CAROLINE MENDES

**ADAPTAÇÕES DO ANIMAL IDOSO AO EXERCÍCIO: PAPEL DA SUPLEMENTAÇÃO
DIÁRIA COM MELATONINA**

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
2012

CAROLINE MENDES

**ADAPTAÇÕES DO ANIMAL IDOSO AO EXERCÍCIO FÍSICO: PAPEL DA
SUPLEMENTAÇÃO DIÁRIA COM MELATONINA**

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 original

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Mendes, Caroline.

Adaptações do animal idoso ao exercício: papel da suplementação diária com melatonina / Caroline Mendes. -- São Paulo, 2012.

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: Aspectos fisiológicos celulares e moleculares da glândula pineal.

Versão do título para o inglês: Adaptations of the elderly animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin.

1. Glândula pineal 2. Melatonina 3. Exercício físico
4. Idosos I. Cipolla Neto, Prof. Dr. José Cipolla Neto
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0145/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Caroline Mendes.

Título da Adaptações do animal idoso ao exercício: papel da
suplementação diária com melatonina.

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. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **199** nas fls. **116** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **José Cipolla Neto**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: ações centrais e a regulação circadiana da função metabólica*" do qual participam o(s) aluno(s) **Jéssica Andrade da Silva, Caroline Mendes, Rafael Maso Prévide, Ariane de Oliveira Turati, Angela Ramos Lobo, Rosana Fátima Dantas Ferreira, Ana Maria de Souza Lopes, Ronaldo Meira de Mello, Marco Taneda, Rafael Peres, Fernanda Gaspar do Amaral, Eliângela de Lima, Lia de Alencar Coelho, Daniella do Carmo Buonfiglio** e os pesquisadores **Fabio Bessa Lima, Silvana Bordin, Sara Schammah, Carla Roberta de Oliveira Carvalho, Solange Castro Afeche, Edson Amaro Jr.**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **24.01.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 27 de janeiro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador José Cipolla Neto, a quem devoto a mais sincera admiração.

Aos meus pais, pela educação e mais profunda forma de amor.

Às minhas irmãs, pelos seres inestimáveis que são.

Ao Kleber Rodrigues, pelos ótimos momentos, pela diversão, pelo carinho e dedicação, e por compreender minhas ausências.

A todos os meus colegas e amigos do laboratório que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho. Em especial, à doutoranda Ana Lopes, pelo bom humor, amizade e auxílio nos experimentos, aos pós-doutorandos Rodrigo Antonio Garcia e Fernanda Amaral, pela imensa ajuda e prestimosos ensinamentos e conselhos, ao Ronaldo Melo, meu eterno coorientador, à mestranda Ariane Turati, pela força aos finais de semana e, finalmente, à nossa técnica Julieta Helena Scialfa, a grande mãe de todos nós.

Ao meu querido amigo Wilson Mitsuo Kuwabara.

A todos os meus professores, que formaram grande parte do que eu sou hoje.

Aos seres que, involuntariamente, cederam a vida em prol do conhecimento científico.

Ao CNPq e à FAPESP, pelo auxílio financeiro.

“Há mais sabedoria no seu corpo do
que na sua filosofia mais profunda”

