RONALDO MEIRA DE MELO

***EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA E DO TREINAMENTO
FÍSICO AERÓBIO SOBRE O PERFIL METABÓLICO DE RATOS DIABÉTICOS
INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

RONALDO MEIRA DE MELO

***EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA E DO TREINAMENTO
FÍSICO AERÓBIO SOBRE O PERFIL METABÓLICO DE RATOS DIABÉTICOS
INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador : Prof.Dr. José Cipolla Neto

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Melo, Ronaldo Meira de.

Efeitos da suplementação com melatonina e do treinamento físico sobre o perfil metabólico de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. / Ronaldo Meira de Melo. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Papel da glândula pineal e da melatonina na regulação do metabolismo energético.

Versão do título para o inglês: Effects of melatonin supplementation and physical training on metabolic profile in diabetic rats induced by streptozotocin.

1. Melatonina 2. Treinamento físico 3. Diabetes 4. Metabolismo Energético I. Neto, Prof. Dr. José Cipolla II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB062/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ronaldo Meira de Melo.

Título da Tese: Efeitos da suplementação com melatonina e do treinamento físico sobre o perfil metabólico de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

Orientador(a): Prof. Dr. José Cipolla Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2416 – CEP. 06508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob n° 79 nas fls. 09 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Prof. Dr. José Cipolla Neto, Coordenador da Linha de Pesquisa "***O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: interações hormonais, ações centrais e periféricas: pineal, obesidade, diabetes e envelhecimento***" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Sabrina Heloísa José dos Santos, Rodrigo Peliciari, Fernanda Gaspar do Amaral, Ana Lúcia Skorupa, Lillian C. Souza, Maria Isabel Cardoso Alonso-Vale, Cristina das Neves Borges Silva, Julie Takada, Sidney Barnabé Peres, Paula Mukai, Ronaldo Meira de Mello, Cecília Picinato, Thaís Martins de Lima.** Pesquisadores: **Fabio Bessa Lima, Silvana A Bordin da Silva, Carla Roberta O Carvalho, Ângela Rafael Carpinelli, Rui Curi, Antonio Carlos Cassola e Solange Castro Afeche** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **16.12.2004**.

São Paulo, 16 de dezembro de 2004.

Profa. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

Dedico

Ao Senhor Jesus Cristo por me conceder esta oportunidade, e me sustentar em todos os momentos difíceis;

A minha esposa Keli pelo amor, apoio e compreensão durante todos estes anos;

As minhas filhas, que são uma inspiração para vencer todos os obstáculos que a vida me proporciona;

Aos meus Pais que me ensinaram a trabalhar com humildade e perseverança;

Ao Prof.Dr. José Cipolla Neto, pela confiança, amizade e pelos preciosos conselhos;

Aos meus amigos de laboratório que sempre se mostraram solícitos em momentos de necessidade;

Agradecimentos

Tenho a plena convicção de que qualquer palavra usada neste momento não expressaria o sentimento de gratidão presente em meu coração.

Agradeço ao Senhor meu Deus por tudo o que Ele representa na minha vida, por tudo que o que Ele já fez e por tudo o que Ele ainda irá fazer.

Agradeço a minha família, em especial a minha esposa Keli, minhas filhas Raquel e Amanda, que são o bem mais precioso que possuo.

Agradeço ao Prof.Dr. José Cipolla Neto, que sempre se mostrou muito mais do que apenas um orientador, mas um verdadeiro mestre, educador e amigo.

Agradeço aos meus avós, meus pais, minha irmã, tios e tias, primos, sobrinhos, pela torcida e pelas palavras de encorajamento.

Agradeço aos meus amigos de ministério que sempre estiveram orando por mim, e me ajudaram a enfrentar as crises ministeriais e profissionais.

Agradeço a minha amiga Julieta Helena Scialfa, que sempre fez muito mais além do que lhe era pedido, com muito amor e carinho.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório (Rodrigo Garcia, Jéssica Andrade , Daniela Buonfiglio, Fernanda Amaral, Marco Taneda, Rafael Peres, Rafael Prévide, Ana Lopes, Caroline Mendes, Raphael Matos, Rosana Dantas, Lia Coelho, Daniel Simões, Paulo Moraes, Sandro Hirabara, Claudia Accioly, Maria Alice), que sempre se apresentaram como verdadeiros amigos em momentos de necessidade.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente participaram desta etapa da minha vida....

Muito Obrigado!!!

RESUMO

Melo RM. Efeitos da suplementação com melatonina e do treinamento físico aeróbio sobre o perfil metabólico de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012.

A prevalência do diabetes mellitus tem aumentado exponencialmente nas últimas décadas, o estilo de vida noturna e o avanço na idade estão envolvidos diretamente neste mecanismo, influenciando também a produção de melatonina pela glândula pineal que representa um importante sincronizador circadiano. A insulina e o exercício físico são os estimuladores fisiologicamente mais relevantes do transporte de glicose no músculo esquelético. Tem sido descrito na literatura que o animal pinealectomizado apresenta um quadro de resistência insulínica e redução na síntese de GLUT4. Além disso, esses animais são incapazes de apresentarem as adaptações metabólicas típicas do tecido adiposo e muscular frente ao treinamento físico aeróbio. Nossos resultados mostraram que na musculatura esquelética (sóleo), houve um aumento com relação à taxa de oxidação de glicose e síntese de glicogênio em todos os grupos treinados. No entanto, no grupo diabético observamos uma redução tanto na oxidação de glicose quanto na síntese de glicogênio, que foi corrigida de maneira eficaz pela suplementação com melatonina. Nossos dados corroboram com a literatura mostrando que o diabetes mellitus prejudica a sensibilidade da musculatura esquelética à ação da insulina, reduzindo a captação de glicose e a síntese de glicogênio. Tal evento, contudo, é corrigido pela suplementação diária com melatonina, que parece aumentar a expressão de GLUT4 e melhorar a fosforilação do substrato de receptor de insulina (IRS-1 e 2), assim como a atividade da fosfoinositol 3 – Kinase (PI3-K). Observamos um aumento da expressão de GLUT4, tanto no grupo treinado quanto no grupo suplementado com melatonina. O exercício físico melhorou a via de sinalização de insulina, aumentando a expressão total da proteína IRS-1 no grupo controle treinado. Até o presente momento a combinação destas, tem apresentado um efeito positivo do ponto de vista metabólico, e contribuído de maneira surpreendente e eficaz para melhora na qualidade de vida destes animais.

Palavras-chave: Melatonina. Treinamento físico. Diabetes. Metabolismo energético.

ABSTRACT

Melo RM. Effects of melatonin supplementation and physical training on metabolic profile in diabetic rats induced by streptozotocin. [Ph D. thesis (Human Physiology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012.

The prevalence of diabetes mellitus has increased in recent decades, the nocturnal lifestyle and advancing age are directly involved in this mechanism, influencing the production of melatonin by the pineal gland, an important circadian synchronizer. Insulin and exercise are the most physiologically relevant stimulators of glucose transport in skeletal muscle. It has been reported in the literature that the pinealectomized animal shows insulin resistance and reduced synthesis of GLUT4. Furthermore, in exercise situations, these animals are incapable of showing the typical metabolic adaptations of adipose tissue and skeletal muscle. Our results showed that in skeletal muscle (soleus) there was an increase in the rate of glucose oxidation and glycogen synthesis in all groups trained. However, the diabetic showed a reduction in glucose oxidation and in glycogen synthesis, but this deficit was corrected by supplementation with melatonin. Our data are consistent with the literature, showing that diabetes mellitus affects the sensitivity of skeletal muscle insulin action, reducing glucose uptake and glycogen synthesis. Nevertheless, this event is corrected by daily supplementation with melatonin, which seems to improve the phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS-1 e 2), and the activity of phosphoinositide 3-kinase (PI3-K). Physical training increased GLUT4 expression, and improved insulin signaling pathway, increasing the total expression of IRS-1 protein in the control group trained. Until the present time, the combination of these therapies have shown a positive effect on metabolism and contributed to an effective improvement in quality of life of these animals.

Key-words: Melatonin. Physical training. Diabetes. Energy metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Localização anatômica da glândula pineal de rato localizada na região epitalâmica.....	14
Figura 2 - Via bioquímica com os indóis precursores e o ponto de atuação de cada enzima na biossíntese de melatonina.....	15
Figura 3 - Via de sinalização da síntese de melatonina em roedores.....	16
Figura 4 - Representação esquemática da informação fotoperiódica transmitida pela síntese de melatonina.....	17
Figura 5 - Incidência mundial de diabetes mellitus tipo II.....	22
Figura 6 - Estrutura molecular da AMPK.....	29
Figura 7 – Avaliação do protocolo de treinamento.....	45
Figura 8 – Avaliação do peso corporal.....	47
Figura 9 – Avaliação do conteúdo de melatonina.....	49
Figura 10 – Avaliação da glicemia e insulinemia.....	50
Figura 11 – Avaliação da captação de glicose.....	51

Figura 12 – Avaliação da síntese de glicogênio muscular.....	53
Figura 13 – Avaliação do conteúdo de glicogênio muscular e hepático.....	55
Figura 14 - Avaliação do conteúdo total da proteína glut 4 no músculo sóleo.....	57
Figura 15 – Avaliação do conteúdo total da proteína AMPK no músculo sóleo.....	58
Figura 16 – Avaliação do conteúdo total da proteína IRS-1 no músculo sóleo.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Apresenta o delta de peso corporal, teste de
esforço máximo e citrato Síntase.....48

Tabela 2 - Apresenta os valores médios de captação de
glicose muscular (sóleo) basal e máxima.....52

Tabela 3 - Apresenta os valores médios de síntese de
glicogênio muscular (sóleo) basal e máxima.....54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Glândula Pineal e a Biossíntese de Melatonina	13
1.2 Ações da Melatonina no metabolismo Energético	19
1.3 Diabetes Mellitus	21
1.4 Indução do Diabetes por Estreptozotocina	25
1.5 Treinamento Físico Aeróbio	26
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Animais	34
3.2 Procedimento Experimental para Indução do Diabetes	34
3.3 Aferição da Glicemia	35
3.4 Determinação do Peso Corporal	35
3.5 Administração de Melatonina	35
3.6 Protocolo de Treinamento Físico	36
3.7 Sacrifício e Extração de Tecidos	37
3.8 Determinação da Glicemia	38
3.9 Determinação da Insulinemia	38
3.10 Determinação da Atividade da Citrato Sintase	39
3.11 Teste de Captação de 2-deoxi-[2,6- ³ H] - D-glicose, Síntese de [¹⁴ C]-glicogênio e oxidação de [U- ¹⁴ C]-D-glicose no Músculo Sóleo	40
3.12 Conteúdo de Glicogênio Hepático e Muscular	41
3.13 Extração das Proteínas Totais das amostras de Tecidos	42
3.14 Análise Protéica por Immunoblotting	42
3.15 Análise Estatística dos Resultados	43
4 RESULTADOS	45

4.1 Avaliação do Protocolo de Treinamento.....	45
4.2 Avaliação do Peso Corporal.....	47
4.3 Avaliação do Conteúdo de Melatonina.....	49
4.4 Avaliação da glicemia e Insulinemia.....	50
4.5 Avaliação da Captação de Glicose.....	51
4.6 Avaliação da síntese de glicogênio Muscular.....	53
4.7 Avaliação do Conteúdo de Glicogênio Muscular e Hepático.....	55
4.8 Avaliação do conteúdo Total da Proteína GLUT4 no músculo Sóleo.....	57
4.9 Avaliação do conteúdo Total da Proteína AMPK no músculo Sóleo.....	58
4.10 Avaliação do conteúdo Total da Proteína IRS-1 no músculo Sóleo.....	59
5 DISCUSSÃO.....	60
6 CONCLUSÃO.....	65
7 REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Glândula Pineal e a Biossíntese de Melatonina

