José Sinésio da Silva Junior

***OS EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE A SÍNTESE
DE MELATONINA PINEAL EM RATOS***

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

São Paulo
2015

José Sinésio da Silva Junior

***OS EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE A SÍNTESE
DE MELATONINA PINEAL EM RATOS***

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

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

Silva Junior, José Sinésio.

Os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a síntese de melatonina pineal de ratos / José Sinésio Silva Junior. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Neurobiologia.

Versão do título para o inglês: Effects of the aerobic exercise training on pineal melatonin synthesis in rat.

1. Glândula pineal 2. Síntese de melatonina 3. Exercício físico

I. Cipolla Neto, Prof. Dr. José II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0147/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): José Sinésio Silva Junior.

Título da Dissertação: Os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a síntese de melatonina pineal de ratos.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

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, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 -e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.058/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 199/11/CEUA, datado de 24.01.12 e por solicitação do Prof. Dr. **José Cipolla Neto**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluno **José Sinésio da Silva Junior** ao Projeto de Pesquisa "*O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: ações centrais e a regulação circadiana da função metabólica*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 24 de junho de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

Dedico a Deus e a todas as pessoas que me ajudaram nessa jornada. Em especial aos meus pais Rosa e Sinésio, bem como à minha companheira Mariely e ao meu grande amigo Ronaldo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido essa oportunidade, ter preparado um ótimo lugar para eu desenvolver essa dissertação e por me sustentar nos momentos difíceis.

Aos meus pais por sempre estarem presentes me apoiando nas decisões e por me incentivarem a fazer o mestrado. É difícil expressar em palavras tamanho a gratidão e admiração por vocês.

Agradeço às minhas irmãs Leticia e Elenir, assim como ao meu irmão Angelo Gabriel, muito obrigado por tudo.

Ao grande mestre Professor Dr. José Cipolla Neto, agradeço pela amizade, confiança e pelos preciosos conselhos, ensinamentos e orientação. Muito obrigado!

Ao Dr. Ronaldo Melo, pelo incentivo, conselhos e acima de tudo pela amizade.

À Julieta Scialfa, por todo o carinho, apoio e dedicação. Sempre fazendo muito além do que é pedido. Muito obrigado!

Aos amigos do laboratório: Nityananda, Livia Geovani, Eduardo Leite, Livia Clemente, Caroline Mendes, Fernanda Amaral, Lia Coelho, Daniella Buonfiglio, Rodrigo Garcia, Rafael Peres, Eduardo Reis, Rosana Dantas, Wilson Mitsuo e Claudia Acciloly. Muito obrigado pela ótima convivência e pelos ensinamentos. E em especial ao Raphael (PH) e a Jéssica Andrade, pela amizade, companhia, carinho e ajuda.

Agradeço aos meus amigos do ICB-1, Luciana Tocci, Bruna Lins e Daniel Blanc, por sempre estarem presentes ajudando no que for preciso. Muito obrigado, vocês são demais.

Aos amigos da APG, da APG capital e da ANPG. Em especial ao João Esteves e ao Caio Yogi, que sempre estão comigo lutando por uma pós melhor. Muito obrigado.

Aos professores (as) do ICB - 1, em especial ao Prof. Dr. Luiz Britto e à Profa. Dra. Maria Tereza Nunes. Assim como para a Profa. Dra. Solange Afeche do Butantã. Muito obrigado.

Agradeço a toda a minha família e em especial aos meus primos, Thiago Nunes, Gabriel Nunes e Douglas Pereira, pelos momentos inesquecíveis e pela inestimável amizade, vocês são demais.

Agradeço a todos os meus ex companheiros de equipe, e em especial aos meus ex treinadores: Fernando Lima, Fabinho e Basílio, que contribuíram muito com minha educação e disciplina. Muito obrigado.

Aos funcionários, José Maria, Paloma Cañipa, Itamar Klemps, Celso Pereira, Cláudio Lúcio, Miguel, Valdeir de Souza, Leonardo Rafael, Aline Oliveira, Peninha, Leila, Patrícia, Tarcísio, Monica Amaral, e a todos que contribuíram para a realização deste. Muito Obrigado!

Enfim, a todos que colaboraram para realização desse trabalho e peço desculpa aos que eu esqueci de citar...

Ao CNPq e a FAPESP pelo financiamento da minha bolsa e da presente pesquisa!

A benção do Senhor é que enriquece;
e não traz consigo dores.

(Provérbios 10: 22)

RESUMO

Silva-Junior JS. Os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a síntese de melatonina pineal de ratos. [dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

A glândula pineal é a responsável pela síntese e secreção do hormônio melatonina, que por sua vez participa na organização temporal de ritmos biológicos atuando como mediadora entre o ciclo claro / escuro ambiental e os processos fisiológicos regulatórios incluindo a modulação dos ciclos de atividade / repouso e sono / vigília, dentre outros. A síntese de melatonina é controlada pela liberação noturna de noradrenalina pelos axônios dos neurônios pós-ganglionares simpáticos que inervam a glândula pineal. Sua produção pode ser modulada ainda por outras regiões do sistema nervoso central e por vários constituintes do sistema peptidérgico. O exercício físico promove um aumento significativo na atividade dos neurônios simpáticos periféricos e, conseqüentemente, na liberação de noradrenalina. Sabendo-se desse aumento, imaginou-se que o exercício físico poderia modular a liberação de noradrenalina pela inervação simpática da glândula pineal, e, portanto, modularia a síntese de melatonina. Porém parece não existir um consenso acerca desse assunto. Com isso, sabendo dessa controvérsia e que tanto o diabetes farmacologicamente induzido por estreptozotocina, quanto o processo fisiológico de envelhecimento diminuem significativamente a síntese de melatonina pineal e plasmática em ratos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a síntese de melatonina pineal em ratos sob várias condições (adultos saudáveis, animais idosos e animais diabéticos tipo 1 não tratados). Para isso, foram utilizados ratos da linhagem Wistar divididos em dois grandes grupos, sendo que um realizou o protocolo de treinamento com duração de 8 semanas e o outro de 5 semanas. No primeiro grupo os animais foram divididos em: Adultos Sedentários (AS); Adultos Treinados (AT); Idosos Sedentários (IS); Idosos Treinados (IT). Enquanto que no segundo foram divididos em: Controles Sedentários (CS); Controles Treinados (CT); Diabéticos Sedentários (DS); Diabéticos Treinados (DT). Após a eutanásia, realizada em ZTs (*Zeitgeber Time*) específicos, as glândulas pineais foram retiradas para avaliação do conteúdo de melatonina, atividade da enzima AANAT e a expressão gênica das enzimas envolvidas na síntese de melatonina, assim como dos receptores adrenérgicos (β_1 , α_1). Os animais adultos treinados não apresentaram diferença na produção de melatonina ao longo da escotofase, e os animais diabéticos não apresentaram diferença na atividade da AANAT nos ZTs 18 e 21. Porém os animais idosos apresentaram um aumento na atividade da enzima AANAT e uma maior expressão gênica do receptor beta adrenérgico no ZT 18. Em conclusão, o treinamento físico aeróbio não altera a síntese de melatonina pineal nos animais adultos e nos diabéticos, mas possivelmente aumenta nos animais idosos treinados, através do aumento da expressão do receptor β_1 adrenérgico e da atividade da enzima passo limitante na síntese de melatonina, a AANAT.

Palavras-chave: Glândula pineal. Síntese de melatonina. Exercício físico.

ABSTRACT

Silva-Junior JS. Effects of the aerobic exercise training on pineal melatonin synthesis in rats. [Masters thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

The pineal gland is responsible for melatonin synthesis and secretion, which in turn participates in the temporal organization of biological rhythms acting as a mediator between the light / dark environmental and regulatory physiological processes including modulation of sleep / activity and sleep / wake cycles, among others. Melatonin synthesis is controlled by the nocturnal release of norepinephrine by the axons of sympathetic postganglionic neurons innervating the pineal gland. Its production can be modulated by yet other regions of the central nervous system and various constituents of the peptidergic system. The exercise promotes a significant increase in the activity of peripheral sympathetic neurons and consequently the release of noradrenaline. In this way, the exercise could modulate the release of noradrenaline by the sympathetic innervation of the pineal gland, and thus modulate melatonin synthesis. Nonetheless, melatonin synthesis modulation by exercise is still controversial. On the other hand, both streptozotocin-induced diabetes and the physiological aging process significantly decrease the pineal synthesis and plasma melatonin concentration in rats. The aim of this study was to evaluate the effects of aerobic exercise training on pineal melatonin synthesis in rats under various conditions (healthy adults rats, aged ones and untreated type 1 diabetic animals). Wistar rats were randomly assigned to the following groups, 1) 8-week training period: Sedentary Adult (AS); Trained Adult (AT); Sedentary Aged (IS); Trained Aged (IT), and 2) 5-week training period: Sedentary Control (CS); Trained Control (CT); Sedentary Diabetic (DS); Trained Diabetic (DT). After euthanasia at ZT18, the pineal glands were removed for evaluation of the melatonin content, AANAT enzyme activity and gene expression of the enzymes involved in melatonin synthesis, as well as the adrenergic receptors ($\beta 1$, $\alpha 1$). Trained adult animals showed no difference in melatonin production throughout the scotophase and the diabetic animals showed no difference in the AANAT activity at ZTs 18 and 21. Aged animals showed an increase in AANAT enzyme activity and increased gene expression of beta adrenergic receptor at ZT 18. In conclusion, the aerobic exercise does not alter pineal melatonin synthesis in adult animals and in diabetic ones, but possibly increases it in trained aged animals by increasing the $\beta 1$ adrenergic receptor expression and the AANAT activity, the rate limiting enzyme in melatonin synthesis.

Keywords: Pineal gland. Melatonin synthesis. Exercise training.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da via de síntese da melatonina	18
Figura 2 – Vias neurais do controle diário da síntese de melatonina	19
Figura 3 – Vias de sinalização da noradrenalina nos pinealócitos de ratos	21
Figura 4 – Representação da molécula melatonina	26
Figura 5 – Variação ontogenética do perfil diário de melatonina	30
Figura 6 – Representação circadiana dos ZTs	38
Figura 7 – Esquema do desenho experimental	39
Figura 8 – Esquema de indução do diabetes	40
Figura 9 – Peso dos animais adultos	44
Figura 10 – Teste de exaustão nos AT	45
Figura 11 – Conteúdo de melatonina na glândula pineal	45
Figura 12 – Atividade enzimática da AANAT	46
Figura 13 – Peso dos animais controles e diabéticos	47
Figura 14 – Teste de exaustão dos animais CT e DT	47
Figura 15 – Aferição da Glicemia	48
Figura 16 – Conteúdo de triglicerídeos plasmático	48
Figura 17 – Conteúdo de colesterol plasmático total	49
Figura 18 – Atividade enzimática da AANAT	49
Figura 19 – Atividade enzimática da AANAT	50
Figura 20 – Peso dos animais idosos	50
Figura 21 – Teste de exaustão dos animais IT	51
Figura 22 – Aferição da glicemia	51
Figura 23 – Conteúdo de triglicerídeos plasmático	52
Figura 24 – Conteúdo de colesterol plasmático total	52
Figura 25 - Atividade enzimática da AANAT dos animais idosos	53
Figura 26 – Área sob a curva da atividade da AANAT	54
Figura 27 – Expressão Gênica do receptor alfa adrenérgico no ZT 18	54
Figura 28 – Expressão Gênica do receptor beta adrenérgico no ZT 18	55
Figura 29 – Expressão Gênica da enzima AANAT no ZT 18.....	56
Figura 30 – Expressão Gênica da enzima HIOMT no ZT 18.....	56

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo de treinamento de 8 semanas	37
Tabela 2 – Protocolo de treinamento de 5 semanas	37
Tabela 3 – Sequência dos primers utilizados	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT: serotonina
5-HTP: 5-hidroxitriptofano
AANAT: aril-alquilamina-N-acetiltransferase.
AC1: adenilato ciclase.
AS: Adultos sedentários
AT: Adultos treinados
AT1: Receptor de angiotensina 1
AMPc: adenosina monofosfato cíclico
ANOVA: método de análise de variância
ASMT: Acetilserotonina-oximetiltransferase
ATP: adenosina trifosfato
Ca²⁺: cálcio
CaMK: quinase dependente de cálcio e calmodulina
CRE: “*cAMP response element*”
CREB: *cAMP response element binding*
CS: controle sedentário
CT: controle treinado
DAG - diacilglicerol
DM: diabetes mellitus
DS: diabético sedentário
DT: diabético treinado
E.P.M: erro padrão da média
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
GABA: ácido gama-aminobutírico
GCS: gânglio cervical superior.
GMPc: guanosina monofosfato cíclico
HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferase
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
ICER: *inducible cAMP early repressor*
IDF: “International Diabetes Federation”
IGL: folheto intergeniculado talâmico
IML: coluna intermédio lateral da medula espinhal.

IP: intraperitoneal
IP3: trifosfato de inositol
IR: receptor de insulina
IRS-1: substrato 1 para o receptor de insulina
IRS-2: substrato 2 para o receptor de insulina
IS: idoso sedentário
IT: idoso treinado
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno
MT1: receptor 1 de membrana para melatonina
MT2: receptor 2 de membrana para melatonina
Na⁺: sódio
nAChR: receptor nicotínico
NAS: N-acetilserotonina
NOR: noradrenalina
NPY: neuropeptídeo Y
NSQ: núcleo supraquiasmático
pAANAT: AANAT fosforilada
PACAP: polipeptídeo ativador da adenilato ciclase hipotalâmica
PI3K: fosfatidilinositol 3 quinase
PKA: proteína quinase A
PKC: proteína quinase C
PKG: proteína quinase G
PLC: fosfolipase C
PVN: Núcleo paraventricular hipotalâmico
SNC: Sistema Nervoso Central
STZ: estreptozotocina
TPH: triptofano hidroxilase
UHPLC: cromatografia líquida de alta precisão.
VIP: polipeptídeo intestinal vasoativo
ZT: zeitgeber time

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 A glândula pineal e a síntese de melatonina	17
1.2 Enzimas da via de síntese de melatonina	22
1.2.1 Triptofano hidroxilase	22
1.2.2 Arilalquilamina-N-acetiltransferase	22
1.2.3 Hidroxindol-O-metiltransferase (Acetilserotonina-oximetiltransferase)	24
1.3 Moduladores da síntese de melatonina pineal	24
1.4 Melatonina e suas propriedades	25
1.5 Treinamento físico	27
1.6 Diabetes, melatonina e exercício físico	28
1.7 Envelhecimento, melatonina e exercício físico	29
1.8 A controvérsia a respeito de exercício e síntese de melatonina	31
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivos Gerais	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Animais	36
4.2 Procedimento experimental para indução do diabetes	37
4.3 Protocolos de treinamento	37
4.4 Eutanásia	38
4.5 Dosagens plasmáticas	39
4.6 Determinação da massa corporal	40
4.7 Teste do esforço máximo	40
4.8 Dosagem de melatonina por cromatografia líquida de alta resolução	41
4.9 Análise radiométrica da atividade da AANAT	42
4.10 Extração de RNA	43
4.11 Obtenção de cDNA	44
4.12 Análise quantitativa da expressão gênica por reação de cadeia em polimerase (PCR) em tempo real	44

4.13 Análise estatística	46
5 RESULTADOS	44
5.1 Grupos controles e treinados – protocolo de 8 semanas	44
5.2 Grupos controles e diabéticos – protocolo de 5 semanas	46
5.3 Grupo dos animais idosos	50
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 A glândula pineal e a síntese de melatonina

A glândula pineal, também denominada de órgão pineal, origina-se, embriologicamente, de uma evaginação dorsal do teto do terceiro ventrículo e no cérebro adulto constitui, junto com os núcleos habenulares, a maior parte do epitélamo (EKSTROM; MEISSEL, 2003).

Nos roedores, a glândula pineal apresenta três porções distintas 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).

A glândula pineal é a responsável pela síntese e secreção do hormônio melatonina, que 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 (GOLDMAN, 2001), na regulação do sistema cardiovascular, em particular da pressão arterial (MCKINLEY et al., 1990), na regulação de ciclos de atividade-reposo e vigília-sono (ARMSTRONG, 1989) e do sistema imunológico (FRASCHINI et al., 1990), além de desempenhar uma importante função fisiológica regulatória no metabolismo, influenciando inúmeros fatores ligados ao balanço energético (CIPOLLA-NETO et al., 2014).

