da cartilagem articular, o que poderia estar relacionado ao bloqueio do estresse oxidativo, uma vez que produtos desse estresse, com resíduos de tirosina, são observados no tecido cartilaginoso com doenças de degradação articular. Sugerem que a melatonina aumenta a síntese de matriz cartilaginosa. Esses fatos indicam que a melatonina pode ser benéfica para o tecido cartilaginoso, uma vez que há uma redução da secreção do hormônio da melatonina, com o avançar da idade, o qual está relacionado ao aumento da incidência de osteoartrite.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](#)

The role of melatonin on cartilaginous tissue

A B S T R A C T

The authors write a review showing the action of melatonin on the cartilaginous tissue and relate its chemical structure, site of synthesis, and receptors. They report that low levels of melatonin in menopause may be an important factor in the pathogenesis of osteoporosis, since its replacement in rats leads to an increase in bone mineral density and the thickness of articular cartilage. It is also suggested a possible beneficial effect of melatonin in the prevention of articular cartilage lesions, which could be related to the blockade of oxidative stress, since products of this stress, in addition to tyrosine residues, are observed in the cartilage tissue degradation in joint diseases. Furthermore, it is related that melatonin

Keywords:

Melatonin

Pineal gland

Cartilage

Oxidative stress

Osteoarthritis

* Autor para correspondência.

E-mail: jsoares415@hotmail.com (J.M. Soares Júnior).

enhances cartilage matrix synthesis. These facts indicate that melatonin may be beneficial to the integrity of cartilaginous tissue, since there is a reduced secretion of melatonin with advancing age, which is related to increased incidence of osteoarthritis.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND

Introdução

A secreção de melatonina, principal hormônio secretado pela glândula pineal, desempenha papel fundamental no controle do ritmo circadiano,¹ na função reprodutiva,² na temperatura corporal,³ na atividade sexual,⁴ na imunomodulação^{5,6} e no envelhecimento.⁷ Algumas dessas ações estão diretamente relacionadas com o início e a manutenção do sono.¹ Além dessas funções já bem estabelecidas, alguns autores têm relacionado a melatonina a propriedades antioxidantes, ao crescimento fisiológico e ao processo inflamatório, assim como à maturação e remodelação dos tecidos de sustentação, uma vez que há um aumento da expressão nos níveis de mRNA de vários genes expressos nos osteoblastos, que incluem a fosfatase alcalina, a osteopontina e a osteocalcina.^{8,9}

Outro dado importante é que a menopausa está associada a uma redução substancial na secreção da melatonina¹⁰ e essa queda deve influenciar o metabolismo esquelético e levar à progressão da osteoporose e da lesão articular. Dessa forma, pode-se deduzir que os níveis plasmáticos de melatonina poderiam ser um fator importante no desenvolvimento, na manutenção e no estabelecimento de doenças osteoarticulares. Em consonância com esse pensamento, tem sido demonstrado que tratamentos com melatonina levam a um aumento da densidade mineral óssea em ratas ovariectomizadas.¹¹ Desse modo, a presente revisão tem por objetivo avaliar a ação da melatonina sobre o sistema esquelético, em especial do tecido cartilaginoso, pois o seu uso na pós-menopausa poderia prevenir lesões osteoarticulares, assim como auxiliar no processo de consolidação e remodelação de fraturas.

Histórico da melatonina

A melatonina foi descoberta, em 1958, pelo grupo de Aaron Lerner, na glândula pineal e posteriormente foi detectada também na retina (camada nuclear externa) e no apêndice vermiforme humano.^{12,13} Posteriormente sua presença foi confirmada pela imuno-histoquímica em todos os segmentos do trato gastrointestinal (TGI), pâncreas e sistema hepatobiliar.¹⁴ Deve ainda ser lembrado que a produção rítmica desse hormônio ocorre apenas na retina e na pineal.¹⁵ No intestino, a melatonina é produzida nas células enteroendócrinas da mucosa do trato gastrintestinal.¹⁶ As concentrações de melatonina no TGI são 10-100× maiores do que no plasma e a quantidade total de melatonina no TGI é em torno de 400× maior do que a quantidade de melatonina na pineal. A composição da melatonina intestinal é semelhante à presente na pineal e sua ação depende do órgão e da localização onde se encontra.¹⁷