Os sistemas biológicos respondem de forma integrada e, para tanto possuem sistemas especializados em manter esta integração (Berne, Levy, 2004). Considerando-se um organismo unicelular pode-se presumir que uma ação seja desencadeante da próxima, e assim, de uma forma simples e linear, os diferentes fenômenos ocorreriam de forma concatenada (Curtis, 1977; Fieri, et al, 1996). Um organismo pluricelular necessita de um sistema mais complexo que realize uma marcação interna do tempo, através de células cujo metabolismo oscila de forma rítmica e constante. Este sistema de controle do tempo é formado por um oscilador central, localizado nos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo (importante centro regulador das funções autonômicas), pela glândula pineal e pelo hormônio liberado por esta, chamado de melatonina. A glândula pineal, também denominada de órgão pineal, participa na organização temporal de ritmos biológicos, atuando como mediadora entre o ciclo claro/escuro ambiental e os processos fisiológicos regulatórios, incluindo a regulação endócrina da reprodução, a regulação dos ciclos de atividade-reposo e sono/vigília, assim como na regulação do sistema imunológico, entre outros (Cipolla Neto, Afeche, 1999). Representada por uma estrutura epitalâmica pequena e única, a glândula pineal esta situada dorsalmente à região caudal do diencéfalo. Deriva-se de células neuroectodérmicas e, semelhantemente às células da retina, desenvolve-se a partir de uma evaginação do teto da parede do terceiro ventrículo (Kappers et al., 1960). Nos roedores, a glândula pineal

apresenta três porções distintas (Figura 1), que formam o complexo pineal: pineal profunda, pedúnculo pineal e pineal superficial. A pineal profunda, ou lâmina intercalar, está localizada entre as comissuras posterior e habenular, delimitando uma região ventricular chamada de recesso pineal, e da sua porção dorsal emerge o pedúnculo pineal que se comunica com a pineal superficial. (Moller, 1992).

Figura 1. A figura apresenta a localização anatômica da glândula pineal de rato localizada na região epitalâmica, representada por três porções distintas: pineal superficial, pedúnculo pineal e pineal profunda.

Fonte: Modificado de Swanson, LW. 1998.

Este hormônio é sintetizado na glândula pineal, a partir do aminoácido triptofano, dando início à cadeia bioquímica da síntese de melatonina (Figura 2). O triptofano sofre ação da enzima triptofano-hidroxilase, sendo convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Este, sob ação da descarboxilase de aminoácidos aromáticos, é transformado em serotonina (5-HT). A serotonina é convertida em

N-acetilserotonina (NAS) pela ação da enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (NAT). A NAS é o-metilada pela enzima hidróxi-indol-O-metiltransferase (HIOMT) transformando-se em 5- metoxi-N-acetiltriptamina / melatonina (Cipolla - Neto, Afeche, 1999).

Figura 2. A figura apresenta a via bioquímica com os indóis precursores e o ponto de atuação de cada enzima na biossíntese de melatonina

Fonte: (Adaptado de Cipolla – Neto, Afeche, 2008).

A via para liberação de melatonina (Figura 3), inicia-se na retina que, através do trato retino-hipotalâmico, atinge regiões hipotalâmicas periquiasmáticas, como o núcleo supraquiasmático. As conexões entre este núcleo e a glândula pineal parecem envolver o núcleo paraventricular hipotalâmico e por último, a coluna intermédia lateral da medula torácica alta, de onde se originam neurônios pré-ganglionares simpáticos. Estes neurônios, por sua vez, se projetam para os gânglios cervicais superiores que, através dos ramos carotídeos internos e nervos conários, projetam-se para a glândula pineal (Cipolla – Neto, Afeche, 1999; Kappers, 1960; Reiter, et al, 1991).

Figura 3 - Representação esquemática da via de sinalização da síntese de melatonina em roedores.

O fotoestímulo é transmitido por células ganglionares específicas presentes na retina pela via de projeção retino hipotalâmica (RHP), incluindo os núcleos supraquiasmáticos (NSQs) presentes no hipotálamo (H), localizados acima do quiasma óptico (QO). Esses se comunicam com a glândula pineal por uma via que inclui os núcleos paraventriculares (PV), os neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermediolateral da medula espinal (IML) e gânglios cervicais superiores (GCS), de onde se originam os neurônios pós-ganglionares simpáticos que inervam a glândula pineal (P), através dos ramos carotídeos internos (RCI) e nervos conários (NC).

Fonte: (Adaptado de Cipolla – Neto, Afeche, 2008).

A produção de melatonina ocorre no período noturno variando circadianamente (ritmo com ciclo de 24 horas), apresentando dentro deste ritmo circadiano uma flutuação que pode variar em até 4 horas. De maneira interessante a biossíntese e secreção de melatonina também esta condicionada pelo tamanho deste período, representado pelo dia / noite, indicando que esta produção também é modulada pelas estações do ano de forma sazonal. Então podemos observar que a melatonina tem uma característica rítmica absolutamente fundamental e que a torna diferente dos outros hormônios (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática da informação fotoperiódica transmitida pela síntese de melatonina, mostrando suas variações circadiana (A) e sazonal (B)

Fonte: (Adaptado de Cipolla – Neto, Afeche, 2008).

A liberação de melatonina pela glândula pineal varia circadianamente, estando a produção noturna sob o controle simpático noradrenérgico, dependendo da ativação dos receptores α_1 e β_1 . A melatonina produzida é secretada na circulação sistêmica e, através do sangue, vai atingir os tecidos e líquidos corporais. No plasma, 20% da melatonina circulam em forma livre e os 80 % restantes se ligam à albumina, sendo metabolizada no fígado a um composto inativo, 6-hidroximelatonina, que logo se une ao ácido sulfúrico ou glucurônico, sendo eliminada pelo rim (Arendt, 1999; Reiter, 1991). A meia vida da melatonina circulante é de aproximadamente 20 minutos. As ações da melatonina podem ser mediadas por receptores específicos de membrana ou nucleares, ou ainda, por suas características especiais de difusibilidade pode se difundir facilmente, podendo agir diretamente no metabolismo celular (Reiter, 1991). A melatonina exerce seus efeitos nos diversos tecidos, agindo através de receptores de alta afinidade de membrana, tais como: MT1 e MT2, que possuem sete alças transmembrânicas e atuam em associação à proteína G_i expresso em mamíferos e em melanóforo de “Xenopus” (Braydon et al, 2001; Reppert, 1996; Sugden, 2000). Evidenciou-se também a existência de receptores nucleares para melatonina, pertencentes à categoria dos receptores órfãos tipo RZR-ROR, subtipos α e β . Estes receptores parecem estar ligados à expressão da enzima 5-lipoxigenase, a expressão das enzimas antioxidantes e a síntese de interleucina 2 (Carlberg et al, 1995). Estes receptores estão presentes em mais de 110 regiões cerebrais e estruturas periféricas, como baço, intestino, músculo liso, gônadas, entre outras (Vanecek, 1998). Experimentos *in vitro* demonstraram

que receptores de melatonina do tipo MT1 também estão presentes nas ilhotas pancreáticas, provavelmente nas células β (Peschke et al, 2002). Os receptores MT1, além de estarem ligados a proteína G_i promovendo uma redução na produção de AMPc (Morgan et al, 1994), possuem afinidade pela proteína Gq/11, podendo aumentar a produção de diacilglicerol e IP3, aumentando a concentração intracelular de cálcio e a atividade da PKC (Barrett et al, 1996). Segundo Reppert et al, (1995), através da redução de GMPc, o receptor MT2 parece estar ligado a dois mecanismos de transdução intracelular: 1) inibição da adenilato ciclase (dependente do componente α); 2) ativação da fosfolipase C (dependente do componente $\beta \gamma$). Podemos dizer que a pineal tem um papel mediador entre fenômenos cíclicos ambientais e processos regulatórios fisiológicos, tais como: regulação de fenômenos circadianos e sazonais associados à reprodução (Reiter, 1991); na termorregulação (Ralph, 1984); na regulação do sistema cardiovascular, em particular da pressão arterial (Mckinley, et al, 1990); na regulação de ciclos de atividade-reposo e vigília-sono; do sistema imunológico (Fraschini et al, 1990); na temporização do feto, gestação e parto; na regulação endócrina e no metabolismo de carboidratos (Diaz, 1986).

1.2 Ações da Melatonina no Metabolismo Energético

A relação funcional entre a glândula pineal e o metabolismo energético tem sido investigada há quase 20 anos. Os primeiros resultados de experimentos com adipócitos isolados de tecido adiposo branco, demonstraram que a incubação prévia destes adipócitos com melatonina promovia um aumento

da sensibilidade do tecido adiposo a ação da insulina (LIMA et al, 1994). Outro trabalho realizado com animais pinealectomizados, e que é considerado uma referência neste assunto, mostrou dentre outros resultados que os animais pinealectomizados apresentavam uma redução na captação de glicose pelo tecido adiposo independente da hora do dia, quando comparado com seu controle sham (Lima et al, 1998). Dados apresentados pelo mesmo grupo, mostraram uma redução no conteúdo total de Glut4 na musculatura esquelética, cardíaca e no tecido adiposo induzido pela pinealectomia (Seraphim et al, 1997). Em conjunto estes resultados mostraram pela primeira vez na literatura, que a pinealectomia leva a um quadro de resistência insulínica, e que este quadro se deve não a uma eventual alteração do receptor de insulina e seus primeiros passos de sinalização (fosforilação do IRS-1), mas, sim por uma queda considerável (+ 50%) da quantidade de transportadores Glut4 nos tecidos citados anteriormente. Neste mesmo período, outro trabalho utilizando ratos pinealectomizados, mostrou que a pinealectomia provocava uma queda no consumo de glicose e glutamina em células do sistema imune. Porém, a reposição terapêutica com melatonina foi capaz de reverter este quadro (Martins, 1998). A partir deste momento, novos experimentos começaram a ser realizados com o intuito de investigar de maneira sistemática, os mecanismos envolvidos neste quadro de resistência a insulina, e, a capacidade deste animal pinealectomizado de responder a uma situação de estresse, tais como, a restrição alimentar e o exercício físico. Outra pergunta importante a ser respondida, era, se a reposição terapêutica com melatonina revertia este quadro

metabólico geral do animal pinealectomizado. Um trabalho realizado por Zanqueta et al, (2003), confirmando dados anteriores, mostrou que a pinealectomia provocou um quadro de resistência insulínica (avaliada pelo ITT), e reduziu o conteúdo total de Glut4 (avaliado tanto pela quantidade de RNAm quanto de proteína). Porém, tanto a restrição calórica (40%), quanto a reposição diária noturna com melatonina foram eficientes em reverter o quadro metabólico induzido pela pinealectomia. Experimentos realizados nesta mesma linha de trabalho demonstraram que os animais pinealectomizados não conseguiam desenvolver as adaptações metabólicas induzidas pelo exercício físico (Borges - Silva et al, 2005a, 2005b, 2007). Porém, a reposição terapêutica com melatonina, reverteu este quadro induzido pela pinealectomia, devolvendo ao animal pinealectomizado, a capacidade de adaptação metabólica extremamente necessária para enfrentar condições estressantes tais como o exercício físico.