Em mamíferos a produção de melatonina ocorre no período noturno, apresentando um ritmo de 24 horas (circadiano). Os processos de produção e secreção de melatonina pineal limita-se à fase de escuro do ciclo diário de iluminação ambiental, tendo a sua duração variável de acordo com a duração sazonal da noite (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2012), atribuindo à glândula pineal o papel fisiológico de sinalizar para o meio interno, através da presença e ausência diária da melatonina na circulação e nos diversos líquidos corpóreos, se é noite ou dia no meio exterior e, a partir da duração do seu perfil secretório noturno, qual é a estação do ano (CIPOLLA-NETO et al., 1999).

A melatonina é uma indolamina (N-acetil-5-metoxitriptamina), derivada do aminoácido triptofano, de peso molecular 232,3 Da. A cadeia bioquímica de síntese de melatonina começa com o aminoácido triptofano, que, através da enzima triptofano hidroxilase, é convertida em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Este, sob a ação da descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos, é transformado em serotonina (5-HT). A serotonina é convertida em N-

acetilserotonina (NAS) pela ação da enzima arialquilamina-N-acetiltransferase (AANAT), e a NAS, oximetilada pela enzima hidroxí-indoloximetiltransferase (HIOMT), também chamada de acetilserotonina-oximetiltransferase (ASMT), dá origem à 5-metoxi-N-acetiltriptamina, conhecida como melatonina (CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2012) (Figura 1).

Figura 1 – Representação da via de síntese da melatonina

Representação dos indóis e das enzimas envolvidos na síntese da melatonina pineal (adaptado de CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2008).

A síntese de melatonina é controlada por uma via neural que se inicia no núcleo paraventricular hipotalâmico (NPH) que, a partir de projeções diretas e indiretas, se conecta com os neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermédio lateral da medula espinhal (IML). Esses neurônios, por sua vez, projetam-se sobre o gânglio cervical superior (GCS) e deste, dá-se origem a inervação simpática que caminha pelos nervos conários, ramos

dos carotídeos internos, que controla, na glândula pineal, a síntese de melatonina. Destas terminações simpáticas há a liberação de noradrenalina nos interstícios da glândula, estimulando a síntese de melatonina, através da interação com os adrenoreceptores β e α (KAPPERS, 1960) (Figura 2).

Figura 2 – Vias neurais responsáveis pelo controle diário da síntese de melatonina

A síntese de melatonina é controlada por um sistema neural com origem no núcleo paraventricular hipotalâmico que, por sua vez, é temporizado pelo sistema de temporização circadiano, representado pelas projeções dos NSQs. Estes são sincronizados pela variação da luminosidade diária do ciclo claro-escuro ambiental captada pela retina. Esse sistema garante que a síntese da melatonina se dê apenas na fase escura. NSQs: núcleos supraquiasmáticos; PVN: núcleo paraventricular hipotalâmico; IML: coluna intermédia lateral da medula espinal; GCS: gânglio cervical superior; P: pineal; NOR: noradrenalina (Adaptado de CIPOLLA-NETO; AFECH, 2008).

Porém, sabe-se que a síntese se dá apenas durante a noite e isso se deve ao controle temporizado exercido pelos núcleos supraquiasmáticos (NSQs). Os NSQs estão sincronizados ao ciclo de iluminação ambiental através da via retino-hipotalâmica. Durante a noite a atividade neural dos NSQs que inervam o núcleo PVH é predominantemente glutamatérgica, ou seja, há estimulação do PVH e ocorre a liberação de noradrenalina no interstício da glândula e consequentemente, ocorre a produção de melatonina. Já durante o dia, a luz captada pela via retino-hipotalâmica faz com que a atividade dos NSQs em sua projeção para o núcleo PVH seja predominantemente gabaérgica, inibindo a liberação de noradrenalina na glândula pineal.

Dessa forma, pode-se associar, não importando se a espécie é de atividade diurna ou noturna, a atividade neural gabaérgica nos NSQs e a não produção de melatonina ao dia e, a ausência ou redução dessa atividade juntamente com o aumento da atividade glutamatérgica e com a produção de melatonina à noite (CIPOLLA; AFECHÉ, 1992; MOORE; SPEH; CARD, 1995).

A ativação noturna da via neural de projeção periférica para a glândula pineal induz a liberação de noradrenalina nas proximidades dos pinealócitos, os quais apresentam receptores α e β -adrenérgicos. Da interação com os receptores β (subtipo $\beta 1$) há indução do aumento do AMPc intracelular através da ativação de uma proteína G estimulatória (Gs) e da enzima adenilato ciclase (AC1). A ativação dos receptores α (subtipo $\alpha 1B$) ativa uma proteína Gq ligada à estimulação da fosfolipase C (PLC), a qual promove a hidrólise de fosfoinositídeos de membrana, gerando IP3 e diacilglicerol. O IP3, atuando em seus receptores no retículo endoplasmático, induz a liberação do cálcio desses estoques, tendo como consequência um aumento do cálcio intracitoplasmático. O aumento do cálcio induzido por noradrenalina caracteriza-se por um pico seguido de um platô (SCHAAD et al., 1995). O cálcio e o diacilglicerol ativam a proteína quinase C (PKC), a qual potencia o aumento do AMPc já induzido pela estimulação β -adrenérgica. Este efeito pode ocorrer pela fosforilação da adenilato ciclase ou da proteína Gs (BORJIGIN; WANG; SNYDER, 1995; CHIK; HO; KLEIN, 1988; KLEIN; SUGDEN; WELLER, 1983; SUGDEN et al., 1985; SUGDEN; KLEIN, 1988; VANECEK et al., 1985).

No rato, o AMPc ativa a proteína quinase A (PKA) do tipo 2, (MARONDE et al., 1999a) a qual fosforila um fator de transcrição, a proteína CREB (“cAMP response element binding”). Esta, por sua vez, se liga ao sítio CRE na região promotora do gene da AANAT, induzindo a transcrição seguida pela tradução citoplasmática da enzima (CHIK et al., 2007; KLEIN, 2007) (Figura 3).

Figura 3 – Vias de sinalização da noradrenalina nos pinealócitos de ratos

A noradrenalina, presente no interstício da glândula, age nos receptores adrenérgicos β_1 e α_1 estimulando uma cascata de sinalização intracelular que culmina na produção de melatonina. (Adaptado de Maronde e Stehle, 2007).

Quando a AANAT está fosforilada ocorre a sua ligação com a proteína 14-3-3 zeta, ligação essa que se dá através do sítio da enzima fosforilado pela PKA, formando então, um complexo AANAT-14-3-3 (GANGULY et al., 2001). A estimulação adrenérgica induz também a síntese de fatores de transcrição negativos na glândula pineal, sendo um dos mais importantes o ICER (“inducible cAMP early repressor”), que tem um papel inibitório mais tardio da transcrição do gene da AANAT. O RNA mensageiro do ICER exibe um ritmo circadiano na pineal do rato, com um pico na segunda metade da noite, precedendo o declínio da síntese de melatonina. Além do ICER, o AMPc estimula a síntese de outros fatores de transcrição negativos, como o Fra-2 (“Fos-related antigen-2”) e JunB, que também poderiam estar promovendo a queda circadiana da atividade da AANAT (BALER; KLEIN, 1995; SPESSERT et al., 2000).

O passo final da produção de melatonina ocorre quando a enzima hidroxindol-O metiltransferase (HIOMT, também chamada de acetilserotonina-oximetiltransferase – ASMT) transforma a N-acetilserotonina (NAS) em melatonina (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

1.2 Enzimas da via de síntese de melatonina

1.2.1 Triptofano hidroxilase

A enzima TPH é a responsável pela conversão de triptofano em 5-hidroxitriptofano, enzima passo-limitante na síntese da serotonina e consequentemente na via de biossíntese da melatonina. Na glândula pineal do rato, a enzima TPH apresenta um ritmo circadiano de atividade, com valores mais elevados no período noturno, fazendo com que a síntese de 5-hidroxitriptofano concentre-se durante a noite. A concentração de triptofano na pineal é muito elevada, sendo maior do que em qualquer outra parte do sistema nervoso central. O transporte de triptofano no sistema nervoso central se dá através de um sistema de transporte de aminoácidos neutros, e assim, um sistema semelhante a esse poderia carregar o triptofano para o interior dos pinealócitos (GUTIERREZ et al., 2003; SUGDEN et al., 1989).

Esse aumento da atividade de cerca de 2 vezes durante a noite deve-se tanto à sua síntese aumentada, pela indução de transcrição gênica e síntese protéica, como à ativação da enzima por fosforilação (BESANÇON et al., 1996; SHIBUYA; TORU; WATANABE, 1977). A PKA, através da fosforilação da proteína CREB promove a transcrição da enzima TPH (EHRET, PEVET; MAITRE, 1991; SHEIN; WURTMAN, 1971). A fosforilação da TPH pode ser feita pela PKA, pela quinase dependente de cálcio e calmodulina (CaMK) e pela PKC (EHRET et al., 1989; EHRET; PEVET; MAITRE, 1991; JOHANSEN et al., 1995, 1996; SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

A regulação da atividade da TPH também ocorre pela associação com a proteína 14-3-3. A TPH fosforilada pela CaMK, PKC ou pela PKA liga-se à proteína 14-3-3, aumentando assim, a sua atividade e impedindo a sua desfosforilação (BANIK et al., 1997; ICHIMURA et al., 1987, 1995; KLEIN et al., 2003).

1.2.2 Arilalquilamina-N-acetiltransferase

A enzima AANAT é uma enzima instável e a manutenção de sua atividade depende de muitos fatores. O aumento da transcrição dessa enzima é em torno de cem a cento e cinquenta vezes o que repercute em uma maior quantidade da proteína e da sua atividade, que pode chegar a valores de dez a cem vezes superior àqueles registrados na fase clara do dia (ROSEBOOM et al., 1996). A elevação do mRNA da AANAT está condicionada ao início da

fase escura e, portanto, ao início da liberação de noradrenalina nos adrenoceptores α_1 e β_1 dos pinealócitos, reforçando a natureza endógena dessa oscilação (RIBELAYGA et al., 1999).

Quando cessa a estimulação simpática, ou se administram antagonistas adrenérgicos ou se submete o animal a uma fotoestimulação no meio da noite, a atividade da AANAT cai com uma meia vida de aproximadamente 3 minutos (DEGUCHI; AXELROD, 1972a; KLEIN; WELLER, 1972; KLEIN et al., 1978; PARFITT; WELLER; KLEIN, 1976). A presença da CREB fosforilada é muito importante também para a manutenção da atividade da AANAT, pois, quando a CREB é desfosforilada, se tem uma rápida queda na atividade da enzima (KLEIN; ROSEBOOM; COON, 1996; KOCH et al., 2003; ROSEBOOM; KLEIN, 1995; TAMOTSU et al., 1995).

A AANAT é uma enzima instável e, no rato, a partir da fosforilação pela PKA do subtipo 2 ocorre a sua ligação com a proteína 14-3-3, formando um complexo AANAT/14-3-3. Um importante regulador do complexo AANAT/14-3-3 é o nível de AMPc. Além desse mecanismo de proteção da AANAT, é importante ressaltar a importância da proteólise proteassomal na regulação da mesma. Essa associação com a proteína 14-3-3 é um mecanismo de proteção, para evitar a sua degradação por proteólise proteassomal (KLEIN et al., 2002).

Em 1999 caracterizou-se a presença de componentes da via da MAPK, como Raf1, Mek1 e as isoformas da MAPK que puderam ser encontradas nos pinealócitos. O aumento do GMPc, e a ativação da PKG pela NOR, contribui para a ativação dessa via (HO; HASHIMOTO; CHIK, 1999). Anos depois dessa constatação, viu-se que os membros da família da MAPK, como p42/44MAPK e p38MAPK, não só estão presentes na glândula, mas também contribuem para a regulação da atividade da AANAT (CHIK et al., 2004). Cada uma dessas proteínas supracitadas age de forma distinta na glândula pineal para a regulação da AANAT e síntese de melatonina. A p42/44MAPK é ativada de forma rápida e transiente pela via Nor/GMPc/PKG. A ativação dessa proteína pode contribuir para o aumento da atividade da AANAT. Já a p38MAPK é dependente da via Nor/AMPc/PKA e consequente aumento do Ca^{2+} intracelular. A p38MAPK é responsável por limitar a amplitude e duração da resposta da AANAT ao estímulo noradrenérgico, seja por diminuir a tradução ou aumentar a degradação da AANAT (HO et al., 2006).

1.2.3 Hidroxindol-O-metiltransferase (Acetilserotonina-oximetiltransferase)

A HIOMT, última enzima da via de síntese de melatonina, é uma enzima controversa e até hoje de difícil compreensão. Essa enzima pode ser regulada tanto por uma via adrenérgica, quanto por uma via peptidérgica. A atividade da HIOMT não é estimulada em curto prazo por noradrenalina, como já se viu para a AANAT, e nem por outras substâncias que regulam a síntese de melatonina, como o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), polipeptídeo ativador da adenilatociclase hipotalâmica (PACAP) e dibutiril AMPc (análogo do AMPc). Já o neuropeptídeo Y (NPY) é capaz de aumentar a atividade da HIOMT potencializando a síntese de melatonina. Esse efeito estimulatório se dá pelo influxo de cálcio na célula (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

A atividade da enzima HIOMT no período noturno apresenta um aumento de 1,5 vezes, enquanto o seu RNAm tem um aumento de 2 vezes (RIBELAYGA et al., 1999; SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

1.3 Moduladores da síntese de melatonina pineal

Autores demonstram que várias substâncias podem modular a síntese de melatonina. Uma dessas substâncias é a angiotensina, substância produzida pela astrogliá. A angiotensina é capaz de modular a atividade da enzima TPH1 via receptor angiotensina 1 (AT1), evidenciando a importância do sistema renina-angiotensina na glândula pineal, além de pôr em evidência a função neuromoduladora dos astrócitos que sintetizam o angiotensinogênio (precursor da angiotensina) (BALTATU et al., 2002).

A insulina também é uma dessas substâncias moduladoras. Ao se ligar ao receptor de insulina (IR) ela promove a fosforilação do receptor e de seu substrato (IRS-1), ativando o fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) que por sua vez aumenta a atividade da AANAT através de mecanismos pós-transcricionais, potencializando os efeitos produzidos pela NOR (GARCIA et al., 2008).

Outra substância é o neuropeptídeo Y, que liberado pelo folheto intergeniculado talâmico (IGL) e co-localizado com a NOR no terminal simpático, pode modular a síntese de melatonina. Este neurotransmissor age através de mecanismos pré-sinápticos através dos receptores Y₂ localizado no terminal simpático que inerva a glândula, modulando a liberação e disponibilidade de NOR. Pós-sinápticamente, age por meio dos receptores Y₁ situado na membrana do pinealócito, diminuindo o AMPc e conseqüentemente, diminuindo a síntese de

melatonina. Apesar dessa resposta o NPY é capaz de aumentar a atividade e o RNAm da HIOMT (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

O polipeptídeo ativador da adenilato ciclase hipotalâmica (PACAP) é liberado pelo gânglio trigeminal e o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) pelo gânglio pterigopalatino, ambos são responsáveis em aumentar a síntese de melatonina via receptores PAC₁/VPAC₁ que promove o aumento da adenilato ciclase, AMPc, atividade e RNAm da AANAT e RNAm da HIOMT (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

Além do envolvimento desses neurotransmissores na estimulação da produção de melatonina, outras substâncias estão envolvidas no mecanismo de inibição, como o glutamato. Para que essa substância seja liberada, viu-se necessário que a acetilcolina aja sobre receptores nicotínicos (nAchR), disparando então, o aumento da condutância de Na⁺ que acaba por despolarizar a membrana do pinealócito. Essa despolarização gera o aumento de Ca²⁺ intracelular através da abertura de canais de Ca²⁺ do tipo L dependente de voltagem. Esse aumento de Ca²⁺ promove a exocitose de vesículas contendo glutamato. Uma vez secretado, o glutamato tem uma ação parácrina ou autócrina, sobre o receptor mGluR3 que dispara uma cascata de sinalização levando a uma ação inibitória na síntese de melatonina, esses receptores estão acoplados a uma proteína Gi, fazendo com que diminua o AMPc, e, conseqüentemente, a síntese de melatonina (YAMADA et al., 1998).