Estrutura da melatonina e dos receptores

A melatonina é derivada do aminoácido triptofano. Sua síntese decorre da transformação do triptofano em serotonina, por intermédio da hidroxilação, pela enzima triptofano hidroxilase (TH), e da descarboxilação, pela 5-hidroxitriptofano descarboxilase (SHTDP). Em seguida, a serotonina é convertida em N-acetil-serotonina, pela N-acetiltransferase (NAT), a qual cataliza a transferência do grupo acetil para a serotonina a partir do acetil-CoA. A serotonina é convertida em melatonina pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT). O fator limitante na pineal é a enzima TH. A enzima HIOMT é o fator limitante na produção de melatonina.^{15,18}

A retina é estimulada pelos raios luminosos que apresentam comprimento de onda de 400-700 nm, de tal modo que, ao estimular os cones e bastonetes, desencadeiam estímulos nervosos que são enviados para o córtex visual e, através de uma rota alternativa, passam pelos núcleos supraquiasmáticos e pela região hipotalâmica. Desse modo dá-se a regulação da hipófise e da pineal com relação aos neuro-hormônios, que estão relacionados ao ciclo claro-escuro. As concentrações de cortisol, serotonina, ácido γ -aminobutírico e dopamina aumentam com a exposição à luz, enquanto que os níveis de norepinefrina, acetilcolina e melatonina decrescem. O pico da melatonina é aproximadamente às 3 h.¹⁹

A atividade da pineal diminui com a idade, por causa do aumento da densidade e da porcentagem de calcificação da glândula, o que sugere que uma série de eventos biológicos ligados ao envelhecimento pode estar relacionada com a diminuição da produção da melatonina.^{20,21}

Receptores de melatonina

Nos mamíferos, os principais receptores da melatonina, MT1 e MT2, são membros da subfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR) e estão presentes nos diversos órgãos do corpo. Esses dois receptores foram definidos como originais, com base na sua estrutura molecular e localização cromossômica (MT1 no 4q35.1 e MT2 no 11q21-22).^{13,22,23} Apresentam uma pequena sequência homóloga a outros receptores conhecidos e são caracterizados pela sua alta afinidade com a melatonina, além de estar acoplados negativamente à adenilato-ciclase.^{13,15,18} Tanto o MT1 quanto o MT2 têm uma estrutura cujo radical consiste de proteínas transmembranosas helicoidais que ultrapassam a membrana celular sete vezes, cujo radical amino está presente no lado extracelular e o carboxil no lado intracelular. Os receptores MT1 e MT2 codificam proteínas de 350 e 362 aminoácidos, respectivamente.²³

O subtipo MT1 é encontrado na retina, nos rins, no cérebro e especialmente no sistema nervoso central (SNC), local

onde possivelmente atua como supressor da estimulação neuronal. Outros papéis são atribuídos a esse receptor e incluem um efeito regulador sobre a vasoconstrição periférica.^{24,25} Já o subtipo MT2 é encontrado na retina, local onde desempenha papel fundamental, pois, além de atuar de modo a induzir vasodilatação, relaciona-se às oscilações no ciclo circadiano e inibe a liberação da dopamina. Sugere-se, também, que o MT2 influencie na regulação da temperatura corporal.^{13,24,25} Deve ser mencionado que os dois receptores são complementares em suas ações e podem até, em determinadas situações, se substituir. A expressão de MT1 já foi demonstrada em várias espécies, enquanto que a presença de MT2 é baseada em linhas celulares imortalizadas ou em experimentos antagonistas.²⁴