1.3 Diabetes Mellitus

A humanidade vive atualmente duas grandes transformações, ambas, com profundas implicações para o setor da saúde. A primeira é caracterizada pelo aumento no percentual da população de idosos, e, a segunda diz respeito ao crescente predomínio das doenças crônicas degenerativas não transmissíveis (hipertensão, obesidade, doença da artéria coronária e o diabetes mellitus), em relação às doenças contagiosas e parasitárias que, há cerca de três décadas, eram as principais causas de morte na população mundial (Smith, 2007). O diabetes mellitus, é considerado em todo o mundo, como um grande

problema de saúde pública. Pesquisas indicam que o número de 150 milhões de diabéticos no ano de 2000, irá dobrar nos próximos 25 anos (Amos et al, 1997; King et al, 1998; Mahan, Arlin, 1994; Zimmet et al, 2001). Sabe-se que o diabetes mellitus, compreende um grupo heterogêneo de desordens caracterizado por elevados níveis glicêmicos. A hiperglicemia crônica, anormalidade metabólica que diagnostica primariamente o diabetes está associado à disfunção a longo prazo com dano e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins e coração (Corigliano et al, 2006).

FIGURA 5. Incidência mundial de diabetes mellitus tipo II.

Fonte: (Hossain et al, 2007).

Segundo EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, (1997), Podemos classificar os

tipos de diabetes mellitus em quatro principais grupos: 1) diabetes mellitus insulino-dependente (IDDM); 2) diabetes mellitus não-insulino-dependente (NIDDM); 3) diabetes mellitus gestacional (GDM); 4) diabetes secundária a outras condições (Harris et al, 1998). O IDDM, também conhecido como infanto-juvenil, com início no crescimento, aparece freqüentemente em faixas etárias jovens, podendo também apresentar-se em faixas etárias mais avançadas (3-50 anos). É caracterizado tanto pela disfunção, quanto pela destruição das células betas pancreáticas (Kahn, 1993). Esse processo pode ser dividido em seis estágios: 1) suscetibilidade genética, 2) fatores precipitantes, 3) alterações imunológicas, 4) diminuição da secreção insulínica, 5) diabetes manifesto com secreção residual de insulina, 6) diabetes instável com insuficiência total da secreção insulínica (Tattersall, 1972). Embora a etiologia do IDDM seja extensamente estudada, os mecanismos precisos envolvidos na iniciação, progressão e destruição auto-imune das células beta não estão totalmente elucidados. Diversos fatores estão implicados, dentre esses: fatores genéticos, imunológicos e ambientais (Onengut-Gumuscu, 2002). O Desenvolvimento do IDDM ocorre na presença de alguns antígenos do sistema HLA, principalmente o DR3 e o DR4. Várias doenças endócrinas estão associadas ao sistema de histocompatibilidade humano (HLA), e, esta associação pode influenciar no surgimento, manifestações clínicas e evolução da doença. Segundo Nerup, (1984), Aproximadamente 95% dos pacientes com essa moléstia são DR3 e / ou DR4 positivos. Os danos causados às ilhotas por estes mecanismos auto-imunológicos, resultam em uma perda seletiva da resposta à glicose pelas

células β e conseqüente redução na produção de insulina. Este quadro clínico se manifesta através da: a) polidipsia, resultante da redução de água intracelular devido à hiperosmolaridade, e, aumento crescente da glicemia; b) poliúria, que é secundária à diurese osmótica pela glicosúria; c) polifagia, dependente do aumento acentuado do catabolismo de proteínas e lipídeos, e, intensificação da gliconeogênese; d) cetoacidose, por elevação dos ácidos graxos livres, cuja oxidação hepática resulta em corpos cetônicos no plasma, resultando na cetoacidose diabética (Wajchenberg, 1992).

A relação entre a secreção e a ação da insulina tem um papel fundamental na análise e compreensão dos estágios de progressão do IDDM. Em populações normais a resistência à insulina ocorre em 20-25% dos indivíduos (Geloneze, 2006). Segundo Carvalho, et al, (2006), a resistência à insulina pode estar presente por vários anos antes do aparecimento de alterações dos níveis plasmáticos de glicose. Os indivíduos que irão desenvolver diabetes apresentam deterioração progressiva da tolerância à glicose, progredindo de normoglicêmicos a intolerantes à glicose e finalmente diabéticos. A resistência a insulina em indivíduos com auto-imunidade contra as ilhotas, pode estar relacionada a fatores genéticos, constitucionais ou secundários ao próprio processo da doença auto-imune. Por outro lado, a resistência à insulina poderia refletir uma forma de doença auto-imune mediada, por fatores imuno-inflamatórios que também mediassem à destruição das células betas, tais como, o Fator de Necrose Tumoral α (TNF – α) e a Interleucina 6 (IL-6), que também

estão implicados em ambos os processos de auto imunidade e resistência à insulina (Hak, 2001; Katsuki, 1998).

1.4 Indução do Diabetes por Estreptozotocina

Muitos modelos experimentais em ratos já foram desenvolvidos utilizando variáveis como tipos de linhagem e drogas diabetogênicas administradas em diferentes doses com a finalidade de induzir o diabetes mellitus em diversas fases da vida destes animais. Entre os modelos mais estudados podemos citar o diabetes mellitus induzido pela administração de estreptozotocina (STZ). Em 1963, Rakietyen e colaboradores reportaram que a droga apresentava efeito diabetogênico, uma vez que a administração intravenosa levou a um quadro de diabetes franco em cães e ratos. A estreptozotocina (STZ) consiste de uma molécula de 2-deoxiglicose que tem metade da porção substituída na posição C-2 por uma nitrosouréia -2 – deoximetil-nitroureaglicopiranosose. É um antibiótico extraído da *Streptomyces acromogenes*, com peso molecular de 265 e fórmula empírica representada por $C_8H_{15}N_3O_7$. A substância também exerce atividade antitumoral na leucemia L5178 Y, carcinoma Ehrlich e carcinosarcoma de Walker 256 (Junod et al, 1967). Apesar do desconhecimento do mecanismo exato de sua toxicidade, esta droga parece causar a fragmentação do DNA e de proteínas através da formação de radicais livres alquilantes, que levam a uma redução nos níveis celulares de nucleotídeos e outros compostos, como NAD^+ , ocasionando a rápida necrose da célula β . Pela sua capacidade de produzir um efeito tóxico seletivo nas células β , a estreptozotocina tem sido amplamente

utilizada na indução de diabetes experimentais (NIELSEN et al, 1999; Rerup, 1970; Thulesen et al; 1997).

1.5 Treinamento Físico Aeróbio

Pesquisas recentes têm sugerido que em conjunto com os tratamentos clássicos, as terapias não farmacológicas (mudança no estilo de vida como, a redução ponderal; diminuição na ingestão de álcool; redução dos níveis de estresse e exercício físico), podem contribuir na prevenção e controle do diabetes mellitus (Mcardle et al, 2008). O treinamento físico aeróbio proporciona inúmeras adaptações agudas e crônicas sobre o sistema cardiovascular, hormonal e neural, com a finalidade de liberar oxigênio e combustíveis metabólicos para os grupos musculares em atividade, e, ao mesmo tempo, manter a distribuição destes substratos para os órgãos vitais (Short et al, 2003). Durante o exercício físico, os combustíveis metabólicos tornam-se disponíveis através de um sistema complexo, que envolve um rápido aumento na oxidação de glicose associada à rápida mobilização das reservas de glicogênio do próprio tecido, e das reservas de triacilgliceróis, estimuladas pela ativação do sistema nervoso simpático (Coyle, 2007). A glicose e os ácidos graxos, principais combustíveis metabólicos para o músculo, são liberados na circulação a partir do fígado e do tecido adiposo, respectivamente, e os aminoácidos encontram-se disponíveis através do aumento de sua liberação pelo músculo (Stellingwerff, 2007). A glicogenólise e gliconeogênese realizadas no fígado têm o intuito de manter a glicemia relativamente constante durante o exercício. A

gliconeogênese contribui com cerca de 25% na fase inicial do exercício (Felig, Wahren, 1975). O início do exercício também está associado à ativação da lipólise no tecido adiposo e a liberação de ácidos graxos livres e glicerol na circulação, sendo que as concentrações de ácidos graxos livres elevam-se e são captados e utilizados pelos músculos exercitados. Em repouso o músculo utiliza relativamente pouca glicose em torno de 10% para o fornecimento energético e 85% a 90% da oxidação de ácidos graxos e 1 a 2% dos aminoácidos (Ahlborg et al, 1974). A utilização de substratos energéticos pelo músculo durante o exercício físico varia de acordo com o tipo de atividade, intensidade e duração. Contudo, durante exercícios de alta intensidade 40% da energia provem da oxidação da glicose (Felig, Wahren, 1975). Na medida em que ocorre a depleção dos estoques de glicogênio muscular, a atividade da enzima lipase de lipoproteínas (LPL), localizada no endotélio capilar muscular, aumenta, elevando assim, em cerca de 50% a captação dos triglicerídeos plasmáticos por este tecido (Lithell et al, 1984). Com o aumento na captação de ácidos graxos pelo tecido muscular, esse passa, a preservar a utilização de glicose, e a obter energia para as suas necessidades metabólicas a partir dos ácidos graxos (Mcardle, 2008). De acordo com o descrito acima, observamos que o exercício físico altera o metabolismo de glicose e lipídios, de forma a manter o aporte de substratos energéticos necessários para os grupamentos musculares envolvidos nesta atividade. As fontes metabólicas utilizadas para fornecer energia para a contração muscular podem ser de origem exógena (dieta), como também de

origem endógena, através da glicogenólise, gliconeogênese e lipólise (Smith, 1991).

O aumento da atividade simpática que ocorre durante a execução do exercício físico estimula dentre outros, a secreção do hormônio glucagon pelas células α do pâncreas, com o intuito de manter a glicemia e o aporte de energia para os músculos envolvidos no exercício físico. Ao mesmo tempo, a atividade simpática também estimula a redução na secreção de insulina pelas células β do pâncreas. Esta redução na secreção de insulina não compromete a captação de glicose pelo tecido muscular exercitado, que agora tem a sua captação estimulada predominantemente pelo próprio trabalho muscular. O aumento do gasto energético pela musculatura esquelética em decorrência do exercício físico, promove o aumento intracelular da relação AMP: ATP, que por sua vez, estimula uma via extremamente importante para captação de glicose e manutenção de um estado estável durante esta condição, que é a via da adenosina monofosfato quinase – AMPK (Musi et al, 2001). Esta proteína quinase ativada por AMP (Figura 5), é formada por três subunidades (α , β e γ), sendo que cada uma delas introduz uma resposta específica tanto na estabilidade, quanto na atividade da AMPK. A subunidade catalítica α , possui duas isoformas ($\alpha 1$ e $\alpha 2$), enquanto que as duas subunidades regulatórias (β e γ), possuem as seguintes isoformas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$).

Figura 6 - Estrutura molecular da AMPK. Apresentando uma subunidade catalítica (α), e duas subunidades regulatórias (β e γ).

Fonte: (Adaptado de Ropelle et al, 2005).