1.4 Melatonina e suas propriedades

Existem outros locais de síntese da melatonina, tais como retina e sistema gastrointestinal, entretanto acredita-se que a melatonina sintetizada nestas regiões tem maior importância na modulação de fenômenos locais (ARENDT, 1995) e, em condições de normalidade fisiológica, não é lançada na circulação sistêmica.

Após a sua síntese, a melatonina pineal é imediatamente liberada na corrente sanguínea, não sendo armazenada na glândula. A melatonina plasmática circula ligada à albumina. Sua vida média circulante é de aproximadamente 20 minutos em ratos e 44 minutos em humanos (PANG; DUBOCOVICH; BROWN, 1993). Sendo que em uma única passagem pelo fígado, 90 % da melatonina é metabolizada sendo convertida em 6-hidroximelatonina, e então em 6-sulfatoximelatonina que é excretada na urina (REITER, 1991).

Os efeitos da melatonina ocorrem em diversos tecidos, através da sua interação com receptores de membrana de alta afinidade, tais como: MT1 e MT2, que possuem sete alças transmembrânicas e atuam em associação à proteína G_i, expresso em mamíferos (REPPERT;

WEAVER; GODSON, 1996). A melatonina também pode interagir com um fator transcricional RZR/ROR (GARCIA-MAURIÑO et al., 1997; KIM; WOO; LIM, 2008; STEINHILBER et al., 1995;). A expressão dos receptores de melatonina e RZR/ROR são difundidos dentro do organismo, sendo localizado nos tecidos periféricos e no sistema nervoso central, incluindo nos núcleos supraquiasmáticos (GILLETTE; McARTHUR, 1995; SMIRNOV, 2001).

A estrutura da molécula melatonina, com um núcleo indólico e grupamentos metóxi no carbono 5 e acil ligado ao nitrogênio do grupo amina, atribui-lhe características anfifílicas, fazendo com que ela possa difundir-se tanto em meios aquosos quanto lipídicos. Devido a essa propriedade, a melatonina pode ser encontrada em todos os compartimentos do organismo. Além disso, os seus carbonos 2 e 3 do anel pirrólico possuem alta capacidade de doar elétrons, permitindo que essa molécula apresente uma alta capacidade anti-oxidante sendo, inclusive, um dos agentes anti-oxidantes naturais mais importantes (TAN et al., 2002).

Além dessas ações mediadas por receptores, a melatonina, graças às características de difusibilidade discutidas acima, pode apresentar ações celulares não mediadas por receptores. Assim, ela pode agir regulando as enzimas reparadoras do DNA e as responsáveis pela integridade da cromatina como as histonas metil e acetilases (BURKHARDT et al., 2001); regula diretamente a ação de diversas enzimas (como as quinases dependentes da calciocalmodulina, a ciclooxigenase, etc) e possui também ação intra-mitocondrial, regulando o metabolismo oxidativo e o transporte de elétrons (REITER et al., 2004). A melatonina também é capaz de regular o processo de apoptose celular (MAYO et al., 1998) (Figura 4).

Figura 4 – Representação da molécula melatonina

Representação das características químicas da molécula de melatonina (adaptado de CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2008).

1.5 Treinamento físico

Por muitos anos, o exercício físico aeróbio tem sido utilizado para desempenhar um papel importante na manutenção da saúde. Sendo muito utilizado como uma intervenção barata, fácil e eficaz para a prevenção e tratamento de doenças crônicas degenerativas, tais como: diabetes, hipertensão e obesidade (AL SAIF; ALSENANY, 2015; WEI; LIU; ROSENZWEIG, 2015). Além disso, é capaz de promover adaptações fisiológicas importantes, dentre as quais podemos destacar: melhora significativa nas capacidades funcionais relacionadas com a captação e utilização do oxigênio via aumento da quantidade de capilares, hipertrofia seletiva das fibras do tipo I, aumento do conteúdo de mioglobina (PATTENGAL; HOLLOSZY, 1967), aumento do conteúdo de mitocôndria (HOLLOSZY; OSCAI, 1969; HOLLOSZY et al., 1970; OSCAI; HOLLOSZY, 1971; WINDER; BALDWIN; HOLLOSZY, 1974) maior aproveitamento dos ácidos graxos como fonte de energia, aumento da resposta lipolítica às catecolaminas (ENEVOLDSEN et al., 2001), ajuda a controlar a pressão arterial (PESCATELLO et al., 2004), melhora do perfil lipídico (KELLEY; KELLEY; TRAN, 2004) e aumenta a sensibilidade à insulina (BOULÉ et al., 2001).

Durante o exercício físico, os combustíveis metabólicos tornam-se disponíveis através de um sistema complexo, que envolve uma rápida mobilização das reservas de glicogênio e triglicerídeos, estimulada pela ativação do sistema nervoso simpático. Os triglicerídeos, que estão estocados no tecido adiposo, músculo e plasma, representam uma importante reserva energética para o corpo. Subjacente a esse aumento da capacidade do músculo em gerar ATP a partir do metabolismo oxidativo dos substratos, o exercício promove o aumento nos níveis das enzimas envolvidas na ativação da β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (MOLE; OSCAI; HOLLOSZY, 1971), assim como nas enzimas envolvidas no ciclo do ácido cítrico (DOHM et al., 1973; GOLLNICK et al., 1973; HOLLOSZY, 1970). O uso dos ácidos graxos como fonte energética a partir da hidrólise dos triacilgliceróis, durante o exercício, permite sustentar a atividade física e atrasar o início da depleção do glicogênio e, consequentemente, da hipoglicemia (JÉQUIER et al., 1997).

Além de participar da regulação glicêmica, o exercício também proporciona inúmeras adaptações agudas e crônicas sobre diversos sistemas corporais. No sistema cardiovascular o treinamento físico aeróbio induz um aumento na capacidade cardíaca máxima com a finalidade de aumentar a liberação de oxigênio e substratos metabólicos para os grupos

musculares em atividade e, ao mesmo tempo, manter a distribuição destes substratos para os órgãos vitais (EKBLOM et al., 1968; EKBLOM, 1969; RICHTER et al., 1998; SALTIN et al., 1968).

1.6 Diabetes, melatonina e exercício físico

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico complexo e primário dos carboidratos, que envolve, de forma secundária, os lipídeos e proteínas. É caracterizado por hiperglicemia resultante da perda progressiva da secreção ou da ação da insulina (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001). Pesquisas indicam que o número estimado de adultos vivendo com diabetes aumentou para 387 milhões, representando 8,3% da população adulta mundial. Este número deverá aumentar para 552 milhões de pessoas até 2030 (IDF, 2013).

Vale a pena ressaltar que ao falarmos de diabetes mellitus podemos destacar dois tipos principais, sendo o Tipo 1, que corresponde de 10 a 20% dos casos (MAAHS et al., 2010; IDF, 2013), e o Tipo 2, representando 80 a 90% dos casos (IDF, 2013). Esses dois tipos distinguem-se pela apresentação clínica, origem genética, patogênese, lesões das ilhotas pancreáticas e resposta à insulina (CANIVELL; GOMIS, 2014).

O diabetes Tipo 1, também conhecido como infanto-juvenil ou com início no crescimento, aparece com mais frequência em faixas etárias jovens (CRAIG et al., 2014; DABELEA et al., 2014). Resulta da deficiência parcial ou absoluta da secreção de insulina devido a uma diminuição das células β , muitas das vezes sendo por motivos autoimunes (DEVENDRA; LIU; ELISENBARTH, 2004). É sempre sintomático, manifestando-se por poliúria, polidipsia, emagrecimento, polifagia e cetoacidose (IDF, 2013). Devido a essa secreção de insulina diminuída faz-se necessário o uso de insulina exógena (WAJCHENBERG, 1992).

Os tratamentos clássicos em conjunto com as terapias não farmacológicas representam uma ferramenta eficaz na prevenção e no controle do diabetes mellitus. O treinamento físico aeróbio potencializa os efeitos do exercício sobre a sensibilidade insulínica, através de múltiplos fatores, incluindo aumento da massa muscular, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da capacidade das enzimas oxidativas mitocondriais e ativação do sistema de transporte de glicose (KOIVISTO; YKI-JARVINEN; DEFRONZO, 1986). Através de uma ação independente da insulina, o exercício exerce um papel fundamental no controle da glicemia, estimulando a captação de glicose, através da contração muscular, independente da ação da insulina (DEFRONZO; SHERWIN; KRAEMER, 1987; LUND et al., 1995;

WALLBERG-HENRIKSSON; HOLLOSZY, 1984). Além disso, o exercício é capaz de regular a via de sinalização insulínica, aumentando a sensibilidade e/ou responsividade ao hormônio durante e após a sessão de exercício, tanto em indivíduos saudáveis como em indivíduos resistentes à insulina (BRAUN; ZIMMERMANN; KRETCHIMER, 1995), o transporte de glicose e a expressão da proteína GLUT4 em células adiposas (STALLKNECHT et al., 1991) e no músculo esquelético (REYNOLDS et al., 1997). O exercício aeróbico tem sido considerado o exercício mais adequado para melhorar a sensibilidade à insulina, porém não é claro se a intensidade, duração ou frequência afeta esse efeito, sendo um fator a ser considerado quando for prescrever um programa de exercícios aeróbicos (KANG et al., 1996).

A literatura relata que o diabetes farmacologicamente induzido por aloxana ou estreptozotocina (STZ) diminui significativamente a síntese de melatonina pineal e plasmática em ratos (PANG; TANG; TANG, 1985). Em animais diabéticos por STZ, a queda significativa na síntese de melatonina pineal, é causada pela hiperglicemia, pois ocorre a diminuição da expressão do receptor beta adrenérgico, do AMPc, no conteúdo da proteína e atividade da AANAT na pineal (AMARAL et al., 2014).

Por outro lado, 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), potenciando a captação de glicose pelos tecidos periféricos, com consequente redução da atividade lipolítica e proteolítica, encontrada em animais com resistência a insulina e / ou quadro de diabetes já instalado (HA et al., 2006).

Além disso, tanto a suplementação com melatonina (AFECHÉ et al., 2008; CAMPOS et al., 2013) como o exercício físico (RIBEIRO et al., 2012; RICHTER et al., 1998), promove melhoras significativas no quadro do diabetes. Mas, os mecanismos fisiológicos de correlação entre ambos, ainda não estão muito esclarecidos.

1.7 Envelhecimento, melatonina e exercício físico.

A produção de melatonina é exclusivamente noturna e seu pico de concentração fisiológica na circulação de humanos e ratos é de cerca de 100 a 300 pM (REITER, 1991; ZALATAN; KRAUSE; BLASK, 2001), porém no processo fisiológico de envelhecimento a biossíntese de melatonina pela glândula pineal diminui, bem como os níveis do hormônio são significativamente menores na meia idade (PANG et al., 1990) (Figura 5). Karasek (2004) sugere que a melatonina, embora não possa ser reconhecida como um agente rejuvenescedor,

poderia ser utilizada como uma alternativa terapêutica em idosos, já que a diminuição de sua produção pode estar relacionada com a deterioração de muitos ritmos circadianos que desempenham um papel importante na homeostasia (como o ciclo sono/vigília, temperatura corporal, estado de alerta e a secreção de muitos hormônios) e com distúrbios do sono. Além disso, por ser um potente antioxidante, a diminuição da melatonina pode induzir, com a idade, um acúmulo de radicais livres, tendo repercussões não apenas no envelhecimento em si, mas também em diversas doenças relacionadas com a idade. A melatonina apresenta ainda, propriedades imunoestimuladoras. A imunossupressão está envolvida na aceleração dos processos de envelhecimento (GINALDI et al., 1999a, b, c; MAESTRONI, 2001).

Figura 5 - Variação ontogenética do perfil diário de melatonina

Variação da melatonina ao longo do envelhecimento mostrando a sua capacidade de ser, além de um marcador circadiano, um marcador ontogenético. KARASEK, 2004.

Dessa maneira, a diminuição dos níveis circulantes de melatonina pode levar a uma variedade de mudanças fisiológicas associadas com a idade (RASMUSSEN et al., 1999), como aumento da adiposidade, especialmente visceral, e dos níveis plasmáticos de insulina e leptina (BJORNTORP, 1995), intolerância à glicose, resistência insulínica, diabetes, dislipidemias e hipertensão (BODKIN et al., 1996; BUEMANN; TREMBLAY, 1996).

1.8 A controvérsia a respeito de exercício e síntese de melatonina

A síntese de melatonina é controlada, dentre outros fatores, pela noradrenalina liberada pelos terminais dos neurônios pós-ganglionares simpáticos (BROWNSTEIN; AXELROD, 1974). O exercício físico promove um aumento significativo na atividade dos neurônios simpáticos periféricos e, conseqüentemente, na liberação de noradrenalina (MCMURRAY et al., 1987). Uma hipótese seria que este aumento da atividade simpática periférica induzida pelo exercício físico poderia modular a liberação de noradrenalina pela inervação simpática da glândula pineal.

Há relatos na literatura mostrando que o exercício influencia a síntese de melatonina. Estudos realizados em humanos demonstram que o exercício físico sobre o perfil endógeno da secreção de melatonina tem sido controverso.

Em trabalho realizado por Carr e colaboradores foi verificado o efeito do treinamento físico aeróbico de alta intensidade na produção de melatonina de 7 mulheres. O exercício em bicicleta ergométrica por 1 hora foi realizado entre 13:00 e 18:00 e observou-se um aumento de 90% a 210% na melatonina plasmática durante o exercício quando comparado com o repouso. Também viu-se que 30 minutos após o término do exercício a melatonina plasmática retornou aos níveis basais (CARR et al., 1981), esse aumento no conteúdo de melatonina possivelmente ocorreu por uma estimulação simpática periférica.

Assim como Carr (1981), Theron, Oosthuizen e Rautenbach, (1984), tiveram resultados parecidos, porém o estudo foi realizado em homens. O exercício de subida em escadas em um ambiente controlado foi realizado entre 9:00 e 13:00 e causou um aumento nas concentrações rapidamente após o exercício. O exercício causou um aumento na concentração de melatonina que foi sempre maior nos participantes que realizaram exercício em uma sala escura (54 lux) do que nos indivíduos que realizaram em sala clara (320 lux). Vale a pena ressaltar de que o exercício, independente da condição de iluminação, foi realizado durante o dia (THERON; OOSTHUIZEN; RAUTENBACH, 1984).

Já Monteleone et al. (1990) observou o contrário. Em seu trabalho ele exercitou participantes homens às 22:40 (10 minutos a 50% da capacidade máxima seguido de 10 minutos a 80% da capacidade máxima) em sala com luminosidade controlada. Foi mensurada a concentração de melatonina noturna antes e depois do exercício. Os resultados claramente demonstram que ao contrário dos trabalhos anteriores, a concentração de melatonina foi significativamente menor do que os controles por aproximadamente 4 horas após o exercício, sem alterar a concentração de melatonina durante a noite (MONTELEONE et al., 1990).

O grupo do Monteleone verificou em outro trabalho o efeito do exercício agudo e da iluminação no meio da noite. O exercício foi realizado com homens às 23:40 (10 minutos a 50% da capacidade máxima seguido de 10 minutos a 80% da capacidade), porém às 23:10 os voluntários foram expostos a uma luminosidade de 2,500 lux, de tal maneira que 30 minutos após essa exposição a melatonina plasmática estava em um nível mínimo de detecção. Os autores concluíram que o exercício não altera a concentração de melatonina plasmática. (MONTELEONE et al., 1992). No entanto, fica difícil de separar, com esse esquema experimental, o efeito do exercício do efeito da luz.

Logo após os resultados de Monteleone et. al. (1990 e 1992), Yaga et al. (1993), estudaram os mecanismos responsáveis pelo qual o exercício induz a diminuição da concentração de melatonina em ratos. Foram utilizados ratos Sprague-Dawley (80g – 100g) em um ciclo de luminosidade estabelecido (14 horas no claro e 10 horas no escuro). Foram estudados 3 grupos: controle, nadadores e expostos à luz. O exercício de natação foi realizado por 15 ou 30 minutos, e foi observado que o conteúdo de melatonina plasmática e na glândula pineal foi reduzida depois do exercício. Apesar desse resultado, não foi observada mudança na enzima passo limitante para a síntese de melatonina, a AANAT (arilquilamina-N-acetiltransferase), dos animais treinados. Diferentemente, os animais expostos à luz apresentaram tanto a síntese de melatonina, quanto a atividade da AANAT reduzida (YAGA et al., 1993).