Outro sítio de ligação é o MT3, o qual mostra pouca afinidade pela melatonina. Esse sítio foi identificado e purificado em hamsters e descrito como um homólogo da enzima quinona redutase 2 (QR2) humana. Entretanto, apresenta uma forma totalmente diferente do MT1 e MT2, de maneira que não pode ser chamado de receptor propriamente dito.^{13,22,24}

Há também publicações que mostram que a melatonina é um ligante específico dos receptores pertencentes à superfamília dos receptores órfãos do ácido retinoico (RZR/ROR) no cérebro e que são classificados como receptores nucleares, embora sua afinidade com a melatonina seja menor.^{24,26}

O RZR/ROR é expresso em vários tecidos, como fígado, músculo liso, sangue periférico e testículos. Sua expressão já foi documentada em células como leucócitos, esplenócitos, tímócitos e células de Jurkat.^{24,26} O ROR parece estar envolvido com a imunomodulação, enquanto que o RZR é expresso no SNC, o que inclui a glândula pineal, além de mediar enzimas antioxidantes.²⁴

Apesar de ter uma sequência homóloga aos receptores retinoides, o RZR liga-se a seus elementos de resposta por meio de um monômero. Propõe-se que RZR e ROR são receptores nucleares para melatonina, estão envolvidos na regulação de transcrição de modulação de melatonina nos tecidos periféricos e podem controlar as ações de tal hormônio por meio de eventos regulatórios.²⁶

Uma vez que se acredita que esses receptores sejam fosfoproteínas, é razoável a ideia de que um dos mecanismos da ativação desses receptores seja a fosforilação de proteínas quinases ativadas por um sinal de transdução dos receptores ligados à membrana. Entretanto, há estudos que indicam que em determinados sistemas celulares a melatonina é capaz de reprimir a ação de RZR, o que indica que o efeito da melatonina na regulação da transcrição é revertido para o efeito de fosforilação e pode ser ainda mais importante para o aperfeiçoamento do sistema.²⁶

Melatonina e tecido cartilaginoso

O tecido cartilaginoso é uma forma especializada de tecido conjuntivo, o qual se desenvolve a partir do mesênquima. As células mesenquimais diferenciam-se em condroblastos e esses produzem fibrilas de colágeno e substância fundamental. São reguladores endógenos do desenvolvimento da condrogênese: as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), o

Fator de Crescimento β , assim como a família TGF- β , e outras moléculas sinalizadoras.^{27,28}

Além de oferecer suporte para os tecidos moles, absorver choques, facilitar o deslizamento dos ossos nas articulações e revestir superfícies articulares, o tecido cartilaginoso é fundamental para a formação e o crescimento dos ossos longos.²⁹⁻³¹

O tecido cartilaginoso é formado por poucas células e grande quantidade de matriz extracelular. O condrócito, sua célula principal, é responsável pela síntese e degradação da matriz extracelular, bem como pela manutenção de macromoléculas, como o colágeno tipo II, os proteoglicanos (PG) e as proteínas não colagenosas, e preservação do seu equilíbrio.^{27,28}

Os glicosaminoglicanos (GAGs), excetuando-se o ácido hialurônico, unidos a uma proteína central, formam os proteoglicanos, que são estruturas tridimensionais altamente hidratadas por uma espessa camada de água de solvatação que envolve a molécula. Os GAGs são formados por cadeias de carboidratos complexas caracterizadas por um alto teor de aminoaçúcares (açúcares contendo nitrogênio) e ácidos urônicos (açúcares contendo grupo carboxílico). Os GAGs podem ser sulfatados-condroitim sulfato, heparim sulfato, dermatam sulfato e heparina-ou carboxilados-ácido hialurônico.³²⁻³⁵ Os três tipos de proteoglicanos expressos pelos condrocitos e encontrados nas cartilagens hialinas são o agregam, o biglicam e o glicicam.³⁶