Fridrich Wilhem Nietzsche

RESUMO

MENDES, C. **Adaptações do animal idoso ao exercício: papel da suplementação diária com melatonina.** 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A glândula pineal via síntese e secreção de melatonina, desempenha uma importante função fisiológica regulatória no metabolismo de carboidratos, influenciando a secreção e a ação da insulina. Além disso, a melatonina parece ser de fundamental importância na determinação das adaptações metabólicas do tecido adiposo e do tecido muscular. Evidências mostram que animais pinealectomizados são incapazes de se adaptarem a condições estressantes, deste modo, não conseguem desenvolver as alterações metabólicas adaptativas ao treinamento físico aeróbio e, portanto, não apresentam o mesmo desempenho de animais controles treinados. Sabendo que o animal idoso apresenta uma redução considerável da produção de melatonina, o objetivo deste estudo foi investigar a adaptação metabólica ao treinamento físico no animal idoso com e sem reposição de melatonina. Para tanto, foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar, com aproximadamente 12 meses de vida, que foram subdivididos em grupos controles e suplementados com melatonina, nas condições sedentários e treinados, totalizando quatro grupos distintos (controles sedentários – CS; controles treinados – CT; suplementados com melatonina sedentários – MS; suplementados com melatonina treinados – MT). A suplementação com melatonina teve a duração de 16 semanas, enquanto o treinamento físico teve a duração de 8 semanas. Após o sacrifício dos animais, amostras do tecido adiposo, do fígado, hipotálamo e dos músculos sóleo e gastrocnêmio foram coletadas para as análises. A glândula pineal também foi retirada para avaliação do conteúdo de melatonina. Os animais treinados, que receberam a suplementação hormonal, apresentaram melhores respostas em relação à tolerância à glicose, ganho de capacidade física, atividade da enzima citrato sintase, estoques de glicogênio hepático e muscular, evolução do peso corporal e expressão protéica da PI3K, MAPK e AMPK no fígado. Em conclusão, esses resultados demonstraram que a suplementação com melatonina em animais idosos tem grande importância nas adaptações induzidas pelo treinamento físico aeróbio.

Palavras-chave: Glândula pineal. Melatonina. Exercício Físico. Idosos.

ABSTRACT

MENDES, C. **Adaptations of the elderly animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin.** 2012. 75 p. Masters thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The pineal gland, through the synthesis and secretion of melatonin, plays an important physiological and regulatory function in carbohydrate metabolism, influencing the insulin secretion and action. Furthermore, melatonin seems to be of fundamental importance in determining the metabolic adaptations of adipose and muscle tissues. Evidence shows that pinealectomized animals are unable to adapt to stressful conditions, thus fail to develop adaptive metabolic changes to aerobic exercise and therefore do not exhibit the same performance as control trained animals. Knowing that the elderly animal presents a considerable reduction in melatonin production, the objective of this study was to investigate the metabolic adaptation to exercise training in aged animals with and without replacement of melatonin. The animals, Male-Wistar, were divided into four groups: sedentary control (CS), trained control (CT), sedentary treated with melatonin (MS), trained treated with melatonin (MT). The Supplementation with melatonin lasted 16 weeks, while physical training lasted 8 weeks. The animals were sacrificed at the end of experimental protocol and samples of adipose tissue, liver, hypothalamus, soleus and gastrocnemius muscles were collected for biological analyzes. The pineal gland was also removed for assessment of melatonin content. The trained animals who received hormone supplementation showed better responses in relation to glucose tolerance, gain of physical capacity, activity of the citrate synthase enzyme, hepatic and muscular glycogen content, body weight evolution and the protein expression of PI3K, MAPK and AMPK in the liver. In conclusion, the results demonstrated that melatonin supplementation in elderly animals is of great importance in adaptations induced by aerobic exercise.

Keywords: Pineal Gland. Melatonin. Physical Activity. Elderly.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Animais	19
3.2 Reposição sistêmica de melatonina	19
3.3 Treinamento físico	20
3.4 Determinação do peso corporal	21
3.5 Consumo alimentar e ingestão hídrica	21
3.6 Teste de esforço máximo	21
3.7 Teste do lactato	22
3.8 Determinação da atividade enzimática da citrato sintase	22
3.9 Dosagem de melatonina por HPLC	23
3.10 Dosagens plasmáticas	24
3.11 Sacrifício dos animais	24
3.12 Determinação da concentração de glicogênio hepático e muscular	24
3.13 Teste de tolerância à glicose (GTT)	25
3.14 Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real	25
3.15 Extração proteica e imunoblotting	27
3.16 Teste de captação de glicose, síntese de glicogênio e oxidação de glicose no músculo estriado esquelético	28
3.17 Análise estatística	28
4 RESULTADOS	29
4.1 Conteúdo de melatonina na glândula pineal	29
4.2 Avaliação do protocolo de treinamento físico	30
4.2.1 Teste de esforço máximo e ganho de capacidade física	30
4.2.2 Atividade da citrato sintase	33
4.2.3 Teste do lactato	34
4.3 Expressão gênica dos receptores de melatonina no hipotálamo	36
4.4 Ingestão hídrica e consumo alimentar	38
4.5 Peso corporal	40
4.6 Peso do coxim adiposo periepididimal e retroperitoneal	42
4.7 Dosagens plasmáticas	46