No mesmo ano que Yaga et al. 1993, os pesquisadores Elias, Wilson e Pandian, 1993, investigaram os efeitos do exercício agudo em 7 homens saudáveis que foram submetidos a um teste ergométrico de exaustão. Eles concluíram que o exercício extenuante e agudo de duração relativamente curta realizado pela manhã entre 9:30 e 10:00 horas, não altera as concentrações de melatonina plasmáticas (ELIAS et al., 1993).

Poucos anos depois, Buxton et al. (1997) avaliaram o efeito de diferentes intensidades de exercício físico aeróbio realizado a noite sobre o conteúdo de melatonina plasmática. Foram estudados 8 homens saudáveis em três condições, sendo: sem fazer exercício, fazendo exercício em baixa intensidade (40% - 60% do volume de oxigênio máximo -VO2 Max.) das 23:30 horas até 2:30 horas (duração de 3 horas) e em maiores intensidades (75% do VO2 Max. por uma hora) das 00:30 horas às 1:30 horas. E neste estudo eles verificaram que o exercício de baixa intensidade não influenciou os níveis de melatonina plasmática, porém em exercícios mais intensos houve um aumento agudo nos níveis de melatonina (BUXTON; HERMITE-BALERIAUX; HIRSCHFELD, 1997).

Em um trabalho feito com atletas de elite durante uma competição, Lucia et al. (2001) estudou 9 atletas de ciclismo de classe mundial, durante um estágio na Espanha (tour of Spain) que durou três semanas. Nesse estudo foi verificado o metabólito da melatonina (6-sulfatoximelatonina) na urina dos atletas antes de começar a competição (basal) e nas três semanas de competição. A urina foi coletada no começo do dia (primeiro jato de urina) e após o dia de competição. Neste estudo eles observaram que ao longo da competição a 6-sulfatoximelatonina após o dia de competição (referente a produção diurna durante o exercício) foi maior que ao amanhecer (referente a produção noturna), mostrando que a melatonina produzida durante o exercício físico extenuante de resistência de aproximadamente 7 horas por dia foi maior do que a melatonina noturna. Porém ambas foram diminuindo ao longo da competição (LUCIA et al., 2001).

Em um estudo mais recente Uzun et al. (2012), verificou o efeito do exercício físico de natação sobre o conteúdo de melatonina plasmática em ratos Sprague-Dawley em três momentos: imediatamente após o término de 30 minutos de natação, 24 horas e 48 horas após o término do exercício. Em conclusão, eles verificaram que imediatamente após o término do exercício houve uma diminuição do conteúdo de melatonina, 24 horas após o término o conteúdo de melatonina dobrou e 48 horas após os níveis voltaram aos valores basais. (UZUN et al., 2012).

Através da análise desses trabalhos nota-se que há muitas diferenças entre eles, desde os protocolos de treinamento até horário do dia que foram realizados, pois em alguns trabalhos os indivíduos foram submetidos ao treinamento no começo do dia, enquanto em outros foram na madrugada. Além disso, outra variável a ser considerada é a análise da melatonina em diferentes momentos do dia, não havendo então uma padronização de horários nem do protocolo de treinamento (intensidade, duração e horário) e nem da coleta dos dados.

2 JUSTIFICATIVA

Como mencionado, os resultados dos estudos sobre os efeitos do exercício sobre a síntese de melatonina são controversos.

Sabendo-se que a síntese de melatonina é controlada pela noradrenalina e o exercício promove um aumento significativo da liberação desse neurotransmissor, pode ser que esse aumento na liberação de noradrenalina (e a adrenalina medular adrenal) periférica pelo exercício altere os níveis desse neurotransmissor no interstício da glândula pineal, modulando a intensidade da síntese da melatonina ou sua temporização diária. Além disso, o exercício poderia também influenciar a expressão gênica dos adrenorreceptores na membrana nos pinealócitos. Com isso, nota-se a importância da realização de um trabalho nessa área, utilizando protocolos de exercício físico definidos e que respeitem o ciclo de atividade dos animais. Adicionalmente, sabendo-se que o envelhecimento e o diabetes tipo 1 reduz significativamente a síntese de melatonina pineal, testou-se a possibilidade de o treinamento físico modular ou não sua a síntese.

3OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Investigar os efeitos e os mecanismos moduladores do treinamento físico aeróbio sobre a síntese de melatonina em animais sob várias condições (jovens saudáveis, animais idosos e animais diabéticos tipo 1 não tratados).

3.2 Objetivos Específicos

- Dosar a concentração de melatonina na glândula pineal;
- Estudar a atividade da enzima *Aanat*;
- Investigar a expressão gênica das enzimas envolvidas na síntese de melatonina, assim como dos receptores adrenérgicos (β_1 , α_1).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar. Os animais foram alojados no Biotério do Laboratório de Neurobiologia, em caixas coletivas, sob condições de temperatura ambiente controlada de 23 ± 2 °C e ciclo de iluminação claro/escuro 12/12 h. Todos os animais receberam ração balanceada padrão (Nuvital®) e água “*ad libitum*”.

Os animais foram divididos em dois grandes grupos, sendo que um realizou o protocolo de 8 semanas e o outro realizou o protocolo de 5 semanas. Essa divisão foi feita levando em consideração que os animais diabéticos não receberam tratamento com insulina, impossibilitando a realização de um protocolo longo de 8 semanas. Os grupos que realizaram o protocolo de 8 semanas foram divididos em:

1) Adultos sedentários (AS);

2) Adultos treinados (AT).

Com aproximadamente 3 meses de idade e aproximadamente 200g.

3) Idosos sedentários (IS);

4) Idosos treinados (IT).

Com aproximadamente 16 meses de idade e aproximadamente 550g.

Os grupos que realizaram o protocolo de 5 semanas foram divididos em:

5) Controles sedentários (CS);

6) Controles treinados (CT);

7) Diabéticos sedentários (DS);

8) Diabéticos treinados (DT).

Todos com aproximadamente 3 meses de idade e aproximadamente 200g.

4.2 Procedimento experimental para indução do diabetes

Os animais foram pesados e a dose da droga foi calculada de acordo com o peso. 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 para que nenhum animal recebesse 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.

4.3 Protocolos de treinamento

Para avaliar os efeitos do treinamento físico na síntese de melatonina pineal, foram utilizados 2 protocolos. O primeiro teve a duração de 8 semanas (5 vezes por semana) e foi realizado em esteira ergométrica programável (Imbramed, mod. K3000, São Paulo, SP., Brasil), adaptada para treinar 8 ratos simultaneamente. O protocolo utilizado foi o de Dufloth, Michelini e Morris (1997), adaptado de Negrão et al. (1992). Os animais adultos treinados (AT) e idosos treinados (IT) realizaram esse protocolo (Tabela 1) (Figura 6).

Tabela 1 – Protocolo de treinamento de 8 semanas

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8
Velocidade (Km/h)	0,5	0,6	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,0
Tempo (min)	30	40	50	50	60	60	60	60

Adaptado de Negrão et al. 1992.

O segundo protocolo utilizado foi de 5 semanas de treinamento, sendo uma adaptação do protocolo de 8 semanas. Onde os animais controle treinados (CT) e diabéticos treinados (DT), realizaram esse protocolo (Tabela 2) (Figura 6).

Tabela 2 – Protocolo de treinamento de 5 semanas

Semana	1	2	3	4	5
Velocidade (Km/h)	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Tempo (min)	15	30	40	60	60

Adaptado por serem diabéticos.

Primeiramente, todos os animais foram selecionados de acordo com o seu peso, de forma que a média do peso entre os grupos fosse a mesma. Antes de começar o período de

treinamento, os ratos do grupo treinado passaram por uma semana de adaptação na esteira (Figura 6) durante 15 minutos uma vez por dia, sendo 5 minutos nas velocidades baixas de 0,3, 0,4 e 0,5 Km/h. Após este período, ocorreram aumentos graduais da intensidade de esforço definida por tempo de exercício e velocidade de esteira, conforme indicado nos protocolos.

Deve-se ressaltar que os animais foram treinados sempre na fase de escuro do ciclo de iluminação ambiental, por ser o período circadiano de atividade dessa espécie, casualizando-se o horário do treinamento ao longo das 12 h de escuro para que a atividade física programada não fosse um sincronizador circadiano capaz de modificar os eventos rítmicos biológicos. No último dia do protocolo os animais foram treinados de acordo com o horário da sua eutanásia no dia seguinte, respeitando assim um período de descanso de 24hrs.

4.4 Eutanásia

A eutanásia dos animais ocorreu após 24 h do término da última sessão do protocolo de exercício em diferentes ZTs. O *Zeitgeber Times* (ZTs) é uma padronização dos horários do ciclo circadiano (ciclo claro-escuro, de 12 h/12 h). O ZT12 é o momento da transição do claro para o escuro (independentemente do horário civil em que o biotério apague ou acenda suas luzes), o ZT15 corresponde a 3 h após essa transição, e assim por diante (figura 6).

Figura 6 – Representação circadiana dos ZTs

Representação do *Zeitgeber Times* (ZTs) ao longo das 24 horas e sua relação com o ciclo claro/escuro.

Os grupos de animais AS e AT, foram eutanasiados por decapitação a cada 3 h ao longo das 12 h da fase escura para análise do perfil diário de produção de melatonina (Figura 7A). Os grupos CS, CT, DS e DT foram eutanasiados nos ZTs 18 e 21 (Figura 7B). Os grupos IS e IT foram eutanasiados no ZT 18 (Figura 7C). Todos os tecidos de interesse foram imediatamente colocados em gelo seco e depois armazenados em congelador a -80 °C.

Figura 7 – Esquema do desenho experimental

A) grupo AT: primeira semana de adaptação seguida por 8 semanas de treinamento. Após esse período os animais ficaram 24 horas sem manipulação e foram eutanasiados nos ZTs: 12-15-18-21-24. B) grupo CT e DT: primeira semana de adaptação seguida por 5 semanas de treinamento. Após esse período os animais ficaram 24 horas sem manipulação e foram eutanasiados nos ZTs: 18 e 21. C) grupo IT: primeira semana de adaptação seguida por 8 semanas de treinamento. Após esse período os animais ficaram 24 horas sem manipulação e foram eutanasiados no ZT 15, 18, 21.

4.5 Dosagens plasmáticas

O procedimento para aferição da glicemia consistiu em obter uma gota de sangue da ponta da cauda dos animais e colocá-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 s de análise. A glicemia dos animais foi avaliada em três momentos. O primeiro deles ocorreu um dia após a indução do diabetes, para a constatação da instalação de tal condição e identificação dos animais com glicemia inferior a 200 mg/dL, que foram reinjetados com STZ. O segundo momento corresponde ao dia seguinte à reindução, para o estabelecimento da permanência dos animais diabéticos e retirada

daqueles que não se enquadravam. Depois disso eles ficaram dois dias sem serem manipulados (figura 8).

Figura 8 – Esquema de indução do diabetes

Figura representando o esquema temporal de indução do diabetes.

A maioria dos registros no glicosímetro apontava para uma glicemia “High”, o que foi considerado, equivalente a uma concentração de 500 mg/dL ou mais, já que esse é limite máximo de detecção de acordo com as informações fornecidas pela fabricante do aparelho.

A concentração de triglicérides e colesterol nos diferentes grupos também foi determinada por meio de amostras de sangue coletadas da cauda dos animais, utilizando-se tiras reagentes específicas (Accutrend® Triglycerides, USA e Accutrend® Cholesterol, USA) que foram conectadas ao aparelho Accutrend® Plus (USA), que informa os níveis de triglicérides após 2 min e de colesterol, 3 min.

Todas as dosagens foram realizadas na primeira e última semana do período experimental, entre o ZT11 - 12.

4.6 Determinação da massa corporal

Todos os animais foram pesados em balança digital antes e após o protocolo de treinamento.

4.7 Teste do esforço máximo

A eficiência do protocolo de treinamento físico foi avaliada por meio do teste de esforço máximo, realizado no início e ao fim deste protocolo. O teste consistiu em exercício graduado na esteira com acréscimos da velocidade em 0,3 km/h por 3 min, sendo esta carga incrementada em 0,3 km/h a cada 3 min até que o animal atingisse a exaustão. Este teste foi

adaptado de Borges-Silva et al., (2007). E vale ressaltar que só os animais treinados realizaram esse procedimento.

4.8 Dosagem de melatonina por cromatografia líquida de alta resolução

Para a determinação da melatonina foi empregado um sistema de Cromatografia Líquida de alta resolução Ultimate 3000 - Dionex (Sunnyvale, CA, EUA) composto por Bomba Quaternária, Injetor Automático com refrigeração de amostras, sistema de termostatização de colunas e detector eletroquímico Coulochem III composto de cela guarda 5020 e cela analítica amperométrica 5041 com eletrodo de carbono vítreo. O sistema foi controlado pelo software Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, CA, EUA).

As glândulas pineais retiradas no momento da eutanásia e congeladas para posterior análise foram homogeneizadas separadamente em 60 μ L de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 7,9) preparado com a adição de um coquetel de inibidores de protease (Mini-complete livre de EDTA, Roche Applied Science, Indianápolis, IN, EUA). A homogeneização foi feita com o auxílio de um pistilo de plástico e com o tubo sempre no gelo para evitar a degradação das amostras. Com o objetivo de aperfeiçoar o uso das glândulas, alíquotas foram separadas e utilizadas para realização de mais de uma técnica com material proveniente da mesma pineal, sendo estas a dosagem de melatonina e a aferição radiométrica da atividade da AANAT.

Para dosagem de melatonina, 35 μ L de uma solução de ácido perclórico 0,1 M, 0,15 mM de EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02% foram adicionados a 35 μ L do preparado com a glândula homogeneizada. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 13.000 g (Eppendorf 5415C Centrifuge, Hamburg, Alemanha) e os sobrenadantes foram transferidos para placas de 96 poços para injeção no sistema de cromatografia. Como fase móvel foi usada uma solução contendo tampão acetato de sódio 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M, EDTA 0,15 mM e metanol a 30%, pH 3,7. As cromatografias realizadas foram de fase reversa, o sistema foi operado isocraticamente com fase móvel com fluxo de 0,135 mL/min, potencial de oxidação de +700 mV e corrida com 10 minutos de duração.

As soluções-estoque do padrão de melatonina (1 mM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) foram preparadas em solução de HCl 0,1 M acrescida de EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02%, e transferidas para tubos de microcentrífuga, sendo mantidas em congelador a -80 °C. No momento de sua utilização, uma amostra do padrão de melatonina foi descongelada e diluída em solução de ácido perclórico 0,1 M acrescido de

EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02% para obtenção das concentrações desejadas. Todos os reagentes utilizados possuíam grau de pureza adequado para HPLC.

Curvas de calibração com 7 concentrações diferentes e conhecidas (0,145 a 9,28 ng/40 µL) foram utilizadas para a quantificação da melatonina presente nas amostras. As curvas de calibração foram obtidas através do programa Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, CA, EUA) pela relação das concentrações de cada padrão com as áreas dos picos correspondentes dos cromatogramas. A identificação da melatonina das amostras foi realizada pela comparação do seu tempo de retenção com aqueles dos padrões conhecidos e a quantificação obtida pelo mesmo programa computacional.

4.9 Análise radiométrica da atividade da AANAT

Para o ensaio de atividade da AANAT foram utilizados 25 µL provenientes das alíquotas dos preparados homogeneizados da glândula pineal, destinados a dosagem de melatonina por HPLC.

O método baseia-se na quantificação da N-[³H] acetiltriptamina que é o produto da reação da [³H] acetil-coenzima A ([³H] acetil CoA) e da triptamina, como uma indicação da atividade da enzima N-acetiltransferase. O produto marcado foi extraído em clorofórmio e medida a sua radioatividade (DEGUCHI; AXELROD, 1972b; adaptado por PARFITT et al., 1975).