O condroitim sulfato pertence ao mesmo grupo do ácido hialurônico, do dermatam sulfato e do heparim sulfato. Tem uma cadeia longa, não ramificada, formada por repetições de estruturas residuais de ácido glucurônico e N-acetilgalactosamina usados na produção do PG.³⁷

Na cartilagem articular, o agregam atua na ligação das fibrilas de colágeno e limita o teor de água. A grande quantidade de condroitim sulfato no agregam dá maior resistência e elasticidade à cartilagem articular, principalmente durante tensões exacerbadas.³⁷

Além de ter a capacidade de reter a água no tecido, os GAGs têm múltiplas cargas negativas e atraem cátions, como Na^+ , que são osmoticamente ativos e fazem com que grande quantidade de água passe para o interior da matriz.^{32,37}

A alta viscosidade e as propriedades de baixa compressibilidade do proteoglicano o tornam ideal como um lubrificante comum. Ao mesmo tempo, sua rigidez fornece integridade estrutural às células e ainda oferece transporte entre as células, o que permite a migração celular. Assim, escassez da matriz cartilaginosa, como em culturas, induz à desordenação celular e diminuição na síntese do colágeno em relação à cartilagem em condições normais.³⁵

Na zona superficial da cartilagem articular é possível observar finas fibrilas de colágeno orientadas paralelamente à superfície articular, que fornecem uma qualidade biomecânica à cartilagem; na zona intermediária, as fibrilas são orientadas de maneira oblíqua quase aleatória e apresentam grande quantidade de proteoglicanos (PG). Já na zona profunda, as fibrilas de colágeno têm grande espessura, são bem unidas e orientadas verticalmente à superfície.^{34,38}

Os tipos de colágenos encontrados na cartilagem hialina são: tipo II-nas zonas de repouso e proliferativa do disco epifisário; tipo X-na zona hipertrófica; e tipos IX e XI, que unem as fibras colágenas do tipo II entre si.^{36,39-41} Sabe-se também

que no início da condrogênese o colágeno do tipo I está presente, no entanto torna-se indetectável durante a ossificação endocondral. Já o colágeno tipo II é substituído por colágeno tipo I e tipo X na zona hipertrófica.

O colágeno tipo II forma estruturas tridimensionais com os PG com o objetivo de facilitar a resistência à compressão.⁴² Assim, uma alteração nas moléculas ou na disposição de seus feixes pode ser altamente prejudicial ao funcionamento do tecido. Os condrócitos adaptam o metabolismo de acordo com a demanda mecânica do tecido.³⁴

Melatonina e estresse oxidativo

As articulações humanas são compostas por vários tecidos, como o cartilaginoso, o ósseo, a membrana sinovial e os ligamentos, os quais interagem entre si para permitir que as articulações funcionem relativamente bem durante muitos anos. Todos esses tecidos são importantes para a articulação e quando um começa a deteriorar-se, inevitavelmente afeta os outros.⁴³

Sabe-se que o estresse oxidativo pode levar a uma alteração fenotípica do condrócito, o que faz com que esse perca a sua capacidade de resposta efetora. Sabe-se, também, que produtos dessa peroxidação, com os resíduos de tirosina, são observados no tecido cartilaginoso em doenças relacionadas à degradação articular.⁴⁴

Os condrócitos expressam NADPH oxidase e óxido nítrico (NO), cujos produtos são espécies reativas de oxigênio (ROS) e ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$).⁴⁴ As espécies reativas de oxigênio regulam a atividade dos condrócitos, sua ativação celular e a proliferação e remodelação da matriz.⁴⁵

O NO é uma molécula instável por causa dos seus elétrons desparelhados. É formado por meio da conversão de L-arginina para citrulina, enquanto o oxigênio serve como receptor de elétrons. A remoção do terminal guanidina-nitrogênio é catalizada pela enzima oxidonitrossintase (NOS). A NOS existe em três isoformas: NOS1 (nNOS), NOS2 (iNOS) e NOS3 (eNOS). O NOS2 é o responsável pela formação de NO na cartilagem articular. Os efeitos destrutivos do NO estão ligados a sua combinação com o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Os radicais de elétrons desparelhados no NO e $O_2^{\cdot-}$ podem formar o peroxidonitrito ($ONOO^{\cdot-}$), um de seus produtos mais perigosos.⁴⁶