Considerada pela literatura como um potente regulador do metabolismo energético e da expressão gênica no músculo esquelético, a AMPK é ativada pela fosforilação do resíduo de treonina - 172, localizado no sítio de ativação do domínio catalítico da subunidade α (Carling, 2004; Winder et al, 1999). A subunidade γ inclui quatro domínios particulares, nomeados como cistationina – beta - sintase (CBS), que confere a AMPK a habilidade de detectar a medida da relação de AMP : ATP. Os quatro domínios CBS criam dois sítios de ligação para o AMP. A ligação do AMP aos dois sítios de ligação, faz com que a subunidade γ sofra uma mudança conformacional com exposição do domínio catalítico encontrado na subunidade α . É apenas neste domínio catalítico que encontramos atividade da AMPK quando fosforilada. A fosforilação desta subunidade catalítica promove o agregamento de outra proteína chamada AMPK

quinase (AMPKK), que vai se ligar no aminoácido treonina – 172, que representa o local específico de ativação da AMPK (Jørgensen, et al, 2006). A AMPK fosforilada inativa as vias que vão consumir ATP e estimula as vias que corroboram para a sua produção, tais como a oxidação de ácidos graxos. Esta enzima foi descrita pela primeira vez em 1973, como uma proteína induzida por AMP que inativa as enzimas 3-hidroxi-3 metilglutaril COA redutase (HMG-COA redutase) e a acetil COA carboxilase – ACC, causando diminuição nos níveis intracelulares de malonil CoA, um inibidor da carnitina - acil - transferase I (Hardie, 2003). A AMPK além de estimular a oxidação de ácidos graxos, também parece estar envolvida na regulação da sensibilidade a insulina por estimular tanto a expressão gênica, quanto a translocação de GLUT4 para membrana celular (Jessen et al, 2003). Estas ações em conjunto promovem uma melhora da homeostase glicêmica tanto em indivíduos normoglicêmicos, quanto em indivíduos diabéticos, por reduzir dentre outros fatores a sobrecarga de trabalho imposta as células β do pâncreas. Segundo Ben-ezra et al, (1995) e Brambrink et al, (1997), o exercício físico é capaz de aumentar a sensibilidade e/ou a responsividade a insulina durante e após o exercício físico, tanto em indivíduos saudáveis, como em indivíduos resistentes a ação da insulina (Braun et al, 1995). Sabe-se que o transporte de glicose é o fator limitante na taxa de utilização desta molécula pelas células e o transportador de glicose GLUT4 é o maior mediador desta ação. Contudo o exercício físico também aumenta o transporte de glicose e a proteína GLUT4 em células adiposas (Hirshman, 1989; Stallknecht, 1993) e em músculo esquelético (Reynolds, 1997). O treinamento

físico potencia os efeitos do exercício físico sobre a sensibilidade insulínica, através de múltiplos fatores, incluindo aumento da massa muscular, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da capacidade das enzimas oxidativas mitocondrias e ativação do sistema de transporte de glicose (Koivisto et al, 1986). A insulina e o exercício físico são os estimuladores fisiologicamente mais relevantes do transporte de glicose no músculo esquelético (Ropelli, et al., 2005). Segundo Teran-Garcia et al, (2005), um dos principais efeitos do exercício físico pode ser o aumento da expressão de elementos intracelulares na via de sinalização da insulina. Observa-se que o exercício físico, potencializa o efeito da insulina na fosforilação do IRS-2 com conseqüente aumento da atividade da PI(3)K, aumentando a fosforilação em serina da AKT, proteína fundamental para iniciar a translocação do Glut₄ para a membrana citoplasmática (Luciano et al.,2002). Segundo O'donovan et al., (2005), estudos tem demonstrado que a resistência à insulina pode ser diminuída com a prática de exercícios físicos, independente da redução do peso e de mudanças na composição corporal. Estudos experimentais mostraram que o treinamento físico em ratos diabéticos foi eficiente em aumentar a fosforilação do receptor de insulina e da AKT, enfatizando a importância do exercício físico para melhora da captação de glicose, mediada por insulina (Howlet et al., 2002).

Considerando que pouco se sabe na literatura a respeito da ação combinada da melatonina / Treinamento físico / diabetes experimental. O presente estudo se propôs a investigar os efeitos da suplementação com

melatonina e do treinamento físico aeróbio, sobre o perfil metabólico de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos da suplementação com melatonina e do treinamento físico aeróbio sobre o perfil metabólico de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o metabolismo muscular através da captação de glicose e da incorporação de glicogênio na ausência e na presença de insulina.
- b) Dosar a concentração de melatonina na glândula Pineal em todos os grupos por HPLC;
- c) Utilizar as amostras de tecido muscular para avaliação do conteúdo de glicogênio muscular e hepático;
- d) Avaliar os efeitos da suplementação com melatonina e do treinamento físico aeróbio sobre a expressão protéica, e, o grau de fosforilação de proteínas envolvidas na sinalização do receptor de insulina na musculatura esquelética (sóleo).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os animais utilizados para experimentação foram ratos albinos machos da linhagem Wistar, com peso entre 180 e 250g. Estes animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), em caixas coletivas (46 x 24 x 20 cm, com 4 animais / gaiola), sob condições de temperatura ambiental controlada de 25 °C e ciclo invertido de iluminação claro / escuro 12 / 12h (período claro iniciando às 18:00 h). Os animais foram divididos em 06 grupos distintos: 1) ratos controles sedentários (CS); 2) ratos controle treinado (CT); 3) ratos diabéticos sedentários (DS); 4) ratos diabéticos treinados (DT); 5) ratos diabéticos suplementados sedentários (DSS); 6) ratos diabéticos suplementados treinados (DST). Todos os animais receberam ração balanceada padrão (Nuvital®) e água '*ad libitum*'.

3.2 Procedimento Experimental para Indução do Diabetes

Os animais foram pesados e a glicemia foi aferida antes do início de cada experimento. A estreptozotocina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foi preparada em tampão citrato de sódio (NaCl 0,9g, H₂O destilada 100ml, citrato de sódio 294mg) 10mM, pH 4,5 e injetada intraperitonealmente (IP). A estreptozotocina foi injetada na concentração de 60 mg/kg de tal forma calculada que nenhum animal recebeu mais do que 580µl de solução injetada IP.

Os animais do grupo controle receberam intraperitonealmente somente o veículo (tampão citrato de sódio) de acordo com seu peso.

3.3 Aferição da Glicemia

O procedimento para aferição da glicemia consistiu em obter uma pequena amostra de sangue da ponta do rabo dos animais, e pingá-la na tira reagente (Optium Blood Glucose Test Strips, Medisense[®], United Kingdom) conectada ao glicosímetro Optium Xceed[®] (Medisense[®], United Kingdom) que afere a glicemia após 5 segundos de análise. O aparelho foi previamente calibrado de acordo com as instruções do fabricante e a cada troca de lote de tiras reagentes.

3.4 Determinação do Peso Corporal

Os ratos foram pesados em balança de prato (0 a 5 Kg, Filizola) semanalmente, durante todo o período experimental e no momento dos experimentos.

3.5 Administração de Melatonina

Durante uma semana, os animais mantidos em gaiolas individualizadas receberam quantidades conhecidas de água, medindo-se no início do período claro o conteúdo que foi consumido durante todo o período escuro. À partir dos dados coletados, foi feita uma média do consumo de água para cada animal.

Os animais receberam a melatonina administrada por via oral solubilizada na água que o animal consumiu durante o período escuro, na dosagem de 1mg de melatonina / kg de peso corporal. A melatonina foi inicialmente diluída em 400 µl de etanol absoluto, adicionando 960 µl de água para um volume final de 1 ml. Após este procedimento, a melatonina preparada foi solubilizada na água dos bebedouros, seguindo rigorosamente a proporção citada acima. Durante o período claro, os animais receberam uma solução veículo preparada com 40 µl de etanol absoluto dissolvido em 100 ml de água.

3.6 Protocolo de Treinamento Físico

O treinamento físico dos animais teve a duração de 05 semanas e foi realizado em esteira ergométrica programável (KT 3000, INBRAMED), adaptada para ratos. A esteira é constituída de 08 raia de acrílico transparente, pintadas em sua extremidade dianteira de preto, criando um ambiente mais escuro para o qual os ratos são atraídos durante as sessões de treinamento. Antes de começar o período de treinamento, os ratos foram adaptados na esteira durante uma semana (5 minutos por dia, nas velocidades baixas de 0,3 e 0,4 Km/h). Esta adaptação associada a uma criteriosa seleção dos animais facilitou a corrida dos ratos sem a necessidade do uso de choques elétricos. Após a adaptação os ratos foram designados aos grupos treinados (T) ou sedentários (S). Os ratos controles foram mantidos sedentários por igual período de tempo. A intensidade do treinamento correspondeu à aproximadamente 50-60% do consumo máximo de oxigênio.

Ilustração esquemática do protocolo utilizado mostrando os aumentos graduais de intensidade do treinamento.

1	2	3	4	5
Semana				
0,5	0,7	0,8		1,0
Velocidade (Km / h)				
15	30	40		60
Tempo (min)				

3.7 Sacrifício e Extração dos Tecidos

Ao final do protocolo, os ratos, em jejum prévio de 12 horas, foram sacrificados às 12:00 h (ZT16) por decapitação, seguida de coleta de sangue (aproximadamente 3 mL) em tubos heparinizados para posterior análise da glicemia e do hormônio insulina. O plasma, obtido mediante centrifugação refrigerada a 4 °C a 2000 rpm durante 10 minutos, foi armazenado em freezer apropriado para posterior execução das dosagens. Após a coleta de sangue, os tecidos foram extraídos para estudos e testes biológicos. Foram retiradas amostras da musculatura esquelética (sóleo), e do fígado (lóbulo superior direito), para posterior análise.

3.8 Determinação da Glicemia

A glicose plasmática foi determinada através de método enzimático da glicose-oxidase (Lott, Turner, 1975). Este método consiste na oxidação enzimática da glicose através da glicose-oxidase (GOD) gerando ácido glucônico e água oxigenada. Esta, em presença de peroxidase (POD), dá origem a um cromógeno com o máximo de absorção em 505 nm de comprimento de onda, a partir da ligação oxidativa do fenol com a 4-aminoantipirina (4-AAP). No ensaio, 10 µL da amostra ou padrão (100 mg/dL), foram adicionadas a 1 mL de reagente de cor (pH 7,4, fenol e GOD/POD) e, em seguida, submetidas à incubação em banho-maria a 37°C durante 15 minutos para a formação do composto a ser lido em espectrofotômetro de absorbância em 505 nm.

3.9 Determinação da Insulinemia

O método radioimunológico (RIE), utilizado baseia-se na técnica de Desbuquois et al (1971), que consiste na reação de competição entre dois antígenos (insulina fria e insulina marcada) para se ligar a um anticorpo específico para ratos. Como esta reação obedece à lei de ação de massas, a insulina fria apresenta maior afinidade para se ligar ao anticorpo quando em

maior concentração, e, portanto, haverá inevitável queda na formação do complexo insulina marcada-anticorpo.

3.10 Determinação da Atividade da Citrato Sintase

A atividade desta enzima foi determinada através da formação do complexo DTNB-CoA, conforme método descrito por ALP e colaboradores (1976). Este método se baseia na propriedade da citrato sintase em catalizar a entrada de carbono no ciclo de Krebs, onde a reação entre a acetil-CoA e o oxaloacetato forma citrato e CoA. Esta, por sua vez, é complexada com DTNB, adicionado ao meio, formando o complexo DTNB-CoA.

O tampão de extração (pH 7,4) consiste em Tris/HCl 50 mM e EDTA 1 mM. O tampão de ensaio pH 8,2 consiste de Tris/aminometano 100mM, DTNB 0,2 mM, acetil-CoA 0,1 mM, Triton X-100 0,05% (v/v) e o homogenizado. A adição de 50 μ L de oxaloacetato (10mM) ao meio foi o ponto de partida para o início da reação.