Para isso, foram adicionados aos tubos de microcentrífuga, contendo 25 µL glândula pineal homogeneizada, 25 µL de triptamina (40 mM), 25 µL de [³H] acetil CoA (2 mM, atividade final= 4 mCi/ mmol) e 50 µL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH= 6,8), mantidos no gelo. Em seguida, em cada amostra foi acrescentado 1 µL de clorofórmio saturado com água, agitados por 1 min. Para a separação completa das fases aquosa e lipossolúvel, as amostras foram centrifugadas por 40 seg, a 14.000 rpm.

A fase aquosa foi removida e foi acrescentado 200 µL do tampão fosfato. Novamente as amostras foram agitadas, centrifugadas e a fase aquosa foi removida. A seguir, 500 µL do clorofórmio contendo o produto da reação (³H-N-acetiltriptamina) foram transferidos para o tubo de cintilação. Após a evaporação total do clorofórmio contendo o produto da reação, o líquido de cintilação para amostras não aquosas (Optiphase Hisafe - PerkinElmer) foi acrescentado e a radioatividade medida em contador β (Beckman – LS 6500), incluindo os brancos e totais.

4. 10 Extração de RNA

Para que fosse realizada a extração do RNA, as glândulas foram descongeladas em gelo seco, evitando a degradação do RNA. Em seguida cada glândula foi homogeneizada em 800 µL de Trizol® Reagente (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) com o auxílio de um pistilo. Esse macerado foi deixado durante 5 min em temperatura ambiente. A seguir foi adicionado em cada amostra 160 µL de clorofórmio, e as mesmas foram submetidas a homogeneização no Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, EUA). Essa mistura foi deixada mais uma vez em temperatura ambiente durante 10 min e levada para a centrifuga refrigerada (5417R, Eppendorf, Alemanha) durante 15 min a 4 °C e em uma velocidade de 12000 g. Em seguida, o sobrenadante aquoso foi transferido para uma nova série de tubos Eppendorfs® com 1 µg glicogênio. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente e nelas foi acrescentado 400 µL de isopropanol, após mistura por inversão, cada amostra foi acondicionada a -20 °C, por um período de até 12 h.

Após esse período, as amostras foram levadas para a centrífuga durante 20 min a 4 °C e em uma velocidade de 12000 g, para a formação do precipitado. Após a centrifugação jogou-se fora o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado restante 800 µL de álcool etílico (EtOH) gelado a uma concentração de 75%. E mais uma vez as amostras foram levadas à centrífuga durante 10 min a 4 °C em um velocidade de 12000 g. O precipitado foi localizado e o sobrenadante descartado, as amostras foram deixadas por 10 min em temperatura ambiente, para que o álcool anteriormente adicionado evaporasse por completo. Após esse período, foi adicionado em cada amostra 12 µL de H₂O deionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) para dissolução do precipitado. As amostras sofreram rápida centrifugação e foram deixadas por mais 10 min em temperatura ambiente, para que houvesse certeza de que o precipitado foi dissolvido. A seguir as amostras foram armazenadas a -20 °C.

Após a extração de RNA, as amostras sofreram tratamento com DNase, utilizando-se o kit Turbo DNA-free™ (Ambion, Austin, Texas, EUA). Como o volume final da amostra foi de 12 µL, adicionou-se à própria amostra 1 µL da enzima Turbo DNase e 2 µL de Tampão Turbo DNase. As amostras foram misturadas por inversão e levadas à centrífuga para uma rápida centrifugação. Após foram deixadas a 37 °C por 30 min. Em seguida foram imediatamente colocadas em gelo e sofreram a adição de 2,2 µL do reagente de inativação do kit. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 2 min, homogeneizadas por inversão e centrifugadas por 1 min à velocidade de 10000 g. Após esse período, o

sobrenadante foi transferido para uma nova série de tubos Eppendorfs® e o precipitado foi descartado.

As amostras livres de DNA foram quantificadas no NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, EUA). Os dados obtidos a partir dessa análise foram utilizados para calcular o volume necessário da amostra oriunda da extração de RNA total, para que houvesse uma concentração de 1 µg/µL de RNA em um volume final de 10 µL.

4.11 Obtenção de cDNA

Após esse procedimento as amostras sofreram a reação de transcriptase reversa pelo kit SuperScript™ III Antisense Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) para a obtenção de cDNA. Adicionou-se então à amostra 1 µL de dNTP mix e 1 µL de random primers, tendo portando como volume final 12 µL. Essas amostras foram colocadas no termociclador MyGene™ Series Gradient Thermal Cycler (LongGene®, EUA) que foi programado de acordo com as seguintes especificações de ciclo descritas pelo fabricante do kit: 65 °C por 5 min, retirou-se as amostras do aparelho e as mesmas foram postas em gelo durante 1 min e adicionou-se em cada amostra 8 µL de um mix previamente preparado. Foram recolocadas no termociclador a 25 °C por 5 min, depois a 50 °C por 60 min e por fim 70 °C por 15 min para a desnaturação da enzima. O mix continha para cada amostra: 4 µL de tampão de enzima, 2 µL de DDT, 1 µL de transcriptase reversa e 1 µL de H₂O estéril.

Ao término da reação as amostras foram armazenadas a -20 °C.

4.12 Análise quantitativa da expressão gênica por reação de cadeia em polimerase (PCR) em tempo real

As amostras foram descongeladas em gelo e diluídas dez vezes em água Ultra-Pure™ Distilled Water (Gibco, EUA) para que chegassem à concentração de 5 ng/µL de cDNA. Para a preparação das placas utilizadas na corrida de PCR em tempo real foram pipetados em cada poço 2 µL de amostra e também 10,5 µL do mix, composto por: 6,25 µL de Power SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), 3,25 µL de água Ultra-Pure, 0,5 µL de cada primer (sense e antisense) com concentração de 10 µM, por cada gene investigado (volume final por poço de 12,5 µL).

Os primers usados foram desenhados de modo que sua localização lhes permitisse flanquear um íntron, impossibilitando a amplificação de DNA genômico. A eficiência dos

pares de primers foi testada e determinada por reação de PCR em tempo real utilizando diluições (10^7 a 10^2 cópias dos respectivos fragmentos clonados, nas mesmas condições e com o mesmo aparelho usado para todas as outras análises que se seguiram). A eficiência dos primers se deu pela análise da regressão linear feita utilizando o software 7500 versão 2.0.3 (Applied Biosystems, EUA). Os seguintes primers foram utilizados: *gama actina*, *hadac 1*, *B-actina*, *Aanat*, *proteína ribossomal R37a (Rpl37a)*, *Hiomt*, *Receptor adrenérgico beta 1 (Adrab1)*, *Receptor adrenérgico alfa 1b (Adra1b)*, os quais foram desenhados a partir da sequência genômica de rato disponível no GenBank® (NCBI – NIH, EUA), e fabricados por IDT. A sequência genômica dos primers utilizados se encontra na tabela.

Tabela 3 - Sequência dos primers utilizados.

Primer	Nº Acesso	Sequências	Fragmento
<i>rHdac 1</i>	NM_001025409.1	5' - TGG TCT CTA CCG AAA AAT GGA AA - 3' 5' - GTC GTC GCT GTG GTA CTT GGT - 3'	72bp
<i>B-actina</i>	NM_031144	5' - CTAGGAGCCAGGGCAGTAATCT - 3' 5' - AAGACCTCTATGCCAACACAGTG - 3'	97bp
<i>Rpl37a</i>	NM_001108801	5' - CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG - 3' 5' - GCCACTGTTTTTCATGCAGGAAC - 3'	93bp
<i>Aanat</i>	NM_012818.2	5' - CCGGAGGATGCCACCA - 3' 5' - CCGGATCTCATCCAAGTGGA - 3'	89bp
<i>Asmt/Hiomt</i>	NM_144759.2	5' - TGCCCGCACCCACTTCCTGTC - 3' 5' - GACCCGGGCAAGAATGAAGAG - 3'	112bp
<i>Adrab1</i>	NM_012701	5' - TCTCCGCGCTGGTGTCCCTTC - 3' 5' - GAAATCGCAGCACTTGGGGTC - 3'	101bp
<i>Adra1b</i>	NM_016991	5' - GGGTCTACATCGTGGCCAAGA - 3' 5' - CCTCATGAAAGTTCTTGGAGTGGA - 3'	80bp

Nessa tabela estão listados os primers utilizados, desenhados a partir das informações obtidas pela GenBank™ (NCBI – NIH, Bethesda, EUA), sendo informados também as sequências sense e antisense, além do tamanho dos fragmentos amplificados.

Fonte: NCBI – NIH, Bethesda, EUA.

Em cada placa, também foi adicionado um poço denominado normalizador. Esse poço continha a mesma amostra de cDNA (no caso extraído de fígado) em todas as placas, afim de se manter um controle entre placas. Além disso, a quantificação absoluta qPCR foi permitida devido a preparação de uma curva de DNA padrões para cada gene investigado, obtido a

partir de clonagens e com um número de moléculas conhecido. Essa curva foi composta por valores de 10^2 a 10^6 moléculas.

Depois de pipetadas as amostras, a curva de padrões, a amostra controle e o normalizador o mix supracitado foi adicionado, e então as placas foram seladas e centrifugadas por 1 min em velocidade de 500 rpm. Após esse período foram levadas para o aparelho de PCR em tempo real 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA).

Para a amplificação do material contido na placa, foram utilizados os seguintes parâmetros: etapa inicial de ativação da enzima mantendo as amostras à 50 °C durante 1 min e 95 °C por 10 min. Em seguida as amostras foram submetidas a 40 ciclos que incluíram a desnaturação à 95 °C por 15 s, seguido por anelamento dos primers e a extensão a 60 °C por 1 min. Finalmente após essa série de ciclos, as amostras foram submetidas à 1 ciclo para análise do *melting* que consistiu em 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min e posterior aumento gradativo da temperatura até atingir 95 °C.

As curvas de melting e a quantificação do número de cópias de cada gene foram determinados pelo próprio software do equipamento.

A quantificação de número de cópias se baseia do método de derivação secundária, que se baseia na comparação entre o valor de amplificação de cada amostra, com a curva de padrões composta de diluições de plasmídeos recombinantes contendo cópias clonadas dos genes de interesse.

Os resultados obtidos das amostras após a reação de polimerase em cadeia em tempo real foram normalizados pela média entre os três genes constitutivos: *Hdac1*, *Rpl37a* e *β -actina*.

4.13 Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada usando-se, quando conveniente, teste T monocaudal, ANOVA de uma via e ANOVA de duas vias. As eventuais diferenças encontradas foram avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni, prefixando-se o nível de significância em 95% ($p < 0,05$). Os valores estão representados como média $\pm$ E.P.M (erro padrão da média). Os testes estatísticos e gráficos foram realizados usando-se o programa GraphPad Prism, v.5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Grupos adultos saudáveis sedentários e treinados – protocolo de 8 semanas

Os animais foram pesados no início e no término do protocolo de exercício realizado nesse estudo. E não houve diferença significativa do peso entre os grupos antes do treinamento. Ao término do protocolo foi observado um aumento significativo no peso dos animais sedentários comparado com os animais treinados (Figura 9).

Figura 9 – Peso dos animais adultos

Peso dos animais antes e depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. * $p < 0.001$. $n = 50$.

Fonte: Do próprio autor

Os animais treinados foram submetidos ao teste de exaustão no início e fim do protocolo de treinamento, para que a eficácia do protocolo de treinamento físico fosse avaliada. Como esperado, constatou-se que houve melhora significativa no condicionamento físico dos animais após o treinamento (Figura 10).

Figura 10 – Teste de exaustão

Teste de exaustão no grupo treinado antes e depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado pelo teste T monocaudal. * $p < 0.0001$. $n = 16$.
 Fonte: Do próprio autor

Para verificar a influência do treinamento físico na síntese de melatonina, mensurou-se a sua quantidade, em glândulas pineais coletadas em diferentes grupos de animais ao longo do escotoperíodo. Não houve diferença na quantidade de melatonina, entre os dois grupos, em qualquer dos ZTs estudados (Figura 11).

Figura 11 – Conteúdo de melatonina na glândula pineal

Conteúdo de melatonina em glândulas pineais de animais sedentários ou treinados. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. Nos ZTs 12, 15 e 24, $n=17$ e nos ZTs 18 e 21, $n=20$, por grupo.

Fonte: Do próprio autor

Uma vez que não foram vistas alterações nos níveis de melatonina, investigou-se a atividade da enzima passo limitante de sua síntese, a arialquilamina-N-acetiltransferase (AANAT) e que, também, não mostrou diferença entre os grupos (Figura 12).

Figura 12 – Atividade enzimática da AANAT

Análise da atividade da AANAT na glândula pineal dos animais do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. $n=5$, por ZT, por grupo.

Fonte: Do próprio autor

5.2 Grupos controles e diabéticos – protocolo de 5 semanas

Os animais foram pesados antes e depois do protocolo adaptado realizado nesse grupo. E não houve diferença significativa do peso entre os grupos antes do treinamento. Após o término do protocolo foi observado um aumento significativo no peso dos animais controles comparado com os animais diabéticos (Figura 13).

Figura 13 – Peso dos animais controles e diabéticos

Peso dos animais antes e depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. $n=8$. * vs CS; # vs CT ($p<0.001$).

Fonte: Do próprio autor

Os animais treinados foram submetidos a um teste de exaustão para que a eficácia do protocolo de treinamento físico adaptado fosse avaliada. Houve melhora significativa no condicionamento físico dos animais após treinamento. Os animais diabéticos tiveram um desempenho igual ao grupo controle (Figura14).

Figura 14 – Teste de exaustão dos animais CT e DT

Teste de exaustão no grupo treinado antes e depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado ANOVA de duas vias.. * vs CT; # vs DT ($p<0.001$).

Fonte: Do próprio autor

A glicemia dos animais foi verificada antes e após o protocolo. A glicemia dos animais diabéticos foi significativamente maior ao decorrer de todo o protocolo. O treinamento não alterou a glicemia (Figura 15).

Figura 15 – Aferição da Glicemia

Glicemia dos animais antes e depois do protocolo de exercício. Valores expressos em mg/dl, representados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. $n=8$. * vs CS; # vs CT ($p<0.001$).

Fonte: Do próprio autor

O conteúdo de triglicérides foi maior nos grupos diabéticos em relação aos controles (Figura 16).

Figura 16 – Conteúdo de triglicerídeos plasmático

Triglicerídeos dos animais antes e depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por ANOVA duas vias. $n=8$. * vs CS; # vs CT ($p<0.001$).

Fonte: Do próprio autor.

Já o conteúdo de colesterol plasmático total não foi diferente entre os grupos durante todo o experimento (Figura 17).

Figura 17 – Conteúdo de colesterol plasmático total

Colesterol dos animais antes e depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por ANOVA duas vias. $n=8$.

Fonte: Do próprio autor

A atividade da enzima passo limitante na síntese de melatonina, a (AANAT), foi avaliada nos ZTs 18 e 21. Como mostrado na Figura 18, não foram observadas diferenças entre os grupos no ZT 18 (Figura 18).

Figura 18 – Atividade enzimática da AANAT no ZT 18

Análise da atividade da AANAT na glândula pineal. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. ($n=7$) para os CS e CT; ($n=10$) para os DS e DT.

Fonte: Do próprio autor.

Assim como o que foi visto no ZT 18, de acordo com a análise da atividade enzimática no ZT 21, não foram observadas diferenças entre os grupos (Figura 19).

Figura 19 – Atividade enzimática da AANAT no ZT 21

Análise da atividade da AANAT na glândula pineal. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. (n=7) para os CS e CT; (n=10) para os DS e DT.

Fonte: Do próprio autor

5.3 Grupo dos animais idosos

Os animais foram pesados antes e depois do protocolo de treinamento realizado nesse grupo. Os animais idosos treinados apresentaram uma redução significativa do peso após o treinamento (Figura 20).

Figura 20 – Peso dos animais idosos

Peso dos animais antes e após o protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. * $p < 0.05$. n=23

Fonte: Do próprio autor.

Como nos outros tratamentos, os animais idosos treinados foram submetidos ao teste de exaustão para que a eficácia do protocolo de treinamento físico fosse avaliada. Houve melhora significativa no condicionamento físico dos animais após treinamento (Figura 21).