A produção de ROS induz dano em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos em mitocôndrias. Degrada o tecido por meio da clivagem do colágeno e do agregam e ativa também metaloproteases da matriz (MMP). Foi mostrado que a ROS, com inflamação crônica, promove estresse oxidativo em condrócitos e apresenta um impacto funcional em doenças de degradação da cartilagem articular.^{44,45}

A degradação do colágeno normalmente se dá pelas colagenases. Em adição, moléculas que medeiam a degradação da matriz, como as MMP-1, MMP-3, MMP-13 e ADAMTSs (metaloproteases plasmáticas clivadoras do fator de von Willebrand), são também *up-reguladas* durante um processo de degeneração da matriz cartilaginosa. Um aumento da carga mecânica, obesidade e esforço repetitivo, por exemplo, podem influenciar na alteração dessas proteínas.⁴²

O último passo da degradação do colágeno é mediado pela prolidase, uma exopeptidase citosólica. Essa enzima tem um importante papel na reciclagem da prolina dos imidodipeptídeos derivados da degradação do colágeno e de outras proteínas contendo-prolina da “renovação” do colágeno e do crescimento celular. A ativação dessa enzima está relacionada com a reciclagem da prolina. Radicais livres impedem a formação de fibrilas de colágeno. Há uma diminuição significativa na atividade da prolidase em pacientes com degradação do tecido, o que pode ser interpretado como uma evidência da diminuição da “remodelação” do colágeno.⁴⁷

Estudos sugerem que GAGs sulfatados, como o condroitim sulfato, induzem significativamente a produção de PG, por meio de um modelo estudado *in vivo* de osteoartrite desenvolvida espontaneamente em ratos e *in vitro* com condrócitos humanos, o que demonstra que, na cartilagem articular, o condroitim sulfato reduziu a apoptose desses condrócitos. Ele é capaz, também, de diminuir a ativação de MMP, além de atuar como um dos fatores que promovem o equilíbrio entre catabolismo e anabolismo da matriz extracelular. Outros estudos também relataram que a combinação de sulfato de glucosamina e condroitim sulfato foi mais eficaz na redução de fatores pró-inflamatórios.⁴⁸

As superoxidodismutases (SOD) têm como papel principal a regulação das funções do ROS. Tem três isoformas: SOD1 ou Cu/Zn-SOD presente no citosol; SOD2 ou Mn-SOD presente na mitocôndria; e SOD3 presente na superfície celular.⁴⁴ Durante o processo de degradação cartilaginosa, a SOD2 é *down-regulada* e a SOD3 diminui seus níveis séricos. A depleção da SOD2 nos condrócitos pode levar ao aumento de H_2O_2 , o que resulta na instabilidade telomérica e na *down-regulação* da função dos condrócitos, assim como no dano de macromoléculas, tais como o ácido hialurônico e o colágeno.⁴⁴

A melatonina surge como um mediador fundamental, uma vez que provoca *up-regulação* dos genes da SOD1, SOD2, catalase e da glutathione peroxidase (GPx). Aumenta ainda a expressão de marcadores condrogênicos, como o do colágeno II, do Sox 9 e do agregam. Assim, leva à diminuição da expressão do colágeno X, o que mostra que a melatonina aumenta a diferenciação condrogênica, embora retarde a osteogênica. Do que foi exposto sugere-se que a melatonina aumenta a síntese de matriz cartilaginosa.^{49,50}

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Bubenik GA, Konturek SJ. Melatonin and aging: prospects for human treatment. *J Physiol Pharmacol.* 2011;62(1):13-9.
2. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM. Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod.* 2009;81:445-56.
3. Fenn AM, Fonken LK, Nelson RJ. Sustained melatonin treatment blocks body mass, pelage, reproductive, and fever responses to short day lengths in female Siberian hamsters. *J Pineal Res.* 2011;51(2):180-6.