3.11 Teste de Captação de 2-deoxi-[2,6-³H] - D-glicose, Síntese de [¹⁴C]-glicogênio e oxidação de [U-¹⁴C]-D-glicose no Músculo Sóleo

O músculo sóleo foi isolado e incubado como descrito por Crettaz et al, (1980); Challiss et al, (1983) e Hirabara et al, (2003). Os animais foram ortotomizados por decaptação, o músculo sóleo foi cuidadosa e rapidamente isolado, divididos longitudinalmente em tiras pesando entre 25-35 mg e pré – incubados em tampão bicarbonato de Krebs-Ringer contendo 5,6 mM de glicose, pH 7,4 por 30 min em banho aquecido a 37 °C, 95% O₂ e 5% CO₂, com agitação contínua (100 oscilações por min). Após este período, o músculo foi transferido para outro frasco contendo o mesmo tampão, porém acrescido de 0,2 µCi/ml de 2-deoxi-[2,6-³H] -D-glicose, 0,3 µCi/ml de [U-¹⁴C]-D-glicose. Feniletilamina (0,4 ml), diluída em metanol (1:1, v/v), foi adicionada em compartimento separado para adsorção do ¹⁴CO₂. O músculo foi incubado por 1 hora, nas mesmas condições. Ao final dessa incubação, os músculos foram brevemente lavados em salina (0,9% de NaCl) a 4 ° C, congelados em nitrogênio líquido, pesados e digeridos em KOH a 1M, a 70 °C, por 20 min. Captação de 2-deoxi-[2,6-³H]-D-glicose, síntese de [¹⁴C]- glicogênio e oxidação de [U-¹⁴C]-D-glicose foram determinados segundo os métodos descritos por Challiss et al, (1986), Espinal et al, (1983), e Leighton et al, (1985), respectivamente.

3.12 Conteúdo de Glicogênio hepático e Muscular

A dosagem foi determinada a partir do método de Leveille, Chakrabarty, (1967). Amostras de fígado e do músculo sóleo (500mg), foram suspensas em 3ml de tampão de extração (1:6), contendo NaF 50mM; EDTA 5mM; glicerol 60% e água deionizada, pH 6,5. O material foi homogenizado por 30 segundos e transferido 500 μ l do homogenato para o tubo cônico de 15ml contendo 2 ml de solução de KOH 30%. Em seguida, o tubo foi mergulhado em banho Maria por uma hora. Feita a digestão do tecido, acrescentou-se 200 μ l da solução saturada de Na₂SO₄ e o glicogênio foi precipitado em etanol (1 ml de solução / 2,5 ml de etanol) até atingir a concentração de 66%. O tubo foi agitado em vórtex e colocado em banho Maria (água fervente) e, assim que observado o início da formação de bolhas, foi retirado do banho. Este procedimento de formação de bolhas foi repetido de 2 a 3 vezes. Após esta etapa, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm durante 15 minutos. A formação de um precipitado sob a forma de flocos insolúveis foi então isolada e resuspensa em 2 ml de água fervente e acrescentou-se 5 ml de etanol, voltando para o banho Maria e aguardando a formação de bolhas novamente. Observamos novamente a formação de um precipitado e foi acrescentado 2 ml de HCL 1N fervente e a suspensão foi mantida em um banho Maria durante uma hora para possibilitar a hidrólise do glicogênio. Em seguida, a solução foi neutralizada com uma solução

de NaOH 1N e submetida a dosagem de glicose através do método descrito anteriormente.

3.13 Extração das Proteínas Totais das Amostras de Tecidos

As amostras de tecidos, foram homogeneizadas com sonificador em 150 µl de tampão de extração constituído de Triton-X 100 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml. Os extratos foram centrifugados a 12000 rpm a 4°C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação os sobrenadantes das amostras tiveram o seu conteúdo protéico quantificado utilizando o reagente de Bradford (BioRad) e dois caminhos possíveis: 1) tratados com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 5:1 (V:V) e 50 a 100µg de proteína total foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida; ou 2) utilizados para imunoprecipitação com anticorpos específicos e proteína A Sepharose 6MB. Os imunoprecipitados foram tratados com tampão de Laemmli contendo DTT 100mM e aquecidos em água fervente por 4 minutos e subseqüentemente submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8% e 6,5%) no aparelho para minigel (*Mini-Protean*). Em cada gel houve como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos.

3.14 Análise Protéica por *Immunoblotting*

A transferência das proteínas separadas no gel será feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da *Bio-Rad* por 2 horas a 120 V, como descrito por Towbin e colaboradores, (1979). Porém no tampão será acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose será diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) a 4 °C durante a noite. Estas membranas serão então incubadas com anticorpos específicos em solução bloqueadora (com 3% de BSA ao invés de leite) por 4 horas a temperatura ambiente e em seguida lavada com esta mesma solução sem leite ou BSA, por 30 minutos. Em seguida, estas membranas serão então incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente e solução para detecção por quimioluminescência como descrito no protocolo do *kit*. As intensidades das bandas nas auto-radiografias reveladas foram determinadas através da leitura por densitometria óptica das imagens escaneadas utilizando um *scanner* (HP 3400) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation).

3.15 Análise Estatística

A avaliação estatística dos resultados será realizada pelo teste “two-way analysis of variance” (ANOVA, pós-teste Bonferroni), prefixando-se o nível de

significância em 95% ($p < 0,05$). Os testes estatísticos serão realizados mediante o programa GraphPad Prism, v.3.02.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação do Protocolo de Treinamento

Figura 7 - Teste de velocidade máxima (A), e, atividade da citrato sintase (B);

Após cinco semanas de treinamento físico e / ou sedentarismo, em ratos controle sedentário e treinado (CS, CT), diabéticos sedentários e treinados (DS, DT), diabéticos sedentários e treinados com melatonina (DSM, DTM). Valores representam a média $\pm$ erro padrão.

Os animais controles e diabéticos submetidos ao protocolo experimental foram avaliados pré e pós cinco semanas de exercício físico e / ou sedentarismo. Observamos que ao término do protocolo experimental todos os

animais treinados tiveram uma melhora no seu desempenho físico em relação ao seu controle sedentário. A avaliação da eficácia do treinamento físico foi realizada através do teste de esforço máximo em esteira rolante e da atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo sóleo (Figura 7).

4.2 Avaliação do Peso Corporal

FIGURA 8 - Comportamento ponderal (A), e, avaliação do delta de peso (B);

A

B

Após quatro semanas de treinamento físico e / ou sedentarismo, em ratos controle sedentário e treinado (CS, CT), diabéticos sedentários e treinados (DS, DT), diabéticos sedentários e treinado com melatonina (DSM, DTM). Valores representam a média $\pm$ erro padrão.

Durante as cinco semanas do protocolo experimental, tanto os animais sedentários quanto os animais treinados ganharam peso de maneira uniforme, não apresentando diferença significativa ao final das cinco semanas. Por outro

lado, os animais diabéticos sedentários, tiveram uma redução significativa do peso corporal, que foi atenuada tanto pelo treinamento físico, quanto, pela suplementação com melatonina.

TABELA 1 – Apresenta o delta de peso corporal, teste de esforço máximo e citrato Síntase dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético com melatonina (DM) ao final do protocolo de treinamento (T) e sedentarismo (S).

Variáveis	CS	CT	DS	DT	DSM	DTM
Peso (g)	+112 ± 8	+111 ± 9	- 41 ± 9	+33 ± 16	+38 ± 18	+32 ± 12
Δ	#	#	*	*#	*#	*#
Teste máximo (Km/h)	0,8 ± 0,04	2,3 ± 0,02	0,7 ± 0,03	1,6 ± 0,05	0,7 ± 0,03	1,8 ± 0,04
		*#		*#		*#
Citrato sintase (μmol/ml/mg)	0,6 ± 0,03	1 ± 0,09	0,7 ± 0,05	0,9 ± 0,08	0,6 ± 0,03	0,9 ± 0,07
		*#		*#		*#

*Significâncias: *vs CS; # vs DS (p< 0,05).*

No início dos protocolos de treinamento ou sedentarismo os 06 grupos apresentaram peso corporal semelhante. Durante as 05 semanas de protocolo, houve ganho ponderal em todos os grupos, exceto no grupo diabético sedentário ($\Delta = - 41 \pm 9g$, quando comparado ao grupo controle sedentário, Tabela 1). Após a realização do teste de esforço máximo, observamos que todos os grupos submetidos ao treinamento físico tiveram um ganho na sua capacidade física. Estes resultados foram corroborados pelo aumento da atividade da citrato sintase verificada em todos os grupos treinados em relação ao seu controle sedentário.

4.3 Avaliação do conteúdo de Melatonina

FIGURA 9 - Conteúdo de melatonina após cinco semanas de protocolo experimental;

Ratos controle sedentário e treinado (CS, CT), diabéticos sedentários e treinados (DS, DT), diabéticos sedentários e treinados com melatonina (DSM, DTM). Valores representam a média $\pm$ erro padrão. *Significâncias: *vs CS; # vs DS ($p < 0,05$)*

Na Figura 3, observamos que ao final das cinco semanas experimentais ocorreu um aumento na síntese e secreção de melatonina no grupo controle provocada pelo treinamento físico, em relação ao seu controle sedentário. O quadro diabético induziu redução da síntese e secreção de melatonina, que também foi corrigida pelo treinamento físico. O tratamento com melatonina não foi eficaz na recuperação da capacidade pineal de produção de melatonina a níveis dos animais controles treinados.

4.4 Avaliação da Glicemia e Insulinemia

FIGURA 10 – Avaliação da Insulinemia (A), e da glicemia (B);

Após cinco semanas de treinamento físico e / ou sedentarismo, em ratos controle sedentário e treinado (CS, CT), diabéticos sedentários e treinados (DS, DT), diabéticos sedentários e treinados com melatonina (DSM, DTM). Valores representam a média $\pm$ erro padrão. *Significâncias: *vs CS; # vs DS ($p < 0,05$).*

Na Figura 4, os níveis de insulina e glicemia demonstraram a eficácia da estreptozotocina em estabelecer um quadro diabético em relação aos animais controle. Ao final das cinco semanas de sedentarismo e/ou treinamento físico, observamos (A), uma redução nos níveis de secreção de insulina no grupo treinado em relação ao seu grupo controle sedentário. Observamos também (B) que tanto a suplementação com melatonina quanto o treinamento físico foram

eficazes em reduzir nestes grupos os níveis glicêmicos em relação ao seu controle diabético sedentário.

4.5 Avaliação da Captação de Glicose

FIGURA 11 - Taxa de captação de glicose muscular basal (branco), e máxima (preto);

Após cinco semanas de treinamento físico e / ou sedentarismo, no músculo sóleo de ratos controle sedentário e treinado (CS, CT), diabéticos sedentários e treinados (DS, DT), diabéticos sedentários e treinados com melatonina (DSM, DTM). Valores representam a média $\pm$ erro padrão.

Na Figura 5, observamos o efeito do diabetes reduzindo a taxa basal de captação de glicose em relação ao seu grupo controle sedentário, que foi corrigida de maneira eficaz tanto pela suplementação com melatonina, quanto pelo treinamento físico. A taxa de captação máxima de glicose estimulada pela insulina, também foi comprometida pelo quadro de diabetes em relação ao seu controle sedentário, porém, tanto a suplementação com melatonina quanto o treinamento físico foram eficazes em normalizar esta captação ao final das cinco semanas do protocolo experimental.

TABELA 2 – Apresenta os valores médios de captação de glicose muscular (sóleo) basal e máxima, após cinco semanas de treinamento físico ou sedentarismo.