Figura 21 – Teste de exaustão dos animais IT

Teste de exaustão no grupo treinado antes e depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado pelo teste T monocaudal. * $p < 0.0001$. $n = 8$.

Fonte: Do próprio autor.

A glicemia dos animais foi verificada antes e após o protocolo. Ao final do protocolo, viu-se que o exercício físico ao longo das 8 semanas foi capaz de promover a redução da glicemia dos animais idosos (Figura 22).

Figura 22 – Aferição da glicemia

Glicemia dos animais antes e depois do protocolo de exercício. Valores expressos em mg/dl, representados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. * $p < 0.05$. $n=8$.

Fonte: Do próprio autor

O conteúdo de triglicérides não foi diferente entre os grupos (Figura 23).

Figura 23 – Conteúdo de triglicerídeos plasmático

Triglicerídeos dos animais antes e depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por ANOVA duas vias. $n=8$.

Fonte: Do próprio autor

E também não houve diferença nos níveis de colesterol sanguíneo (Figura 24).

Figura 24 – Conteúdo de colesterol plasmático total

Colesterol dos animais antes e depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por ANOVA duas vias. $n=8$.

Fonte: Do próprio autor

Além desses parâmetros, investigou-se a atividade da AANAT, nos ZTs 15, 18 e 21. No ZT 15 observou-se que o não teve alteração na atividade enzimática. Com relação ao ZT 18, esse aumento foi significativo, ou seja, o treinamento físico aeróbio foi capaz de promover

o aumento da atividade da AANAT. E ao avaliar a atividade enzimática da AANAT no ZT 21, viu-se que o treinamento físico não foi capaz de alterar a atividade da AANAT nos animais pertencentes ao grupo idoso treinado (Figura 25).

Figura 25 - Atividade enzimática da AANAT dos animais idosos

Análise da atividade da AANAT na glândula pineal dos animais depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por ANOVA duas vias. $n=5$. * $p < 0.05$.

Fonte: Do próprio autor

A Figura 26 mostra a área sob a curva da atividade da AANAT, indicando um aumento nos valores do grupo idoso treinado.

Figura 26 – Área sob a curva da atividade da AANAT

Análise da área sob a curva da atividade da AANAT na glândula pineal dos animais idosos. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por teste T monocaudal. $n=5$. * $p < 0.003$.

Fonte: Do próprio autor

A expressão gênica foi realizada no ZT 18, pois foi onde a atividade da AANAT se mostrou alterada. Em relação a expressão gênica do receptor alfa adrenérgico, não houve diferença entre os grupos. Sendo assim, o aumento da atividade enzimática observada nesse ZT não se deve ao aumento da expressão gênica desse adrenoreceptor (Figura 27).

Figura 27 – Expressão Gênica do receptor alfa adrenérgico no ZT 18

Análise da expressão gênica do receptor alfa adrenérgico na glândula pineal dos animais depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por teste T monocaudal. $n=5$

Fonte: Do próprio autor

Porém, com relação a expressão gênica do receptor beta adrenérgico, os animais que foram submetidos ao treinamento apresentaram uma maior expressão, ou seja, o treinamento

aumento a expressão desse receptor, indicando uma possível resposta para o aumento visto na atividade enzimática nesse mesmo ZT (Figura 28).

Figura 28 – Expressão Gênica do receptor beta adrenérgico no ZT 18

Análise da expressão gênica do receptor beta adrenérgico na glândula pineal dos animais depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por teste T monocaudal. n=5
 Fonte: Do próprio autor

Viu-se que a atividade enzimática da AANAT no ZT 18 estava aumentada, e devido a isso decidiu-se avaliar se essa alteração vista a nível proteico também ocorreria a nível transcricional. Como mostrado na Figura 29, o exercício físico em animais idosos não promoveu o aumento da transcrição gênica dessa enzima passo limitante (Figura 30). Dessa forma infere-se que as alterações promovidas pelo exercício físico em idosos na regulação da atividade da AANAT se deva a mecanismos pós-transcricionais.

Figura 29 – Expressão Gênica da enzima AANAT no ZT 18

Análise da expressão gênica da enzima AANAT na glândula pineal dos animais depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por teste T monocaudal. $n=5$
Fonte: Do próprio autor.

Ainda com o intuito de avaliar se o treinamento físico em animais idosos seria capaz de alterar a transcrição das enzimas essenciais à síntese de melatonina, avaliou-se a expressão gênica da enzima HIOMT no mesmo ZT, e mais uma vez o exercício físico não foi capaz de alterar a transcrição gênica nesses animais (Figura 30).

Figura 30 – Expressão Gênica da enzima HIOMT no ZT 18

Análise da expressão gênica da enzima HIOMT na glândula pineal dos animais depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média $\pm$ E.P.M. Analisado por teste T monocaudal. $n=5$
Fonte: Do próprio autor

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi investigado o papel do treinamento físico aeróbio sobre a síntese de melatonina pineal. Antes do protocolo de exercício, os animais foram pesados e divididos entre os grupos (controle e treinado), de maneira homogênea e ao término do protocolo de exercício, o peso dos animais treinados foi menor que o dos animais controles o que era já era esperado. Alguns trabalhos demonstram que o treinamento físico melhora o perfil lipídico e reduz significativamente o tecido adiposo visceral nos animais treinados em relação ao controle sedentário (WAJCHENBERG, 2000), reduzindo o risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e melhorando a composição corporal destes animais e isso possivelmente justificaria a redução no peso observada nesses animais.

Ao final do protocolo experimental de oito semanas, os animais adultos treinados apresentaram um aumento da capacidade física quando comparado com o início do protocolo. Isto foi observado através do aumento do tempo e da velocidade de corrida até a condição de exaustão, indicando que o procedimento experimental utilizado é válido, uma vez que houve sinal de adaptação nos animais treinados.

Esse protocolo de exercício utilizado, validado para a melhora do desempenho, como mostrado acima, não alterou a síntese de melatonina pineal nos animais treinados, avaliada tanto pela dosagem da melatonina pineal quanto pela análise da atividade enzimática da AANAT, enzima passo-limitante da síntese de melatonina. Esses dados corroboram alguns dos achados da literatura (ELIAS et al., 1993; MIYAZAKI et al., 2001; YAGA et al., 1993).

Pode-se, portanto, concluir que o treinamento físico aeróbio crônico não altera a síntese de melatonina pineal em ratos adultos e saudáveis, quando realizado no período de atividade da espécie.

Os animais diabéticos apresentaram uma redução significativa do peso corporal ao longo do protocolo experimental. Sabe-se que o diabetes mellitus desencadeia importantes alterações no metabolismo, intensificando o processo lipolítico / proteolítico, com consequente perda de peso e surgimento de um quadro catabólico (FERRARA et al., 2006; KELLEY; KELLEY, 2007) o que justifica a perda de peso observada ao longo do protocolo experimental.

Nesses animais foi observado que o treinamento físico não foi eficaz em reduzir os níveis glicêmicos em relação ao seu controle diabético sedentário, pois o quadro glicêmico

desses animais é extremamente alto e, portanto, o exercício físico sozinho não seria capaz de melhorar esse quadro

Após o protocolo, foi observado que o conteúdo de triglicerídeos foi maior nos animais diabéticos e nos animais controles não houve alterações. Os animais diabéticos por estreptozotocina têm uma deficiência na produção de insulina e um aumento do glucagon, isso gera uma degradação excessiva das reservas adiposas, liberando mais triglicerídeos, e como consequência, há um aumento dos níveis de ácidos livres, gerando um quadro de cetoacidose diabética (COTRAN; KUMMER; ROBBINS, 1994). Todos os animais apresentaram uma tendência em diminuir o conteúdo de colesterol após o protocolo.

A partir dos dados dos animais saudáveis, viu-se que a síntese de melatonina não é alterada pelo exercício em animais adultos e saudáveis e, portanto, decidimos utilizar o diabetes induzido por estreptozotocina, que é um modelo experimental cuja síntese de melatonina pineal está reduzida em cerca de 50% (AMARAL et al., 2014).

Após 42 dias de diabetes, sendo 1 semana de adaptação e 5 do protocolo de treinamento, não foi observada alteração na atividade enzimática da AANAT. Porém, dados não publicados do nosso grupo de estudo, demonstraram que a síntese de melatonina nos grupos diabéticos sedentários e treinados (na mesma situação dos animais utilizados no presente trabalho) foi menor quando comparada com seus respectivos controles saudáveis (MELO, 2012). Além disso, em outro trabalho viu-se que com 3 dias de diabetes a síntese de melatonina já estava diminuída, assim como a atividade da AANAT nos ZTs 18 e 21. E com relação a atividade da HIOMT não houve alteração. Diferentemente desse quadro, com 15 dias de diabetes a atividade da AANAT permaneceu reduzida, porém a atividade da HIOMT nos ZTs 15 e 18 reduziu (AMARAL et al., 2014), mostrando que com maior tempo de diabetes, a enzima HIOMT passa a ser alterada também. Viu-se no presente trabalho que com 42 dias de diabetes a atividade da AANAT está inalterada, e de acordo com dados prévios, sabe-se que a síntese de melatonina está menor. Sendo assim, a possível explicação para essa diferença é que com um tempo prolongado do quadro de diabetes não tratado a HIOMT passaria a ser a enzima mais afetada da via, o que justificaria a AANAT inalterada aos 42 dias de diabetes e a queda da melatonina.

Levando em consideração que o treinamento não influenciou a síntese de melatonina pineal em uma situação fisiológica e nem em uma condição fisiopatológica, cuja síntese possivelmente é reduzida, surgiu o questionamento sobre qual seria a influência do exercício físico em animais idosos, ou seja, uma condição fisiológica na qual sabidamente há a redução da síntese de melatonina.

Os animais treinados apresentaram uma melhora no desempenho identificado pelo teste de exaustão, demonstrando que o protocolo de treinamento utilizado foi eficaz.

Após o treinamento foi observada a alteração no peso dos animais idosos. Isso ocorreu provavelmente, porque após o treinamento houve redução do tecido adiposo e aumento da massa magra resultando em uma não alteração do peso total (MENDES et al., 2013).

O treinamento físico desempenhou um papel importante no controle da glicemia desses animais, reduzindo significativamente a glicemia após o período do protocolo que também foi visto em (EVANS; CYR-CAMPBELL, 1997; TUOMILEHTO et al., 2001).

Não foi observada alteração no conteúdo de triglicerídeos e colesterol após as semanas de treinamento.

Com relação à atividade da enzima AANAT foi observado um aumento significativo após o treinamento dos animais idosos e dados não publicados de nosso laboratório mostram que a síntese de melatonina dos animais idosos aumenta após 8 semanas de treinamento físico, como o realizado no presente trabalho (MENDES, 2013).

A diminuição da síntese de melatonina pineal no animais idosos está associada com uma diminuição dos receptores β adrenérgicos na membrana dos pinealócitos (HENDEN et al., 1992). E nós vimos uma maior expressão dos receptores β adrenérgicos na pineal, mostrando a possível via do aumento da AANAT.

Sendo assim, vimos que em uma situação fisiológica onde a síntese de melatonina está normal, o treinamento físico não é capaz de alterar a síntese de melatonina. Isso se deve, possivelmente, ao fato de que na situação normal a glândula já está em seu limite de produção, não sendo influenciada pelo exercício físico.

Já em uma condição fisiopatológica, onde a hiperglicemia é altíssima e a síntese de melatonina é diminuída, o treinamento físico não foi capaz de alterar a síntese de melatonina. Provavelmente isso ocorreu, pois os animais são diabéticos por estreptozotocina não tratados com insulina resultando em uma glicemia alta que o exercício físico por si só, não foi capaz de alterar. Sabe-se que a hiperglicemia é a principal responsável pela redução da síntese de melatonina em animais cuja diabetes foi induzida por estreptozotocina (Amaral et al., 2014), e, como ela está permanentemente presente, qualquer eventual efeito contrário do exercício não foi suficiente para superar esse bloqueio da síntese de melatonina.

Diferentemente do que foi visto nos outros grupos investigados neste trabalho, em uma situação fisiológica onde a síntese de melatonina é diminuída (envelhecimento), o exercício desempenhou um papel importante no aumento da atividade da AANAT e consequente aumento da síntese de melatonina, sendo portanto, um importante modulador da

síntese nessa condição, podendo até ser indicado para melhora na qualidade de vida dos idosos, não apenas por todos os outros benefícios, mas também pelo aumento da síntese de melatonina pineal e consequente modulação do sono, do metabolismo energético, da pressão arterial e outros parâmetros fisiológicos rítmicos importantes para o bem estar.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que o treinamento físico aeróbio não acarretou mudanças no perfil noturno de síntese de melatonina em animais adultos, e também não alterou a síntese de melatonina pineal em ratos diabéticos por estreptozotocina, ou seja, manteve-se diminuída. Porém, nos animais idosos, que tem a síntese de melatonina diminuída, o treinamento promoveu aumento da principal enzima na síntese. Com isso, concluímos que o treinamento aeróbio não altera a síntese de melatonina em animais adultos saudáveis e em adultos diabéticos, entretanto em animais idosos aumenta a atividade da enzima passo limitante na síntese de melatonina e a expressão gênica dos receptores β adrenérgicos no pinealócitos.

Com isso o presente trabalho contribuiu para o melhor entendimento da relação entre exercício e síntese de melatonina, respeitando, principalmente, o ciclo de atividade dos animais.

REFERÊNCIAS*

- AFEICHE, S. C.; AMARAL, F. G.; VILLELA, D. C. M.; ABRAHÃO, M. V.; PERES, R.; CIPOLLA-NETO, J. Melatonin and the pineal gland. In: ROMANO, E.; De LUCA, S. **New research on neurosecretory systems**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2008. p. 151-177.
- AL SAIF, A.; ALSENANY, S. Aerobic and anaerobic exercise training in obese adults. **J. Phys. Ther. Sci.**, v. 27, n. 6, p. 1697–1700, 2015.
- AMARAL, F. G.; TURATI, A. O.; BARONE M.; SCIALFA, J. H.; DO CARMO BUONFIGLIO, D.; PERES, R.; PELICIARI-GARCIA, R. A.; AFEICHE, S. C.; LIMA, L.; BORDIN, S.; REITER, R. J.; MENNA-BARRETO, L.; CIPOLLA-NETO, J. Melatonin synthesis impairment as a new deleterious outcome of diabetes-derived hyperglycemia. **J. Pineal Res.**, v. 57, n. 1, p. 67–79, 2014.
- ARENDT, J. **Melatonin and the mammalian pineal gland**. London: Chapman & Hill, 1995.
- ARMSTRONG, S. M. Melatonin and circadian control in mammals. **Experientia**, v. 45, n. 10, p. 932-938, 1989.
- BALER, R.; KLEIN, D. C. Circadian expression of transcription factor Fra-2 in the rat pineal gland. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 45, p. 27319-27325, 1995.
- BALTATU, O.; AFEICHE, S. C.; SANTOS, S. H. J.; CAMPOS, L. A.; BARBOSA, R.; MICHELINI, L. C.; BADER, M.; CIPOLLA-NETO, J. Locally synthesized angiotensin modulates pineal melatonin generation. **J. Neurochem.**, v. 80, n. 2, p. 328-334, 2002.
- BANIK, U.; WANG, G. A.; WAGNER, P. D.; KAUFMAN, S. Interaction of phosphorylated tryptophan hydroxylase with 14-3-3 proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 26, p. 26219-26225, 1997.
- BESANÇON, R.; SIMONNEAUX, V.; JOUVET, A.; BELIN, M. F.; FÈVRE-MONTANGE, M. Nycthemeral expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat pineal gland. **Mol. Brain Res.**, v. 40, n. 1, p. 136-138, 1996.
- BJÖRNTORP, P. Neuroendocrine aging. **J. Intern. Med.**, v. 238, n. 5, p. 401-404, 1995.
- BODKIN N. L.; NICOLSON, M.; ORTMAYER, H. K.; HANSEN, B. C. Hyperleptinemia: relationship to adiposity and insulin resistance in the spontaneously obese rhesus monkey. **Horm. Metab. Res.**, v. 28, n. 12, p. 674-678, 1996.
- BORGES-SILVA, C. N.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; PERES, S. B.; FONSECA-ALANIZ, M. H.; ANDREOTTI, S.; CIPOLLA-NETO, J.; PITHON-CURI, T. C.;

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

LIMA, F. B. Pinealectomy reduces hepatic and muscular glycogen content and attenuates aerobic power adaptability in trained rats. **J. Pineal Res.**, v. 43, p. 96-103, 2007.