4. Drago F, Busa L. Acute low doses of melatonin restore full sexual activity in impotent male rats. *Brain Res.* 2000;878(1-2):98-104.
5. Ahmad R, Haldar C. Melatonin and androgen receptor expression interplay modulates cell-mediated immunity in tropical rodent *Funambulus pennanti*: an in-vivo and in-vitro study. *Scand J Immunol.* 2010;71(6):420-30.
6. Pedrosa AM, Weinlich R, Mognol GP, Robbs BK, Viola JP, Campa A, et al. Melatonin protects CD4+ T cells from activation-induced cell death by blocking NFAT-mediated CD95 ligand upregulation. *J Immunol.* 2010;184(7):3487-94.
7. Sandyk R. Possible role of pineal melatonin in the mechanisms of aging. *Int J Neurosci.* 1990;52(1-2):85-92.
8. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem.* 1999;274(31):22041-7.
9. Cutando A, Aneiros-Fernández J, Aneiros-Cachaza J, Arias-Santiago S. Melatonin and cancer: current knowledge and its application to oral cavity tumours. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(8):593-7.
10. Carranza-Lira S, López FG. Melatonin and climactery. *Med Sci Monit.* 2000;6(6):1209-12.
11. Uslu S, Uysal A, Oktem G, Yurtseven M, Tanyalçin T, Başdemir G. Constructive effect of exogenous melatonin against osteoporosis after ovariectomy in rats. *Anal Quant Cytol Histol.* 2007;29(5):317-25.
12. López-Muñoz F, Marín F, Álamo C. El devenir histórico de la glándula pineal: II. De sede del alma a órgano neuroendócrino. *Rev Neurol.* 2010;50(2):117-25.
13. Spadoni G, Bedini A, Rivara S, Mor M. Melatonin receptor agonists: new options for insomnia and depression treatment. *CNS. Neurosci Ther.* 2011;17(6):733-41.
14. Jaworek J. Ghrelin and melatonin in the regulation of pancreatic exocrine secretion and maintaining of integrity. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57 Suppl. 5:83-96.
15. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol.* 2004;25(3-4):177-95.
16. Bertrand PP, Bertrand RL, Camello PJ, Pozo MJ. Simultaneous measurement of serotonin and melatonin from the intestine of old mice: the effects of daily melatonin supplementation. *J Pineal Res.* 2010;49(1):23-34.
17. Bubenik NT. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59 Suppl 2:33-51, 33-51.
18. Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertil Steril.* 2009;92(1):328-43.
19. Cutolo M, Maestroni GJ, Otsa K, Aakre O, Villaggio B, Capellino S, et al. Circadian melatonin and cortisol levels in rheumatoid arthritis patients in winter time: a north and south Europe comparison. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(2):212-6.
20. Turgut M, Başaloğlu HK, Yenisey C, Ozsunar Y. Surgical pinealectomy accelerates intervertebral disc degeneration process in chicken. *Eur Spine J.* 2006;15(5):605-12.
21. Reiter JR, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol.* 2007;54(1):1-9.
22. Carocci A, Catalano A, Lovece A, Lentini G, Duranti A, Lucini V, et al. Design, synthesis, and pharmacological effects of structurally simple ligands for MT(1) and MT(2) melatonin receptors. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(17):6496-511.
23. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev.* 2010;62(3):343-80.
24. Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness, and more: occurrence, control mechanisms, actions, and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(13):2001-18.
25. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, et al. Melatonin signaling and cell protection function. *Faseb J.* 2010;24(10):3603-24.
26. Wiesenberger I, Missbach M, Kahlen JP, Schröder M, Carlberg C. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(3):327-33.
27. Qing C, Wei-ding C, Wei-min F. Co-culture of chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells in vitro enhances the expression of cartilaginous extracellular matrix components. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(4):303-10.
28. Mobasheri A. Role of chondrocyte death and hypocellularity in ageing human articular cartilage and the pathogenesis of osteoarthritis. *Med Hypotheses.* 2002;58(3):193-7.
29. Hughes RJ, Houlihan-Burne DG. Clinical and MRI considerations in sports-related knee joint cartilage injury and cartilage repair. *Semin Musculoskelet Radiol.* 2011;15(1):69-88.
30. Hui B. Sun Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Nov;1211:37-50.
31. Wu Q, Zhu M, Rosier RN, Zuscik MJ, O'Keefe RJ, Chen D. Beta-catenin, cartilage, and osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1192:344-50.
32. Miller KL, Clegg DO. Glucosamine and chondroitin sulfate. *Rheum Dis Clin North Am.* 2011;37(1):103-18.
33. Bolton MC, Dudhia J, Bayliss MT. Age-related changes in the synthesis of link protein and aggrecan in human articular cartilage: implications for aggregate stability. *Biochem J.* 1999;337 Pt 1:77-82.
34. Hardmeier R, Redl H, Marlovits S. Effects of mechanical loading on collagen propeptides processing in cartilage repair. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010;4(1):1-11.
35. Ab-Rahim S, Selvaratnam L, Kamarul T. The effect of TGF-beta1 and beta-estradiol on glycosaminoglycan and type II collagen distribution in articular chondrocyte cultures. *Cell Biol Int.* 2008;32(7):841-77.
36. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):332-6. Review.
37. Martel-Pelletier J, Kwan Tat S, Pelletier JP. Effects of chondroitin sulfate in the pathophysiology of the osteoarthritic joint: a narrative review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18 Suppl 1:S7-11.
38. Khoshgofar M, van Donkelaar CC, Ito K. Mechanical stimulation to stimulate formation of a physiological collagen architecture in tissue-engineered cartilage: a numerical study. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 2011;14(2):135-44.
39. Strauss EJ, Fonseca LE, Shah MR, Yorum T. Management of focal cartilage defects in the knee-Is ACI the answer? *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2011;69(1):63-72.
40. Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(5):216.
41. Sharawy M, Ali AM, Choi W. Experimental induction of anterior disk displacement of the rabbit craniomandibular joint: an immunoelectron microscopic study of collagen and proteoglycan occurrence in the condylar cartilage. *J Oral Pathol Med.* 2003;32(3):176-84.
42. Sofat N. Analysing the role of endogenous matrix molecules in the development of osteoarthritis. *Int J Exp Pathol.* 2009;90(5):463-79.