Grupo	CS	CT	DS	DT	DSM	DTM
Captação basal ($\mu\text{mol/g}$ tecido)	$2,4 \pm 0,2$	$3 \pm 0,2$ *#	$1,5 \pm 0,2$ *	$2,7 \pm 0,1$ #	$2,8 \pm 0,2$ #	$3,1 \pm 0,2$ *#
Captação máxima ($\mu\text{mol/g}$ tecido)	$5,9 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,3$ *#	$4 \pm 0,4$ *	$6,5 \pm 0,3$ #	$7,2 \pm 0,2$ *#	$7,3 \pm 0,3$ *#

Significâncias: *vs CS; # vs DS ($p < 0,05$).

4.6 Avaliação da Síntese de Glicogênio Muscular

FIGURA 12 - Síntese de glicogênio muscular basal (branco), e máxima (preto);

Após cinco semanas de treinamento físico e / ou sedentarismo, no músculo sóleo de ratos controle sedentário e treinado (CS, CT), diabéticos sedentários e treinados (DS, DT), diabéticos sedentários e treinados com melatonina (DSM, DTM). Valores representam a média $\pm$ erro padrão.

Na Figura 6, observamos que a suplementação com melatonina, e o treinamento físico, foram eficientes em aumentar a síntese de glicogênio basal em relação ao grupo controle sedentário. Porém, tanto a síntese de glicogênio basal quanto a estimulada pela insulina foram comprometidas pelo quadro de diabetes em relação ao seu controle sedentário. A suplementação com melatonina e o treinamento físico foram eficazes em corrigir este quadro ao final das cinco semanas do protocolo experimental.

TABELA 3 – Apresenta os valores médios de síntese de glicogênio muscular (sóleo) basal e máxima, após cinco semanas de treinamento físico ou sedentarismo.

Grupo	CS	CT	DS	DT	DSM	DTM
Síntese basal ($\mu\text{mol/g}$ tecido)	$0,8 \pm 0,03$	$1,1 \pm 0,1$ *#	$0,6 \pm 0,06$ *	$1,0 \pm 0,08$ #	$1,0 \pm 0,05$ #	$1,3 \pm 0,1$ *#
Síntese máxima ($\mu\text{mol/g}$ tecido)	$3,0 \pm 0,09$	$3,6 \pm 0,1$ *#	$1,7 \pm 0,1$ *	$2,6 \pm 0,2$ #	$3,0 \pm 0,1$ #	$3,3 \pm 0,2$ #

Significâncias: * *vs* CS; # *vs* DS ($p < 0,05$)

4.7 Avaliação do Conteúdo de Glicogênio Muscular e Hepático

FIGURA 13 - Conteúdo de glicogênio muscular (A), e hepático (B);

Após cinco semanas de treinamento físico e / ou sedentarismo, no músculo sóleo de ratos controle sedentário e treinado (CS, CT), diabéticos sedentários e treinados (DS, DT), diabéticos sedentários e treinados com melatonina (DSM, DTM). Valores representam a média $\pm$ erro padrão. Significâncias: *vs CS; # vs DS ($p < 0,05$).

Na Figura 7, podemos observar o conteúdo de glicogênio muscular (A) e hepático (B). Estes dados associados com os resultados descritos anteriormente mostram que o diabetes por reduzir a captação de glicose, também corrobora para uma redução no conteúdo de glicogênio tanto muscular quanto hepático. Ao final das cinco semanas de protocolo experimental, observamos que tanto a

suplementação com melatonina quanto o treinamento físico foram eficientes em corrigir de maneira eficaz o conteúdo de glicogênio muscular e hepático em relação ao seu grupo controle diabético sedentário.

4.8 Avaliação do Conteúdo total da proteína Glut4 no músculo sóleo

FIGURA 14 - Conteúdo total da proteína Glut4;

Após cinco semanas de treinamento físico e / ou sedentarismo, no músculo sóleo de ratos controle sedentário e treinado (CS, CT), diabéticos sedentários e treinados (DS, DT), diabéticos sedentários e treinados com melatonina (DSM, DTM). Valores representam a média $\pm$ erro padrão.

Na Figura 8, podemos observar o conteúdo total da proteína Glut4. Estes dados mostram a eficácia do exercício físico em aumentar o conteúdo total de glut4, em todos os três grupos exercitados. Observamos o efeito negativo do diabetes reduzindo o conteúdo total de Glut4, porém, esta redução foi corrigida pela suplementação com melatonina. Adicionalmente a melatonina não somente corrigiu, mas também foi eficaz em aumentar a expressão da proteína Glut4, nos grupos suplementados, porém, não observamos um efeito aditivo ao do exercício físico.

4.9 Avaliação do Conteúdo total da proteína AMPK no músculo sóleo

FIGURA 15 - Conteúdo total da proteína AMPK;

Após cinco semanas de treinamento físico e / ou sedentarismo, no músculo sóleo de ratos controle sedentário e treinado (CS, CT), diabéticos sedentários e treinados (DS, DT), diabéticos sedentários e treinados com melatonina (DSM, DTM). Valores representam a média $\pm$ erro padrão.

Na Figura 9, podemos observar o conteúdo total da proteína AMPK em todos os grupos estudados. Durante as cinco semanas do protocolo experimental a indução do diabetes não teve nenhum efeito aparente no conteúdo total de AMPK. Apesar de observarmos do ponto de vista qualitativo uma tendência ao aumento da proteína AMPK tanto no grupo exercitado quanto no grupo suplementado com melatonina, não encontramos diferenças significativas estatisticamente.

4.10 Avaliação do Conteúdo total da proteína IRS-1 no músculo sóleo

FIGURA 16 - Conteúdo total da proteína IRS-1;

Após cinco semanas de treinamento físico e / ou sedentarismo, no músculo sóleo de ratos controle sedentário e treinado (CS, CT), diabéticos sedentários e treinados (DS, DT), diabéticos sedentários e treinados com melatonina (DSM, DTM). Valores representam a média $\pm$ erro padrão.

A Figura 10 representa o conteúdo total da proteína IRS-1 em todos os grupos estudados. Ao final das cinco semanas do protocolo experimental, observamos um efeito positivo do treinamento físico no grupo controle, aumentando a expressão da proteína IRS-1 neste grupo, em relação ao grupo controle sedentário. Apesar de observarmos do ponto de vista qualitativo uma tendência de redução da proteína IRS-1 no grupo diabético em relação ao seu controle sedentário, esta observação não foi comprovada do ponto de vista quantitativo.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo procurou investigar algumas possíveis interações entre melatonina / diabetes / exercício físico, observando os efeitos da suplementação com melatonina e do treinamento físico sobre o perfil metabólico de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Ao final do protocolo experimental de cinco semanas, ambos os grupos exercitados (controle e diabético) apresentaram um aumento significativo da capacidade física, observado através do aumento do tempo e da velocidade de corrida até a condição de exaustão, comparado aos animais não treinados. Estes dados funcionais foram corroborados pelo aumento dos níveis de citrato Síntase em ambos os grupos treinados, demonstrando uma melhora significativa da capacidade de respiração mitocondrial, através da via oxidativa. Já é sabido na literatura que o treinamento físico aeróbio, melhora o transporte e a utilização de oxigênio, assim como, de outros substratos pela musculatura esquelética, por aumentar no tecido muscular, a relação capilar / fibra, número e tamanho das mitocôndrias, conteúdo de glicogênio, atividade das enzimas envolvidas na via oxidativa, dentre outros, poupando desta forma o glicogênio muscular que é uma das principais causas de fadiga muscular (Fox et al, 2000; Hansen, 2009; Kadoglou, 2007; Mcardele et al, 2008; Shearer et al, 2004). Todas estas adaptações em conjunto promovem uma melhora da capacidade e da potência aeróbia. O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ocorre durante o exercício físico, por aumentar o metabolismo celular e a conseqüente captação e utilização de oxigênio pelos tecidos periféricos. Porém, este aumento fisiológico da produção de ERO durante o exercício físico, representa um estímulo importantes para as adaptações induzidas pelo treinamento físico (Cooper et al, 2002; Schneider et al, 2004). A quebra do balanço entre a produção de ERO e sua remoção pelo sistema de defesa antioxidante e / ou sua produção sustentada pode caracterizar o estresse oxidativo, que é responsável pelo aparecimento da fadiga precoce e conseqüente redução da capacidade física.

Tem sido descrito na literatura que a melatonina age como um potente antioxidante molecular (Reiter, 2005), protegendo os tecidos das ações degenerativas dos ERO e melhorando a função mitocondrial (Leon, 2005). Já é conhecido na literatura há mais de uma década que a melatonina exerce um papel importante na função circulatória dos animais. A administração de melatonina reduz a frequência cardíaca de repouso em animais normotensos (Chuang JI, Chen SS, Lin MT, 1993), por modificar a atividade simpática para o coração (Viswanathan M, Hissa R, George JC, 1986), reduz a pressão arterial em ratos pinealectomizados (Holmes SW, Sugden D, 1976), e, espontaneamente hipertensos (Kawashima K, Miwa Y, Fujimoto K et al, 1987). A melatonina também estimula a liberação de fatores vasodilatadores derivados de endotélio (Weekley, 1993), promovendo o relaxamento das artérias (Weekley, 1991). Em conjunto estes dados demonstram de forma inequívoca que a melatonina melhora a função cardiovascular, aumenta o aporte de oxigênio, reduz o estresse oxidativo, aumenta a capacidade oxidativa mitocondrial, culminando na melhora da captação máxima de oxigênio (V_{O2} máx), e consequentemente na evolução do treinamento físico.

Ao final das cinco semanas do protocolo experimental não encontramos diferença significativa no grupo controle em relação ao peso corporal dos animais sedentários e treinados. A literatura têm mostrado que os protocolos de treinamento físico acima de 08 semanas são os mais indicados para redução de peso corporal total (Fox et AL, 2000; ACSM, 2003; Mcardle et aL, 2008). Apesar de não termos encontrado uma redução do peso corporal, alguns trabalhos tem mostrado melhora no perfil lipídico e redução significativa da gordura visceral nos animais treinados em relação ao controle sedentário mesmo sem redução ponderal (Wajchenberg, 2000). Os animais diabéticos apresentaram uma redução significativa do peso corporal ao longo do protocolo experimental, que foi atenuada tanto pela suplementação com melatonina, quanto pelo treinamento físico. Já tem sido descrito na literatura que o diabetes mellitus desencadeia importantes alterações no metabolismo, intensificando o processo lipolítico / proteolítico, com conseqüente perda de peso e surgimento de um quadro

catabólico (Ferrara, 2006; Kelley, 2007). Durante esta última década muitos trabalhos têm demonstrado o papel da melatonina na modulação da homeostasia de carboidratos. Dados publicados por nosso grupo mostraram que a melatonina promove uma melhora na captação de glicose, por aumentar a sensibilidade tecidual a insulina, promovendo alterações na expressão gênica da proteína transportadora GLUT4 (Seraphim, 2000). Além disso, nos tecidos que respondem a ação da insulina, a melatonina aumenta o nível de fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1 e 2), e a atividade da fosfonositol 3 – Kinase (PI3-K), corroborando para uma maior captação de glicose pelos tecidos periféricos, com conseqüente redução da atividade lipolítica e proteolítica, encontrada em animais com resistência a insulina e / ou quadro de diabetes já instalado (Ha E, Yim SV, Chung JH et al., 2006).