4.8 Teste de tolerância à glicose (GTT).....	50
4.9 Expressão proteica no fígado.....	52
4.10 Avaliação do conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	57
4.11 Captação de glicose, síntese de glicogênio e oxidação de glicose no músculo estriado esquelético.....	59
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

O 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; MEISSL, 2003). Presente em todos os vertebrados, a glândula pineal de peixes, anfíbios, répteis e algumas aves é diretamente fotossensível. Nessas mesmas classes, além de suas características de fotossensibilidade e de secreção endócrina, a glândula pineal mantém conexões, tanto aferentes quanto eferentes, com o sistema nervoso central através do pedúnculo pineal.

Nos roedores, a glândula pineal apresenta três porções distintas que formam o complexo pineal: pineal profunda, pedúnculo pineal e pineal superficial. A pineal profunda 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).

Em mamíferos, no entanto, apesar de manter seu caráter endócrino, os pinealócitos perdem sua capacidade fotorreceptora e a pineal, apesar de manter-se conectada diretamente com o sistema nervoso central, passa a estar sob o comando do ciclo de iluminação ambiental, de forma indireta, através de projeções da retina para estruturas diencefálicas que, através de projeções diretas ou indiretas, via sistema nervoso autônomo simpático, atingem a glândula pineal (VOLLRATH, 1981).

O sistema circadiano, formado pelos núcleos supraquiasmáticos que são sincronizados ao claro-escuro e pela via retino hipotalâmica (JOHNSON; MORIN; MOORE, 1988; SPEH; MOORE, 1993), temporiza o sistema neural que controla a síntese e secreção de melatonina que começa nos núcleos paraventriculares hipotalâmicos que se projetam, direta e indiretamente, sobre o simpático cervical pré-ganglionar situado na coluna intermédia lateral da medula torácica alta. Esses neurônios, por sua vez, projetam-se sobre o gânglio cervical superior que, através de ramos carotídeos internos e nervos conários, inervam a pineal. O neurotransmissor principal dessas terminações simpáticas é a noradrenalina, que estimula a síntese de melatonina agindo sobre os adrenoreceptores α e β (subtipos $\alpha 1$ e $\beta 1$), presentes na membrana dos pinealócitos.

Comum a todos os animais, portanto, é o caráter endócrino, cujo controle da função hormonal da glândula é feito pelo ciclo dia-noite. Tal controle é bastante refinado, com o seu hormônio, melatonina, sendo produzido exclusivamente no período noturno e a magnitude e duração de sua concentração no meio extracelular estão na estrita dependência do

escotoperíodo. Dessa forma, a melatonina circulante tem também seu perfil plasmático variável de acordo com as noites mais longas ou mais curtas típicas das diversas estações do ano (REITER, 1993). Fica claro assim a função fisiológica da glândula pineal: sinalizar para o meio interno pela presença ou ausência diária da melatonina na circulação e nos diversos líquidos corpóreos, se é noite ou dia no meio exterior e, através da duração do seu perfil secretório noturno, qual é a estação do ano.