BORJIGIN, J.; WANG, M. M.; SNYDER, S. H. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 783-785, 1995.

BOULÉ, N. G.; HADDAD, E.; KENNY, G. P.; WELLS, G. A.; SIGAL, R. J. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus a meta-analysis of controlled clinical trials. **JAMA**, v. 286, n. 10, p. 1218-1227, 2001.

BRAUN, B.; ZIMMERMANN, M. B.; KRETCHMER, N. Effects of exercise intensity on insulin sensitivity in women with non – insulin – dependent diabetes mellitus. **J. Appl. Physiol.**, v. 78, n. 1, p. 300-306, 1995.

BROWNSTEIN, M.; AXELROD, J. Pineal gland: 24-hour rhythm in norepinephrine turnover. **Science**, v. 184, n. 4133, p. 163-165, 1974.

BUEMANN, B.; TREMBLAY, A. Effects of exercise training on abdominal obesity and related metabolic complications. **Sports Med.**, v. 21, n. 3, p. 191-212, 1996.

BURKHARDT, S.; REITER, R. J.; TAN, D. X.; HARDELAND, R.; CABRERA, J.; KARBOWNIK, M. DNA oxidatively damaged by chromium (III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N-acetyl-N-Formyl-5-Methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 8, n. 33, p. 775-783, 2001.

BUXTON, O. M.; L'HERMITE-BALÉRIAUX, M.; HIRSCHFELD, U.; CAUTER, E. Acute and delayed effects of exercise on human melatonin secretion. **J. Biol. Rhythms.**, v. 12, n. 6, p. 568–574, 1997.

CAMPOS, L. A.; CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G.; MICHELINI, L. C.; BADER, M.; BALTATU, O. C. The angiotensin melatonin axis. **Inter. J. Hypertension.**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

CANIVELL, S.; GOMIS, R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. **Autoimmun. Rev.**, v. 13, n. 4-5, p. 403-407, 2014.

CARR, D. B.; REPPERT, S. M.; BULLEN, B.; SKRINAR, G.; BEITINS, I.; ARNOLD, M.; ROSENBLATT, M.; MCARTHUR, J. W. Plasma melatonin increases during exercise in women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 53, n. 1, p. 224–225, 1981.

CHIK, C. L.; HO, A. K.; KLEIN, D. C. Alpha 1-adrenergic potentiation of vasoactive intestinal peptide stimulation of rat pinealocyte adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'- monophosphate: evidence for a role of calcium and protein kinase-C. **Endocrinology**, v. 122, n. 2, p. 702-708, 1988.

CHIK, C. L.; MACKOVA, M.; PRICE, D.; HO, A. K. Adrenergic regulation and diurnal rhythm of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the rat pineal gland. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 5194-5201, 2004.

CHIK, C. L.; ARNASON, T. G.; DUKEWICH, W. G.; PRICE, D. M.; RANGER, A.; HO, A. K. Histone H3 phosphorylation in the rat pineal gland: adrenergic regulation and diurnal variation. **Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 1465-1472, 2007.

CIPOLLA NETO, J.; AFECHÉ, S. C. Glândula pineal: fisiologia celular e função. In: WAJCHENBERG, B. L. **Tratado de endocrinologia clínica**. São Paulo: Roca, 1992. p. 83-93.

CIPOLLA-NETO, J.; SKORUPA, A. L.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; BARTOL, I.; MOTA, S. R.; AFECHÉ, S. C.; DELAGRANGE, P.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; CANTERAS, N. S. The role of the retrochiasmatic area in the control of pineal metabolism. **Neuroendocrinology**, v. 69, n. 2, p. 97-104, 1999.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHÉ, S. C. Glândula pineal. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 981-990.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHÉ, S. C. Glândula pineal. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 1045-1053.

CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G.; AFECHÉ, S. C.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **J. Pineal Res.**, v. 56, p. 371-381, 2014.

COTRAN, S. R.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Pâncreas. In: **Patologia básica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

CRAIG, M. E.; JEFFERIES, C.; DABELEA, D.; BALDE, N.; SETH, A.; DONAGHUE, K. C. ISPAD clinical practice consensus guidelines 2014. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatr. Diabetes**, v. 15, p. 4-17, 2014. Suppl 20.

DABELEA, D.; MAYER-DAVIS, E. J.; SAYDAH, S.; IMPERATORE, G.; LINDER, B.; DIVERS, J.; BELL, R.; BADARU, A.; TALTON, J. W.; CRUME, T.; LIESE, A. D.; MERCHANT, A. T.; LAWRENCE, J. M.; REYNOLDS, K.; DOLAN, L.; LIU, L. L.; HAMMAN, R. F. Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. **JAMA**, v. 311, n. 17, p. 1778-86, 2014.

DEFRONZO, R. A.; SHERWIN, R. S.; KRAEMER, N. Effect of physical training on insulin action in obesity. **Diabetes**, v. 36, n. 12, p. 1379-1385, 1987.

DEGUCHI, T.; AXELROD, J. Control of circadian change of serotonin N-acetyltransferase activity in the pineal organ by the beta--adrenergic receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 69, n. 9, p. 2547-2550, 1972a.

DEGUCHI, T.; AXELROD, J. Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in rat pineal. **Anal. Biochem.**, v. 50, n. 1, p. 174-179, 1972b.

DEVENDRA, D.; LIU, E.; EISENBARTH, G.S. Type 1 diabetes: recent developments. **BMJ.**, v. 328, n. 7442, p. 750-754, 2004.

DOHM, G. L.; HUSTON, R. L.; ASKEW, E. W.; FLESHOOD, H. L. Effects of exercise, training and diet on muscle citric acid cycle enzyme activity. **Can. J. Biochem.**, v. 51, n. 6, p. 849-854, 1973.

DUFLOTH, D. L.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarii. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 4, pt. 2, p. R1271-R1287, 1997.

EHRET, M.; CASH, C. D.; HAMON, M.; MAITRE, M. Formal demonstration of the phosphorylation of rat brain tryptophan hydroxylase by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. **J. Neurochem.**, v. 52, n. 6, p. 1886-1891, 1989.

EHRET, M.; PEVET, P.; MAITRE, M. Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. **J. Neurochem.**, v. 57, n. 5, p. 1516-1521, 1991.

EKBLOM, B.; ASTRAND, P. O.; SALTIN, B.; STENBERG, J.; WALLSTRÖM, B. Effect of training on circulatory response to exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 24, n. 4, p. 518-528, 1968.

EKBLOM, B. Effect of physical training on oxygen transport system in man. **Acta Physiol. Scand. Suppl.**, v. 328, p. 1-45, 1969.

EKSTRÖM, P.; MEISSEL, H. Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 358, n. 1438, p. 1679-1700, 2003.

ELIAS, A. N.; WILSON, A. F.; PANDIAN, M. R.; ROJAS, F. J.; KAYALEH, R.; STONE, S. C.; JAMES, N. Melatonin and gonadotropin secretion after acute exercise in physically active males. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.**, v. 66, n. 4, p. 357-361, 1993.

ENEVOLDSEN, L. H.; STALLKNECHT, B.; LANGFORT, J.; PETERSEN, L. N.; HOLM, C.; PLOUG, T.; GALBO, H. The effect of exercise training on hormone – sensitive lipase in rat intra – abdominal adipose tissue and muscle. **J. Physiol.**, v. 536, pt. 3, p. 871-877, 2001.

EVANS, W. J.; CYR-CAMPBELL, D. Nutrition, exercise, and healthy aging. **J. Am. Diet Assoc.**, v. 97, n. 6, p. 632-637, 1997.

FERRARA, C. M.; GOLDBERG, A. P.; ORTMAYER, H. K.; RYAN, A. S. Effects of aerobic and resistive exercise training on glucose disposal and skeletal muscle metabolism in older men. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.**, v. 61, n. 5, p. 480-487, 2006.

FRASCHINI, F.; SCAGLIONE, F.; FRANCO P.; DERMATINI, G.; LUCINI, V.; STANKOV, B. Melatonin and immunity. **Acta Oncol.**, v. 29, n. 6, p. 775-776, 1990.

GANGULY, S.; GASTEL, J. A.; WELLER, J. L.; SCHWARTZ, C.; JAFFE, H.; NAMBOODIRI, M. A. A.; COON, S. L.; HICKMAN, A. B.; ROLLAG, M.; OBSIL, T.; BEAUVERGER, P.; FERRY, G.; BOUTIN, J. A.; KLEIN, D. C. Role of a pineal cAMP operated arylalkylamine N-acetyltransferase/ 14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 98, n. 14, p. 8083-8088, 2001.

GARCIA, R. A.; AFECHÉ, S. C.; SCIALFA, J. H.; AMARAL, F. G.; DOS SANTOS, S. H.; LIMA, F. B.; YOUNG, M. E.; CIPOLLA-NETO, J. Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. **Life Sci.**, v. 82, n. 1-2, p. 108-114, 2008.

GARCIA-MAURÍÑO, S.; GONZALEZ-HABA, M. G.; CALVO, J. R.; RAFII-EL-IDRISSI, M.; SANCHEZ-MARGALET, V.; GOBERNA, R.; GUERRERO, J. M. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. **J. Immunol.**, v. 159, n. 2, p. 574-581, 1997.

GILLETTE, M. U.; MCARTHUR, A. J. Circadian actions of melatonin at the suprachiasmatic nucleus. **Behav. Brain Res.**, v. 73, n. 1-2, p. 135-139, 1995.

GINALDI, L.; DE MARTINIS, M.; D'OSTILIO, A.; MARINI, L.; LORETO, M. F.; CORSI, M. P.; QUAGLINO, D. The immune system in the elderly: I. Specific humoral immunity. **Immunol. Res.**, v. 20, n. 2, p. 101-108, 1999a.

GINALDI, L.; DE MARTINIS, M.; D'OSTILIO, A.; MARINI, L.; LORETO, M. F.; MARTORELLI, V.; QUAGLINO, D. The immune system in the elderly: II. Specific cellular immunity. **Immunol. Res.**, v. 20, N. 2, p. 109-115, 1999b.

GINALDI, L.; DE MARTINIS, M.; D'OSTILIO, A.; MARINI, L.; LORETO, M. F.; QUAGLINO, D. The immune system in the elderly: III. Innate immunity. **Immunol. Res.**, v. 20, n. 2, p. 117-126, 1999c.

GOLDMAN, B.D. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. **J. Biol. Rhythms**, v. 16, n.4, p. 283-301, 2001.

GOLLNICK, P. D.; ARMSTRONG, R. B.; SALTIN, B.; SAUBERT, C. W.; SEMBROWICH, W. L.; SHEPHERD, R. E. Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 34, n. 1, p. 107-111, 1973.

GUTIÉRREZ, C. I.; URBINA, M.; OBREGION, F.; GLYKYS, J.; LIMA, L. Characterization of tryptophan high affinity transport system in pinealocytes of the rat. Day-night modulation. **Amino Acids.**, v. 25, n. 1, p. 95-105, 2003.

HA, E.; YIM, S. V.; CHUNG, J. H.; YOON, K.S.; KANG, I.; CHO, Y. H.; BAIK, H. H. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate 1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C₂C₁₂ murine skeletal muscle cells. **J. Pineal Res.**, v. 41, n. 1, p. 67-72, 2006.

HENDEN, T.; STOKKAN, K. A.; REITER, R. J.; NONAKA, K. O.; LERCHL, A.; JONES, D. J. The age-associated reduction in pineal β -adrenergic receptor density is prevented by life-long food restriction in rats. **Biol. Signals.**, v. 1, p. 34-39, 1992.

HO, A. K.; HASHIMOTO, K.; CHIK, C. L. 3',5'-cyclic guanosine monophosphate activates mitogen-activated protein kinase in rat pinealocytes. **J. Neurochem.**, v. 73, n. 2, p. 598-604, 1999.

HO, A. K.; PRICE, D. M.; TERRIFF, D.; CHIK, C. L. Timing of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the rat pineal gland. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 252, n. 1-2, p. 34-39, 2006.

HOLLOSZY, J. O.; OSCAI, L. B. Effect of exercise on alpha-glycerophosphate dehydrogenase activity in skeletal muscle. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 130, n. 1, p. 653-656, 1969.

HOLLOSZY, J. O.; OSCAI, L. B.; DON, I. J.; MOLÉ, P. A. Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: adaptive response to exercise. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 40, n. 6, p. 1368-1373, 1970.

ICHIMURA, T.; ISOBE, T.; OKUYAMA, T.; YAMAUCHI, T.; FUJISAWA, H. Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase in the presence of Ca²⁺, calmodulin-dependent protein kinase II. **FEBS Lett.**, v. 219, n. 1, p. 79-82, 1987.

ICHIMURA, T.; UCHIYAMA, J.; KUNIHIRO, O.; ITO, M.; HORIGOME, T.; OMATA, S.; SHINKAI, F.; KAJI, H.; ISOBE, T. Identification of the site of interaction of the 14-3-3 protein with phosphorylated tryptophan hydroxylase. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 48, p. 28515-28518, 1995.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes atlas**. 6th ed. 2013. Disponível em: <www.idf.org>. Acesso em: 1 set. 2015.

JÉQUIER, E.; TAPPY, L. Obesity. **Mol. Aspects Med.**, v. 18, p. 249-305, 1997.

JOHANSEN, P. A.; JENNINGS, I.; COTTON, R. G.; KUHN, D. M. Tryptophan hydroxylase is phosphorylated by protein kinase A. **J. Neurochem.**, v. 65, n. 2, p. 882-888, 1995.

JOHANSEN, P. A.; JENNINGS, I.; COTTON, R. G.; KUHN, D. M. Phosphorylation and activation of tryptophan hydroxylase by exogenous protein kinase A. **J. Neurochem.**, v. 66, n.2, p. 817-823, 1996.

KANG, J.; ROBERTSON, R. J.; HAGBERG, J.M.; KELLEY, D. E.; GOSS, F. L.; DASILVA, S. G.; SUMINSKI, R. R.; UTTER, A. C. Effect of exercise intensity on glucose and insulin metabolism in obese individuals and obese NIDDM patients. **Diabetes Care**, v. 19, n. 4, p. 341-349, 1996.

KAPPERS, J. A. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, v. 52, p. 163-215, 1960.

KARASEK, M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. **Exp. Gerontol.**, v. 39, n. 11-12, p. 1723-1729, 2004.

KELLEY, G. A.; KELLEY, K. S.; TRAN, Z. V. Walking, lipids, and lipoproteins: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Prev. Med.**, v. 38, n. 5, p. 651-661, 2004.

KELLEY, G. A.; KELLEY, K. S. Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins in adults with type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized-controlled trials. **Public Health**, v. 121, n.9, p. 643-655, 2007.

KIM, K. H.; WOO, H. Y.; LIM, S. W. Association study of a serotonin receptor 2A gene - 1438A/G polymorphism and anxiety-related traits. **Psychiatry Investig.**, v. 5, n. 4, p. 244-246, 2008.

KLEIN, D. C.; WELLER, J. L. Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. **Science**, v. 177, n. 4048, p. 532-533, 1972.

KLEIN, D. C.; BUDA, M. J.; KAPOOR, C. L.; KRISHNA, G. Pineal serotonin acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3',5'-monophosphate may be signal for "turnoff". **Science**, v. 199, n. 4326, p. 309-311, 1978.

KLEIN, D. C.; SUGDEN, D.; WELLER, J. L. Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 80, n. 2, p. 599-603, 1983.

KLEIN, D. C.; ROSEBOOM, P. H.; COON, S. L. New light is shining on the melatonin rhythm enzyme: the first poscloning view. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 7, n. 3, p. 106-112, 1996.

KLEIN, D. C.; GANGULY, S.; COON, S.; WELLER, J. L.; OBSIL, T.; HICKMAN, A.; DYDA, F. 14-3-3 proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 30, n. 4, p. 365-373, 2002.

KLEIN, D. C.; GANGULY, S.; COON, S. Q.; SHI, Q.; GAILDRAT, P.; MORIN, M.; WELLER, J. L.; OBSIL, T.; HICKMAN, A.; DYDA, F. 14-3-3 proteins in pineal photoneuroendocrine transduction: how many roles? **J. Neuroendocrinol.**, v. 15, n. 4, p. 370-377, 2003.