Nossos resultados mostraram que o diabetes induzido por estreptozotocina reduz a síntese de melatonina, corroborando com os resultados anteriores do nosso laboratório (Amaral, 2009). Por outro lado, demonstramos de maneira inédita na literatura que o protocolo de exercício físico desenvolvido neste experimento foi eficaz em aumentar a síntese de melatonina em todos os grupos treinados (controle e diabéticos) em relação aos seus grupos sedentários. A variação na síntese de melatonina é controlada dentre outros fatores, pela secreção de noradrenalina pelos neurônios pós-ganglionares simpáticos que inervam a glândula pineal (Brownstein et al, 1974). O exercício físico promove um aumento significativo da atividade destes neurônios simpáticos e conseqüentemente da liberação de noradrenalina (Mcmurray et al, 1987). Este aumento da atividade simpática induzido pelo exercício físico poderia estar modulando o potencial de secreção de melatonina.

Em nossos experimentos, também quantificamos o conteúdo total da proteína Glut4 no músculo sóleo, que segundo a literatura, das proteínas transportadoras de glicose (GLUTs), representa a principal isoforma presente na musculatura esquelética e no tecido adiposo, contribuindo de maneira imprescindível para homeostase glicêmica (Ropelle et al, 2005). Já é sabido na literatura que o exercício físico em diferentes intensidades promove aumento da

expressão de Glut4 (Cortez et al, 1991; Banks et al, 1992; Terada et al, 2001). Nossos dados mostraram a eficácia do treinamento físico em aumentar o conteúdo total de Glut4 em todos os grupos exercitados (controle e diabético), explicando parcialmente o aumento na captação de glicose e corroborando com os dados presentes na literatura (Houmard et al, 1995; Tabata et al, 1999). Observamos adicionalmente o efeito negativo do diabetes reduzindo o conteúdo total de Glut4 (Machado et al, 1993; Handberg et al, 1993). Porém, esta redução foi corrigida de maneira surpreendente pela suplementação com melatonina. A melatonina não somente corrigiu como também foi eficaz em aumentar de maneira inédita a expressão da proteína Glut4 no grupo diabético sedentário suplementado, porém, não observamos um efeito aditivo ao do exercício físico.

Como a quantidade de GLUT4 está, sabidamente, reduzida nos animais pinealectomizados (Lima ET AL, 1998, Seraphim ET AL., 1997), e, como os animais diabéticos apresentam uma redução da produção de melatonina, é possível que a redução dos GLUT4 observada nestes animais deve-se a essa queda de melatonina. Isso se confirma, de certa forma, uma vez que a suplementação com melatonina reverte completamente o quadro da redução dos GLUT4.

Durante o exercício físico ocorre uma redução na secreção de insulina e um aumento na atividade da AMPK, que através de uma via bioquímica distinta tem como objetivo principal a translocação da proteína Glut4 para membrana celular e a conseqüente captação de glicose independente da ação da insulina, mantendo um estado estável do ponto de vista metabólico durante a realização do exercício físico. Dados preliminares do nosso experimento visando à quantificação total da AMPK no músculo sóleo, mostraram do ponto de vista qualitativo uma tendência ao aumento desta proteína com o treinamento físico, e uma tendência a redução com a instalação do diabetes, porém, do ponto de vista quantitativo não encontramos diferença estatística. Dados recentes na literatura têm mostrado que o exercício físico aeróbio aumenta tanto a expressão quanto a fosforilação da proteína AMPK (Jorgensen et al, 2006; Pauli et al, 2009). Ao final das cinco semanas do protocolo experimental, observamos um

efeito positivo do treinamento físico no grupo controle, aumentando a expressão da proteína IRS-1 em relação ao grupo controle sedentário. A literatura tem mostrado que as diferenças no tipo de treinamento, intensidade, duração e momento da extração do tecido muscular, influenciam diretamente neste tipo de resultado (Hawley et al, 2008). Por exemplo, experimentos realizados com roedores, avaliando a sensibilidade a insulina frente ao exercício agudo, mostrou que houve aumento da expressão do IRS-1, porém, após 5 dias de treinamento físico houve redução na expressão desta proteína (Chibalin et al, 2000). Outro estudo em humanos reproduziu também estes resultados mostrando um aumento da expressão total da proteína IRS-1 (YU et al, 2001). Por outro lado, um outro estudo com diabéticos obesos não mostrou alteração da expressão do IRS-1 após 7 dias de treinamento físico (O'Gorman et al, 2006). Em nossos experimentos, apesar de observarmos do ponto de vista qualitativo uma tendência de redução da proteína IRS-1 no grupo diabético em relação ao seu controle sedentário, esta observação não foi comprovada do ponto de vista quantitativo.

6 CONCLUSÃO

Em síntese, podemos concluir que a combinação destas terapias não farmacológicas, representadas pela suplementação com melatonina e pelo treinamento físico aeróbio, no tratamento de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, tem apresentado um efeito positivo do ponto de vista metabólico, promovendo o aumento na expressão da proteína Glut4, na captação de glicose, aumentando a síntese e o conteúdo de glicogênio hepático e muscular, corroborando efetivamente na melhora do desempenho físico e da qualidade de vida destes animais.

REFERÊNCIAS

Agius, L.; Alberti, KG.; Regulation of flux through pyruvate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in rat hepatocytes. Effects of acids and glucagons. Eur J Biochem. 1985; 152: 699-707.

Ahlborg, G; Felig, P; Thagenfeld, L; Hendler, P; Wahpen, J; Substrate turnover during prolonged exercise. J. Clin. Invest. 1974; 53 : 1080-90.

Ahlborg, G; Felig, P; Lactate and glucose exchange across the forearms, legs, and splanchnic bed during and after prolonged leg exercise. J. Clin. Invest. 1982; 69: 45-54.

Amos, AF; Mccarty, DJ; Zimmet, P; The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. Diabet Med, 14: (Sppl 5) 81-85.

Arendt, J.; Is melatonin a photoperiodic signal in humans? Adv, Exp, Med, Biol. 1999; v.460, p.417-24.

Banks EA., Brozinick JTJr, Yaspelkis BBIII, Kang HY, Holloszy JO.; Muscle glucose transport, GLUT-4 content, and degree of exercise training in obese Zucker rats. Am J Physiol Endocrinol Metab. 1992; 263 (5pt1): E1010-5.

Barrett P, MacLean A, Davidson G, Morgan PJ.; Regulation of the Mel 1a melatonin receptor mRNA and protein levels in the ovine pars tuberalis: evidence for a cyclic adenosine 39,59-monophosphate-independent Mel 1a receptor coupling and an autoregulatory mechanism of expression. Mol Endocrinol. 1996; 10:892–902.

Berne, RM.; Levy, MN.; Fisiologia; 5 ed. São Paulo: Elsevier, 2004. 1082p.

Ben-ezera, V; Jankowski, C; Kendrick, K; Nichols, D; Effect of intensity and energy expenditure on postexercise insulin responses in women. J Appl Physiol. 1995; 79 : 2029-34.

Bonadonna, RC; Del Prato, S; Saccomani, MP; Bonora, E; Gulli, G; Ferrannini, E; Bier, D; Cobelli, C; Defronzo, RA; Transmembrane glucose transport in skeletal muscle of patient with non-insulin-dependent diabetes. J Clin Invest. 1993; 92: 486 -94.

Borges, C. N.; A Glândula Pineal e a Regulação metabólica do Tecido Adiposo Branco em Ratos: influência do Treinamento Físico. [Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2001.

Borges-silva CN, Fonseca-alaniz MH, Alonso-vale Mic, Takada J, Andreotti S, Peres SB, Cipolla-neto J, Pithon-curi TC & Lima FB.; Reduced lipolysis and increased lipogenesis in adipose tissue from pinealectomized rats adapted to training. J Pineal Res. 2005; 39: 178 – 84.

Branbrink, JK; Fluckey, JD; Hickey, MS; Graig, BW; Influence of muscle mass and work on post-exercise glucose and insulin responses in young untrained subjects. Acta Physiol Scand. 1997; 161: 371 – 7.

Braun, B; Zimmermann, MB; Kretchmer, N; Effects of exercise intensity on insulin sensitivity in women with non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Appl Physiol. 1995; 78: 300 – 6.

Brownstein M.; Axelrod; J Pineal gland: 24-hour rhythm in norepinephrine turnover. Science, 1974; 184: 163-5.

Chibalin AV, Yu m, Ryder JW, Song XM, Galuska D, Krook Aet al.; Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(1): 38-43.

Coyle EF.; Physiological Regulation of marathon performance. Sports Med. 2007; 37(4-5):306-11.

Corigliano G, Iazzetta N, Corigliano M, Strollo F; Blood glucose changes in diabetic children and adolescents engaged in most common sports activities. Acta Biomed. 2006; 77: 26–33.

Carlberg, C.; Wiesenberg, I.; The orphan receptors family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: An unexpected relationship. J Pineal Res. 1995; 18: 171-8.

Cortez MY, Torgan CE, Brozinick JTIR, Ivy JL. Insulin resistance of obese Zucker rats exercise trained at two different intensities. Am J Physiol Endocrinol Metab. 1991; 261: E613 – 9.

Cipolla – neto, J. & Afeche, SC; Glândula pineal. In: Aires, MM. (ed). Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1999. p. 805 – 11.

Curtis, H; Biologia. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1977. 964p.

Díaz, B, Blázquez, E; Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and Glucagon levels in the rat. Horm Metabol Res. 1986; 18: 225-9.

De Fronzo, RA; Pathogenesis of type 2 diabetes: Metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. Diabetes Rev. 1997; 5: 177-269.

Felig P, Wharen J. Fuel homeostasis in exercise. N Engl J Méd. 1975; 293: 1073-84.

Fieri, WJ; Levada, MM. O Pivesso, MS. Citologia, histologia e embriologia. 2 ed. São Paulo: Catálise, 1996; 850p.

Ferrara CM, Goldberg AP, Ortmeyer HK, Ryan AS. Effects of aerobic and resistive exercise training on glucose disposal and skeletal muscle metabolism in older men. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2006; 61(5): 480-7.

Fraschini, F.; Scaglione, F.; Franco, P.; Dermartini, G.; Lucini, V.; Stankov, B.; Sacerdote, P.; Melatonin and immunity. Acta Oncol, 1990; 29: 775 – 6.

Fujimoto, W.Y.; The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Am J Med 2000; 108 (6A): 9s – 14s.

Garvey, WT.; Maianu, L.; Huecksteadt, TP.; Birbaum, MJ.; Molina, JM.; Ciaraldi, TP.; Pretranslational supression of a glucose transporter protein causes cellular insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. J Clin Invest. 1991; 87: 1072 – 81.

Geloneze, B, Rodovalho_Geloneze S, Parisi C, Pícolo M, Repetto EM, Tambascia MA. Standardization of insulin tolerance test (ITT), in Brazilian population. Diabetes Res Clin Pract, 2000; 50 (suppl.): s102.

Gerich, JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. Endocr Rev. 1998; 19 (4): 491-503.

Guyton, AC.; Hall, JE. Tratado de fisiologia médica. 10 ed. Rio de Janeiro; Guanabara – Koogan; 2002. 973p.

Hawley JA, Lessard SJ. Exercise training-induced improvements in insulin action. *Acta Physiol.* 2008; 192 (1): 127-35.

Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR. Prevalence of diabetes, impaired fasting, glucose and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The third National Health and Nutrition Examination Survey, 1998-1994. *Diabetes Care*, 1998; 21: 518 – 26.

Handberg A, Kayser I, Hoyer pe, Voldstedlund M, Hansen hp, Vinten J.; Metformin ameliorates diabetes but does not normalize the decreased GLUT 4 content in skeletal muscle of obese (fa/fa) Zucker rats. *Diabetologia* 1993; 36: 481-6.