Em função desse papel de temporizador do meio interno, a glândula pineal, associadamente a estruturas neurais – como os núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos – e via síntese e secreção de melatonina, tem um importante papel mediador entre os fenômenos cíclicos ambientais e os processos regulatórios fisiológicos, tais como na regulação de fenômenos circadianos e sazonais associados à reprodução (GOLDMAN, 2001) na termorregulação (RALPH, 1984), na regulação do sistema cardiovascular, em particular da pressão arterial (MCKINLEY et al., 1990), na regulação de ciclos de atividade-reposu e vigília-sono (ARMSTRONG, 1989) e do sistema imunológico (FRASCHINI et al., 1990), na temporização do feto, gestação e parto e na regulação endócrina (DÍAZ, 1986), além de desempenhar uma importante função fisiológica regulatória no metabolismo de carboidratos, influenciando não somente a secreção da insulina (PICINATO et al., 2002), mas principalmente, sua ação.

A insulina é um hormônio anabólico produzido e secretado pelas células B das ilhotas pancreáticas (GEPTS; LECOMPTE, 1981). Seus efeitos metabólicos são de extrema importância, como por exemplo, a manutenção da homeostasia da glicose, crescimento e diferenciação celular, dentre outros (MONDON; DOLKAS; REAVEN, 1980). A sinalização intracelular da insulina em tecidos insulinosensíveis inicia-se com a ligação do hormônio a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase intrínseca. O receptor de insulina (IR) é formado por duas subunidades α localizadas na parte externa da membrana e duas subunidades β transmembranicas. Uma vez ligada a subunidade α , a insulina estimula a autofosforilação da região intracelular do receptor, correspondendo a subunidade β (PATTI; KAHN, 1998). A autofosforilação do receptor de insulina ativa a fosforilação de vários substratos protéicos, sendo os principais IRS-1 e IRS-2, que quando fosforilados em tirosina se ligam e ativam proteínas com domínio SH2, como a fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) (BACKER et al., 1992). A PI3K quando estimulada pela associação com IRS-1 é essencial para o transporte de glicose (CZECH; CORVERA, 1999). Como resultado da ativação da PI3K ocorre fosforilação de uma serina quinase denominada

Akt, que dentre outras funções, participa diretamente do transporte de glicose dependente de insulina.

A melatonina aumenta a sensibilidade tecidual à insulina, por meio do aumento no nível de fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS1), aumento da PI3K (ANHÊ et al., 2004) e alterações na expressão gênica da proteína transportadora GLUT4 (SERAPHIM et al., 1997).

O exercício físico também exerce um papel fundamental no controle da glicemia, estimulando a captação de glicose por meio da contração muscular independente da ação da insulina. Segundo Bem-ezre et al. (1995) e Brambrink et al. (1997), o exercício físico 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).

Além de participar da regulação glicêmica, o exercício também proporciona inúmeras adaptações agudas e crônicas sobre diversos sistemas corporais, como sistema cardiovascular, hormonal e neural, com a finalidade de liberar oxigênio e substratos metabólicos para os grupos musculares em atividade e, ao mesmo tempo, manter a distribuição destes substratos para os órgãos vitais (RICHTER et al., 1998).

Dentre as adaptações fisiológicas proporcionadas pelo treinamento físico, podemos destacar: melhora significativa nas capacidades funcionais relacionadas com a captação e utilização do oxigênio (via aumento da quantidade de capilares, hipertrofia das fibras do tipo I, aumento do conteúdo de mioglobina, entre outros), maior aproveitamento dos ácidos graxos como fonte de energia, aumento da resposta lipolítica às catecolaminas (ENEVOLDSEN et al., 2001), melhora do perfil metabólico, aumento do conteúdo de glicogênio hepático e muscular, que é um fator determinante para o desempenho no exercício aeróbio moderado e prolongado, aumento da atividade de enzimas oxidativas (como a citrato sintase) (KOIVISTO; YKI-JARVINEN; DEFRONZO, 1986) e transporte de substratos metabólicos, como por exemplo, a melhora da cinética do lactato (HANSEN et al., 2005). O treinamento também induz aumento da sensibilidade insulínica através de diversos fatores, incluindo aumento da massa muscular e aumento do fluxo sanguíneo. Tais adaptações são dependentes da intensidade, duração e frequência do exercício, assim como o grau de aptidão física e de determinantes genéticos individuais (MCARDLE, 2008).