KLEIN, D. C. The pineal gene expression party: who's the surprise guest? **Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 1463-1464, 2007.

KOCH, M.; MAUHIN, V.; STEHLE, J. H.; SCHOMERUS, C.; KORF, H. W. Desphosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatase is involved in inactivation of NAT gene transcription in rat pineal gland. **J. Neurochem.**, v. 85, n. 1, p. 170-179, 2003.

KOIVISTO, V. A.; YKI-JÄRVINEN, H.; DE FRONZO, R. A. Physical training and insulin sensitivity. **Diabetes Metab. Rev.**, v. 1, n. 4, p. 445-481, 1986.

LUCÍA, A.; DÍAZ, B.; HOYOS, J.; FERNÁNDEZ, C.; VILLA, G.; BANDRÉS, F.; CHICHARRO, J. L. Hormone levels of world class cyclists during the Tour of Spain stage race. **Br. J. Sports Med.**, v. 35, p. 424-430, 2001.

LUND, S.; HOLMAN, G. D.; SCHMITZ, O.; PEDERSEN, O. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 92, n. 13, p. 5817-5821, 1995.

MAAHS, D. M.; WEST, N. A.; LAWRENCE, J. M.; MAYER-DAVIS, E. J. Epidemiology of type 1 diabetes. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v. 39, n. 3, p. 481-497, 2010.

MAESTRONI, G. J. The immunotherapeutic potential of melatonin. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, v. 10, n. 3, p. 467–476, 2001.

MARONDE, E.; PFEFFER, M.; OLCESE, J.; MOLINA, C. A.; SCHLOTTER, F.; DEHGHANI, F.; KORF, H. W.; STEHLE, J. H. Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 9, p. 3326-3336, 1999.

MARONDE, E.; WICHT, H.; TASKÉN, K.; GENIESER, H. G.; DEHGHANI, F.; OLCESE, J.; KORF, H. W. CREB phosphorylation and melatonin biosynthesis in the rat pineal gland: involvement of cyclic AMP dependent protein kinase type II. **J. Pineal Res.**, v. 27, n. 3, p. 170-182, 1999a.

MARONDE, E.; STEHLE J. H. The mammalian pineal gland: Known facts, unknown facets. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 4, p. 142–149, 2007.

MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; URIA, H.; ANTOLIN, I.; ESTEBAN, M. M.; RODRIGUEZ, C. Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. **J. Pineal Res.**, v. 24, n. 3, p. 179-192, 1998.

MCKINLEY, M. J.; MCACLEAN, R. M.; MENDELSON, F. A. O, ALLEN, A. M.; CHAI, S. Y.; ALDFIELD, B. J. Circunventricular organs: Neuroendocrine interfaces between the brain and the hemal milieu. **Frontiers Neuroendocrinol.**, v. 11, p. 91-127, 1990.

MCMURRAY, R. G.; FORSYTHE, W. A.; MAR, M. H.; HARDY, C. J. Exercise intensity-related responses of beta-endorphin and catecholamines. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 19, n. 6, p. 570-574, 1987.

MELO, R. M. **Efeitos da suplementação com melatonina e do treinamento físico aeróbio sobre o perfil metabólico de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.** 2012. 75 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MENDES, C. **Adaptações do animal idoso ao exercício: papel da suplementação diária com melatonina.** 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MENDES, C.; LOPES, A. M.; DO AMARAL, F. G.; PELICIARI-GARCIA, R. A.; TURATI, A. O.; HIRABARA, S. M.; SCIALFA, J. H.; CIPOLLA-NETO, J. Adaptations of the aging animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 55, n. 3, p. 229–239, 2013.

MIYAZAKI, T.; HASHIMOTO, S.; MASUBUCHI, S.; HONMA, S.; HONMA K. I. Phase-advance shifts of human circadian pacemaker are accelerated by daytime physical exercise. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 281, n. 1, p. R197–R205, 2001.

MOLÉ, P. A.; OSCAI, L. B.; HOLLOSZY, J. O. Adaptation of muscle to exercise. Increase in levels of palmityl CoA synthetase, carnitine palmityltransferase and palmityl CoA dehydrogenase and in the capacity to oxidize fatty acids. **J. Clin. Invest.**, v. 50, n. 11, p. 2323-2330, 1971.

MOLLER, M. Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. **Microsc. Res. Tech.**, v. 21, n. 3, p. 188-204, 1992.

MONTELEONE, P.; MAJ, M.; FUSCHINO, A.; KEMALI, D. Physical stress in the middle of the dark phase does not affect light-depressed plasma melatonin levels in humans. **Neuroendocrinology**, v. 55, n. 4, p. 367–371, 1992.

MONTELEONE, P.; MAJ, M.; FUSCO, M.; ORAZZO, C.; KEMALI, D. Physical exercise at night blunts the nocturnal increase of plasma melatonin levels in healthy humans. **Life Sci.**, v. 47, n. 22, p. 1989–1995, 1990.

MOORE, R. Y.; SPEH J. C.; CARD J. P. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. **J. Comp. Neurol.**, v. 352, n. 3, p. 351-366, 1995.

NEGRÃO, C. E.; MOREIRA, E. D.; SANTOS, M. C. L. M.; FARAH, V. M.; KRIEGER, E. M. Vagal function impairment after exercise training. **J. Appl. Physiol.**, v. 72, n. 5, p. 1749-1753, 1992.

OSCAI, L. B.; HOLLOSZY, J. O. Biochemical adaptations in muscle. II. Response of mitochondrial adenosine triphosphatase, creatine phosphokinase, and adenylate kinase activities in skeletal muscle to exercise. **J. Biol. Chem.**, v. 246, n. 22, p. 6968-6972, 1971.

PANG, S. F.; TANG, F.; TANG, P. L. Alloxan-induced diabetes and the pineal gland: differential effects on the levels of pineal N-acetylserotonin, pineal melatonin, and serum melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 2, n. 1, p. 79-85, 1985.

PANG, S. F.; TSANG, C. W.; HONG, G. X.; YIP, P. C.; TANG, P. L.; BROWN, G. M. Fluctuation of blood melatonin concentrations with age: results of changes in pineal melatonin secretion, body growth and aging. **J. Pineal Res.**, v. 8, n. 2, p. 179-192, 1990.

PANG, S. F.; DUBOCOVICH, M. L.; BROWN, G. M. Melatonin receptors in peripheral tissues: A new area of melatonin research. **Biol. Signals**, v. 2, n. 4, p. 177-180, 1993.

PARFITT, A.; WELLER, J. L.; KLEIN, D. C.; SAKAI, K. K.; MARKS, B. H. Blockade by ouabain or elevated potassium ion concentration of the adrenergic and adenosine cyclic 3',5'-monophosphate-induced stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. **Mol. Pharmacol.**, v. 11, n. 3, p. 241-255, 1975.

PARFITT, A.; WELLER, J. L.; KLEIN, D. C. Beta adrenergic-blockers decrease adrenergically stimulated N-acetyltransferase activity in pineal glands in organ culture. **Neuropharmacology**, v. 15, n. 6, p. 353-358, 1976.

PATTENGALE, P. K.; HOLLOSZY, J. O. Augmentation of skeletal muscle myoglobin by a program of treadmill running. **Am. J. Physiol.**, v. 213, n. 3, p. 783-785, 1967.

PESCATELLO, L. S.; FRANKLIN, B.A.; FAGARD, R.; FARGUHAR, W. B.; KELLEY, G. A.; RAY, C. A. Exercise and hypertension. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 36, n. 3, p. 533-553, 2004.

RASMUSSEN, D. D.; BOLDT B. M.; WIKINSON, C. W.; YELLON, S. M.; MATSUMOTO, A. M. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin and insulin to youthful levels. **Endocrinology**, v. 140, n. 2, p. 1009–1012, 1999.

REITER, R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocr. Rev.**, v. 12, n. 2, p. 151-180, 1991.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; GITTO, E.; SAINZ, R. M.; MAYO, J. C.; LEON, J.; MANCHESTER, L. C.; VIJAYALAXMI; KILIC, E.; KILIC, U. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. **Pol. J. Pharmacol.**, v. 56, n. 2, p. 159-170, 2004.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; GODSON, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 17, n. 3, p. 100-102, 1996.

REYNOLDS, T. H.; BROZINICK, J. T. Jr; ROGERS, M. A.; CUSHMAN, S. W. Effects of exercise training on glucose transport and cell surface GLUT-4 in isolated rat epitrochlearis muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. 320-325, 1997.

RIBEIRO, C.; CAMBRI, L. T.; DALIA, R. A.; DE ARAUJO, M. B.; BOTEZELLI, J. D.; DA SILVA SPONTON, A. C.; DE MELLO, M. A. Effects of physical training with different intensities of effort on lipid metabolism in rats submitted to the neonatal application of alloxan. **Lipids in Health Dis.**, v. 11, n. 138, p. 1-9, 2012.

RIBELAYGA, C.; GAUER, F.; CALGARI, C.; PEVET, P.; SIMONNEAUX, V. Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. **Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 1375-1384, 1999.

RICHTER, E. A.; JENSEN, P.; KIENS, B.; KRISTIANSEN, S. Sarcolemmal glucose transport and GLUT-4 translocation during exercise are diminished by endurance training. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. E89-95, 1998.

ROSEBOOM, P. H.; KLEIN, D. C. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a β -adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. **Mol. Pharmacol.**, v. 47, n. 3, p. 439-449, 1995.

ROSEBOOM, P. H.; COON, S. L.; BALER, R.; MCCUNE, S. K.; WELLER, J. L.; KLEIN, D. C. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. **Endocrinology**, v. 137, n. 7, p. 3033-3044, 1996.

SALTIN, B.; BLOMQVIST, G.; MITCHELL, J. H.; JOHNSON, R. L. Jr; WILDENTHAL, K.; CHAPMAN, C. B. Response to exercise after bed rest and after training. **Circulation**, v. 38, n. 5, p. 1-78, 1968. Suppl.

SCHAAD, N. C.; VANECEK, J.; RODRIGUEZ, I. R.; KLEIN, D. C.; HOLTZCLAW, L.; RUSSELL, J. T. Vasoactive intestinal peptide elevates pinealocyte intracellular calcium

concentrations by enhancing influx: evidence for involvement of a cyclic GMP-dependent mechanism. **Mol. Pharmacol.**, v. 47, n. 5, p. 923-933, 1995.

SHEIN, H. M.; WURTMAN, R. J. Stimulation of [¹⁴C]tryptophan 5-hydroxylation by norepinephrine and dibutyryl adenosine 3',5', monophosphate in rat pineal organ cultures. **Life Sci.**, v. 10, n. 16, p. 935-940, 1971.

SHIBUYA, H.; TORU, M.; WATANABE, S. A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rat pineals. **Brain Res.**, v. 138, n. 2, p. 364-368, 1977.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, n. 2, p. 325-395, 2003.

SKRINAR, G. S.; BULLEN, B. A.; REPPERT, S. M.; PEACHEY, S. E.; TURNBULL, B.A.; MCARTHUR, J.W. Melatonin response to exercise training in women. **J. Pineal Res.**, v. 7, n. 2, p. 185-194, 1989.

SMIRNOV, A. N. Nuclear melatonin receptor. **Biochemistry**, v. 66, n. 1, p. 19-26, 2001.

SPESSERT, R.; RAPP, M.; JASTROW, H.; KARABUL, N.; BLUM, F.; VOLLRATH, L. A differential role of CREB phosphorylation in cAMP-inducible gene expression in the rat pineal. **Brain Res.**, v. 864, n. 2, p. 270-280, 2000.

STALLKNECHT, B.; VINTEN, J.; PLOUG, T.; GALBO, H. Increased activities of mitochondrial enzymes in white adipose tissue in trained rats. **Am. J. Physiol.**, v. 261, p. 410-414, 1991.

STEINHILBER, D.; BRUNGS, M.; WERZ, O.; WIESENBERG, I.; DANIELSSON, C.; KAHLEN, J. P.; NAYERI, S.; SCHRÄDER, M.; CARLBERG, C. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 13, p. 7037-7040, 1995.

SUGDEN, D.; VANECEK, J.; KLEIN, D. C.; THOMAS, T. P.; ANDERSONS, W. B. Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cAMP accumulation in rat pinealocytes. **Nature**, v. 314, n. 6009, p. 359-361, 1985.

SUGDEN, D.; KLEIN, D. C. Activators of protein kinase C act at a postreceptor site to amplify cyclic AMP production in rat pinealocytes. **J. Neurochem.**, v. 50, n. 1, p. 149-155, 1988.

SUGDEN, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. **Experientia**, v. 45, n. 10, p. 922-932, 1989.

TAMOTSU, S.; SCHOMERUS, C.; STEHLE, J. H.; ROSEBOOM, P. H.; KORF, H. W. Norepinephrine-induced phosphorylation of the transcription factor CREB in isolated rat pinealocytes: an immunocytochemical study. **Cell Tissue. Res.**, v. 282, n. 2, p. 219-226, 1995.

TAN, D. X.; REITER, R. J.; MANCHESTER, L. C.; YAN, M. T.; EL-SAWI, M.; SAINZ R. M.; MAYO, J. C.; KOHEN, R.; ALLEGRA, M.; HARDELAND, R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2, n. 2, p. 181-197, 2002.

THERON, J. J.; OOSTHUIZEN, J. M.; RAUTENBACH, M. M. Effect of physical exercise on plasma melatonin levels in normal volunteers. **S. Afr. Med. J.**, v. 66, n. 22, p. 838-841, 1984.

TUOMILEHTO, J.; LINDSTRÖM, J.; ERIKSSON, J. G.; VALLE, T. T.; HÄMÄLÄINEN, H.; ILANNE-PARIKKA, P.; KEINÄNEN-KIUKAANNIEMI, S.; LAAKSO, M.; LOUHERANTA, A.; RASTAS, M.; SALMINEN, V., UUSITUPA, M. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 18, p. 1343-1350, 2001.

UZUN, A.; BALTACI, A. K.; KILIC, M.; MOGULKOC, R. The effect of acute swimming exercise on plasma melatonin levels in rats. **Bratisl Lek Listy**, v. 113, n. 2, p. 64-66, 2012.

VANECEK, J.; SUGDEN, D.; WELLER, J.; KLEIN, D. C. Atypical synergistic alpha 1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. **Endocrinology**, v. 116, n. 6, p. 2167-2173, 1985.

WAJCHENBERG, B. L.; MALERBI, D. A.; LUZ, P. L.; ROCHA, M. S. Insulin resistance syndrome I. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 58, n. 2, p. 129-140, 1992.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocrine Rev.**, v. 21, n. 6, p. 697-738, 2000.

WALLBERG-HENRIKSSON, H.; HOLLOSZY, J. O. Contractile activity increases glucose uptake by muscle in severely diabetic rats. **J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.**, v. 57, n. 4, p. 1045-1049, 1984.

WEI, X.; LIU, X.; ROSENZWEIG, A. What do we know about the cardiac benefits of exercise? **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 25, n. 6, p. 529-536, 2015.

WINDER, W. W.; BALDWIN, K. M.; HOLLOSZY, J. O. Enzymes involved in ketone utilization in different types of muscle: adaptation to exercise. **Eur. J. Biochem.**, v. 47, n. 3, p. 461-467, 1974.

YAGA, K.; TAN, D. X.; REITER, R. J.; MANCHESTER, L. C.; HATTORI, A. Unusual responses of nocturnal pineal melatonin synthesis and secretion to swimming: attempts to define mechanisms. **J. Pineal Res.**, v. 14, n. 2, p. 98-103, 1993.

YAMADA, H.; OGURA, A.; KOIZUMI, S.; YAMAGUCHI, A.; MORIYAMA, Y. Acetylcholine triggers L-glutamate exocytosis via nicotinic receptors and inhibits melatonin synthesis in rat pinealocytes. **J. Neur.**, v. 18, n. 13, p. 4946-4952, 1998.

ZALATAN, F.; KRAUSE, J. A.; BLASK, D. E. Inhibition of isoproterenol-induced lipolysis in rat inguinal adipocytes in vitro by physiological melatonin via a receptor-mediated mechanism. **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 3783-3790, 2001.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-787, 2001.