-
43. Burr DB. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12 Suppl A:S20–30.
 44. Scott JL, Gabrielides C, Davidson RK, Swingle TE, Clark IM, Wallis GA, et al. Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(8):1502–10.
 45. Grishko VI, Ho R, Wilson GL, Pearsall AW. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(1):107–13.
 46. Chen AF, Davies CM, Lin MD, Fermor B. Oxidative DNA damage in osteoarthritic porcine articular cartilage. *J Cell Physiol*. 2008;217(3):828–33.
 47. Altindag O, Erel O, Aksoy N, Selek S, Celik H, Karaoglanoglu M. Increased oxidative stress and its relation with collagen metabolism in knee osteoarthritis. *Rheumatol Int*. 2007;27(4):339–44.
 48. Yue J, Yang M, Yi S, Dong B, Li W, Yang Z, et al. Chondroitin sulfate and/or glucosamine hydrochloride for Kashin-Beck disease: a cluster-randomized, placebo-controlled study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(7):622–9.
 49. Pei M, He F, Wei L, Rawson A. Melatonin enhances cartilage matrix synthesis by porcine articular chondrocytes. *Pineal J Res*. 2009;46(2):181–7.
 50. Fischer TW, Slominski A, Zmijewski MA, Reiter RJ, Paus R. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. *Exp Dermatol*. 2008;17(9):713–30.