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. 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, conseqüentemente, da hipoglicemia (JÉQUIER et al., 1997). Durante o exercício, ocorrem também mudanças nos níveis hormonais, caracterizadas por uma diminuição nos níveis de insulina e uma potencialização das ações hepáticas do glucagon (glicogenólise e gliconeogênese). Além disso, hormônios contra reguladores (que atuam de forma antagônica à ação da insulina) também aumentam, como o cortisol e o GH.

A melatonina (N-acetil 5-metoxitriptamina), por sua vez, parece ser de fundamental importância na determinação das adaptações metabólicas induzidas pelo treinamento físico, tanto no tecido adiposo, quanto no tecido muscular. Esta indolamina, de peso molecular 232,3, é sintetizada a partir do triptofano que é transformado em serotonina após uma hidroxilação (catalisada pela triptofano hidroxilase) e uma descarboxilação subsequente. A serotonina é acetilada pela arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) e, a seguir, tem o hidrogênio do grupamento hidroxila trocado por metil pela hidroxindol-oxi-metiltransferase (HIOMT), gerando melatonina (CIPOLLA-NETO; AFECH, 2008). Este hormônio exerce seus efeitos biológicos, pelo menos em parte, através da ligação a receptores de membrana acoplados à proteína G, tais como MT1 e MT2 (BRYDON et al., 2001; REPERT; WEAVER; GODSON, 1996) e, visto que pode difundir-se livremente através das membranas celulares, também pode agir em receptores nucleares e citoplasmáticos mediando uma variedade de efeitos (CARDINALI et al., 1997).

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; BLASKO, 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). 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 e, a imunossupressão, está envolvida na aceleração dos processos de envelhecimento (GINALDI et al., 1999 a, b e c; MAESTRONI, 2001). 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 et al., 1996).

O exercício físico, por sua vez, também parece ser capaz de influenciar a secreção de melatonina (BUXTON; HERMITE-BALERIAUX; HIRSCHFELD, 1997). Embora diversos estudos evidenciem um aumento dos níveis plasmáticos de melatonina graças ao exercício (ATKINSON; DRUST; REILLY, 2003; KNIGHT; THOMPSON; RABOUD, 2005; RONKAINEN; VAKKURI; KAUPPILA, 1986), alguns outros estudos sugerem uma diminuição ou nenhuma alteração (ELIAS; WILSON; PANDIAN, 1993; MONTELEONE; MAJ; FUSCO, 1990, 1992).

Mazepa et al. (2000) investigaram o efeito da melatonina sobre vários parâmetros do metabolismo de carboidrato e lipídeos em ratos exercitados até a exaustão (efeito agudo) e não exercitados e observaram que a melatonina tem um efeito poupador dos estoques de glicogênio, tendo o conteúdo de glicogênio hepático e muscular aumentado nos animais tratados com melatonina em comparação com os sedentários.

Outros estudos (BORGES-SILVA et al., 2005, 2007) mostram que a pinealectomia, prévia ao treinamento físico aeróbio, resulta em uma diminuição significativa na captação de glicose nos adipócitos, além de influenciar a capacidade dos adipócitos em oxidar substratos e aumentar as taxas de lactato e acetato, mostrando que a glândula pineal altera os padrões de utilização dos substratos pelo adipócito de tal forma que sua ausência perturba a capacidade do adipócito em adaptar-se a demandas metabólicas evocadas pelo exercício, além de uma diminuição da capacidade lipolítica e aumento da capacidade lipogênica no tecido adiposo. Adicionalmente, a produção hormonal de leptina pelo tecido adiposo branco dos ratos pinealectomizados apresenta-se mais reduzida que a dos animais intactos durante o programa de treinamento físico, ao mesmo tempo em que os níveis plasmáticos de corticosterona apresentam-se mais elevados.