Hemmings SJ, Spafford D. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the fischer 344 rat: characteristics and assesment of the status of the hepatic adrenergic receptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000; 32 (8) 905 – 19.

Hansen D, Dendale P, Jonkers RA, Beelen M, Manders RJ, Corluy Let al.; Continuous low- to moderate-intensity exercise training is as effective as moderate- to high-intensity exercise training at lowering blood HbA(1c) in obese type 2 diabetes patients. *Diabetologia.* 2009; 52(9): 1789-97.

Hoelzer DR, Dalsky GP, Clutter WE, Shah SD, Holloszy JO, Cryer PE. Glucoregulation during exercise: hypoglycemia is prevented by redundant glucoregulatory systems, sympathochromaffin activation, and changes in islet hormone secretion. *J Clin Invest.* 1986; 77: 212-21.

Hirshman MF, Wardzala LJ, Gooyer LJ, Fuller SP, Horton ED, Horton ES. Exercise training increase the number of glucose transporters in rat adipose cells. *Endocrinol metab.* 1989; 257: E 520 – 30.

Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and Diabetes in the developing world – a growing challenge. *N Engl J Med.* 2007; 356: 213-5.

Houmard JA, Hickey MS, Tyndall GL, Gavigan KE, Dohm GL. Seven days of exercise increase GLUT-4 protein content in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1995; 79 (6): 1936-8.

Jorgensen BS, Richter AE, Wojtaszewski PFJ. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J. Physiol.* 2006; 574 (pt.1) 17-31.

Junod A, Lambert, Orci L, Pictet R, Gonet AG, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1967; 126: 201-5.

Kadoglou np, Iliadis F, Angelopoulou N, Perrea D, Ampatzidis G, Liapis Cdet al. The anti-inflammatory effects of exercise training in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2007; 14(6): 837-43.

Kahn BB. Type 2 Diabetes: When Insulin Secretion Fails to compensate for Insulin Resistance. *Cell.* 1998; 92: 593-6.

Kappers JA. The development, topographic relations and innervation of the epiphysis cerebral in the albino rat. *Zietsch Zellforsh.* 1960; 52: 163-215.

Kashiwagi A, Verso MA, Andrews J, Vasquez B, Reaven G, Foley JE. In vitro insulin resistance of human adipocytes isolated from subjects with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1983; 72: 1246-54.

Kelley DE, Mintun MA, Watkins SC, Simoneau JA, Jadali F, Fredrickson A, Beattie J, Theriault R. The effect of non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity on glucose transport and phosphorylation in skeletal muscle, *J Clin Invest.* 1996; 97: 2705-13.

Kelley GA, Kelley KS. Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins in adults with type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized-controlled trials. *Public Health.* 2007; 121(9): 643-55.

King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates and projections. *Diabetes Care.* 1998; 21: 1414-31.

Koivisto VA, Yki-jarvinen H, DeFronzo RA. physical training and insulin Sensitivity. *Diabetes Metab Rev.* 1986; 1: 4445-81.

Kruszynska Y, Olefsky J. Cellular and molecular mechanisms of non insulin dependent diabetes mellitus. *J Invest Med.* 1996; 44: 413-28.

Lima FB, Matsushita DH, Hell NS, Dolnikoff MS, Okamoto MM, Cipolla-neto J. The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of the periodicity of food intake, time of the day, and melatonin. *Braz J Med Biol Res.* 1994; 27: 995-1000.

Lima FB, Machado UF, Bartol J, Seraphim PM, Sumida DH, Moraes SMF, Hell NS, Okamoto MM, Saad MJA, Carvalho CRO, Neto-cipolla J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1998; 38: E 934 – 41.

Lithell H, Schele R, Vessby B, Jacobs J. Lipoproteins, lipoprotein lipase, and glycogen after prolonged physical activity. *J Appl Physiol.* 1984; 53: 698-702.

Machado UF, Shimizu Y, Saito M. Decreased glucose transporter (GLUT 4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose- and monosodium glutamate-treated mice. *Horm Metab Res* 1993; 25 (9): 462-5.

Mahan IK, Arlin MT, Krause. Alimentos, nutrição e dietoterapia. São Paulo: Roca; 1995. 957p.

American College of Sports Medicine. Manual de pesquisa das diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição. 4 ed. Rio de Janeiro: guanabara koogan; 2003. 704p.

Mckinley MJ, Mcaclen RM, Mendelsohn FAO, Allen AM, Chai SY, Aldfield BJ. Circunventricular organs: Neuroendocrine interfaces between the brain and the hemal milieu. *Frontiers Neuroendocrinol.* 1990; 11: 91-127.

Mcardle W D, Katch FL, Katch VL. Fisiologia do exercicio; energia, nutrição e desempenho humano. 6 ed.; Rio de Janeiro: guanabara – koogan; 2008.

Mcmurray RG, Forsythe WA, Mar MH. Exercise intensity-related responses of beta-endorphin and catecholamines. *Med Sci Sports Exerc.* 1987; 19: 570-4.

Moller M. Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Technol.* 1992; 21: 188-204.

Morgan PI, Barrett P, Howell HE, Helliwell R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int.* 1994; 24: 101-46.

Nielsen K, Karsen AE, Deckert M, Madsen OD, Serup P, Mandrup-Poulsen T, Nerup J. Beta-cell maturation leads to in vitro sensitivity to cytotoxins. *Diabetes.* 1999; 48 (12) 2324-32.

Nishida S, Sato R, Murai J, Nakagawa S. Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Δ - 5 desaturase activity. 32: 26-33.; *J. Pineal Res.* 2002; 32: 26-33.

Nishida S, Sato R, Murai I, Nakagawa S. Effect of pinealectomy on levels of insulin and leptin and on hepatic lipids in type 2 diabetic rats. 35: 251-56. *J. Pineal Res.* 2003; 35: 251-56.

O'donovan G, Kearney EM, Nevill AM, Woolf-may K, Bird SR. The effects of 24 weeks of moderate- or high-intensity exercise on insulin resistance. *Eur J Appl Physiol.* 2005; 95 (5-6) 522-8.

O'meara NM, Sturis J, Van Cauter E, Polonsky KS. Lack of control by glucose of ultradian insulin secretory oscillations in impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1993; 92: 262-71.

Pauli RJ, Ropelle RE, Cintra ED, Souza TC. Efeitos do exercício físico na expressão e atividade da AMPK α em ratos obesos induzidos por dieta rica em gordura. Rev Brás Med Esporte. 2009; 15 (2): 98-103.

Peschke E, Muhlbauer E, Mussho U. Receptor (MT1) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. J Pineal Res. 2002; 33: 63-71.

Polonskiy, KS. The β -cell in diabetes: from molecular genetics to clinical research. Diabetes. 1995; 44: 705-17.

Portha B, Picon I, Rosselin G. Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. Diabetologia. 1979; 17: 371-7.

Portha B, Blondel O, Serradas P, Mcevoy R, Giroix MH, Kergoat M, Bailbe d. The rat models of non-insulin-dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. Diabete Metab. 1989; 15: 61-75.

Ralph CL. Pineal Bodies and thermoregulation. In: Reiter J. (ed). The pineal gland, New York: Raven Press; 1984. p.193-220.

Reiter J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocrine Rev. 1991; 12: 151-80.

Reppert SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step into the light: Cloning and classification of subtypes. Trends Pharmacol Sci. 1996; 17: 100-2.

Reynolds TH, Brozinick JRJT, Rogers MA, Cushman SW. Effects os exercise training on glucose transport and cell surface glut 4 in isolated rat epitrochlearis muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 1997; 227: E 320-5.

Ropelle ER, Pauli JR, Carnevalheira JC. Efeitos moleculares do exercício físico sobre as vias de sinalização insulínica. *Motriz*. 2005; 11 (1): 49-55.

Bartol ISP, Machado UF, Cipolla-Neto J, Sumida DH. Quantification of Glut 4 transporters in insulin sensitive tissues from pinealectomized rats, In: European Pineal Society. (Org.) Pineal update; from molecular biology to clinical implications. Westbury, NY: PJD Publication; 1997. p.99-106.

Schneider CD, Barp J, Ribeiro JL, Bello-Klen A, Oliveira AR. Oxidative stress after three different intensities of running. *Can Appl Physiol*. 2005; 30 (6): 723-34.

Shearer J, Graham TE. Novel aspects of skeletal muscle glycogen and its regulation during rest and exercise. *Exerc Sports Sci Rev*. 2004; 32(3):120-6.

Shepherd PR, Kahn BB. Cellular defects in glucose transport: lessons from animal models and implications for human insulin resistance. In: Moller, D. E.; (ed). *Insulin resistance*. Chichester: J. Wiley; 1993. p.253-300.

Smith Jr, SC. Multiple risk factors for cardiovascular disease and diabetes mellitus, *Am J Med*. 2007; 120 (n.3 supl. 1): S3- S11.

Smith RJ. Biological actions and interactions of insulin and glucagon. In: De groot LJ (ed) *Endocrinology*. 1991; p.1333-45.

Short KR, Vittone JL, Bigelow ML, Proctor DN, Rizza RA, Coenen- Schimke JM, and Nair KS.; Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. *Diabetes*. 2003; 52: 1888-96.

Stallknecht B, Andersen PH, Vinten J, Bendtsen LL, Sibersen J, Pedersen, O, Galbo H. Effect of physical training on glucose transporter protein and m RNA levels in rat adipocytes. *Endocrinol Metab.* 1993; 269: E 128-34.

Stellingwerff T, Boon H, Gijsen AP, Stegen JH, Kuipers H, van Loon LJ. Carbohydrate supplementation during prolonged cycling exercise spares muscle glycogen but does not affect intramyocellular lipid use. *Pflugers Arch.* 2007; 454 (4): 635-47.

Tabata I, Suzuki Y, Fukunaga T, Yokozei T, Akima H, Funato K. Resistance training affects GLUT-4 content in skeletal muscle of humans after 19 days of head-down bed rest. *J Appl Physiol* 1999; 86 (3) 909-14.

Tarttesall RB, Pyke DA. Diabetes in identical twins. *Lancet.* 1972; 28: 1120.

Terada S, Yokozei T, Kawanaka K, Ogawa K, Higuchi M, Ezaki O, Tabata I. Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2001; 90 (6): 2019-24.

Thulesen J, Orskov C, Holst JJ, Poulsen SS. Short term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. *Endocrinology.* 1997; 138 (1): 62-8.

Turner RC, Hattersley A, Shaw J, Levy J. Type II diabetes: Clinical aspects of molecular biological studies, *Diabetes.* 1995; 44: 863-70.

Temple RC, Carrington CA, Luzio SD, Owends DR, Schneider AE, Sobey WJ, Hales CN. Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes. *Lancet.* 1989; 1: 293-5.

Thompson PD, Buchner D, Pina IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH et al. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation*. 2003; 107(24): 3109-16.

Vanecek, J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev*. 1998; 78: 687-721.

Wajchenberg, BL.; 1992 Tratado de endocrinología clínica. Roca; 1992. 966 p.

Wallum BJ, Kahn SE, McCulloch DK, Porte D. Insulin secretion in the normal and diabetic human. In: Alberti, KGMM et al. International textbook of diabetes mellitus. Chichester: John Wiley; 1992. p 285-301.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Rev* 2000;21:697-738.

Willason J, Kreisberg R, Felts P. Mechanism for the stimulation of gluconeogenesis by fatty acids in perfused rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 56: 247-54.

Zanquetta MM, Seraphim PM, Sumida DH, Cipolla-Neto J, Machado UF. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. *J Pineal Res*. 35 (3): 141-8.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 2001; 414: 782-7.