Quanto aos efeitos do treinamento crônico em tecidos envolvidos no metabolismo de carboidratos, como o músculo esquelético estriado sóleo e o fígado, o treinamento físico nos animais intactos promove um aumento no conteúdo de glicogênio hepático e uma redução na atividade das enzimas dos adipócitos envolvidas no metabolismo de carboidratos. Já os animais pinealectomizados submetidos ao treinamento, mostram uma diminuição no conteúdo de glicogênio hepático e muscular, e aumento da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos nos adipócitos. Sendo assim, a integridade da glândula pineal é, portanto, fundamental para a adaptação metabólica ao exercício físico aeróbio.

Outros trabalhos demonstram que os ratos pinealectomizados apresentam um quadro de resistência a ação da insulina e de redução na síntese de GLUT4, e que a reposição diária noturna de melatonina nesses animais provoca a reversão completa do quadro induzido pela pinealectomia (ZANQUETA et al., 2003). Alonso-Vale et al. (2004) investigaram as respostas adaptativas ao jejum em animais pinealectomizados e observaram que a ausência de melatonina induz um quadro de resistência insulínica que piora com o jejum e um quadro de reajuste para baixo das respostas anabólicas dos adipócitos, que também se acentua com o jejum.

Em conjunto, esses dados mostram que animais pinealectomizados não conseguem desenvolver as capacidades metabólicas adaptativas em relação ao exercício físico, sendo que a resposta deficitária à insulina, presente nestes animais, não é melhorada pelo treinamento físico, que também não consegue melhorar o padrão metabólico destes animais pinealectomizados que, portanto, não apresentam o mesmo desempenho de animais controles treinados. Esses estudos mostram também que a pinealectomia prejudica a capacidade de adaptação metabólica extremamente necessária para que o animal possa enfrentar condições estressantes (como exercício e jejum, por exemplo) e se adequar metabolicamente a estas situações, ou seja, a ausência da glândula pineal parece impedir as preparações metabólicas rítmicas circadianas típicas do período de atividade (adaptação ao exercício) ou do repouso (adaptação ao jejum). Além disso, prejudica os ajustes rítmicos circadianos disparados pelos fatores associados a disponibilidades de alimentos e a atividade física programada que, sabidamente, são importantes sincronizadores do relógio biológico circadiano.

Considerando que a atividade metabólica dos tecidos adiposo e muscular tem um importante papel na regulação metabólica, e que a ausência da glândula pineal causa um desajuste nessa regulação, propomos complementar os estudos sobre as adaptações metabólicas ao exercício, estendendo o estudo com animais idosos que, sabidamente, apresentam uma redução significativa da produção de melatonina, buscando estabelecer, deste

modo, uma correlação entre conteúdo de melatonina e adaptações ao exercício físico e, ainda, uma comparação mais próxima à realidade humana.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi investigar a adaptação metabólica ao treinamento físico no animal idoso com e sem reposição diária de melatonina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os animais utilizados para experimentação foram ratos albinos da linhagem Wistar, do biotério de criação do Departamento de Fisiologia e Biofísica. Estes animais foram alojados no biotério do Laboratório de Neurobiologia, em condições de ciclo claro-escuro 12 h – 12 h, temperatura regulada (21 ± 2 °C) e com isolamento acústico. Os animais, durante os procedimentos experimentais, dependendo da exigência, ficaram isolados, 1 por caixa ou, no máximo, 2 por caixa maior, tratados com água e ração balanceada (Nuvital®, São Paulo, SP., Brasil) “*ad libitum*”. Os animais foram utilizados com aproximadamente 12 meses de idade, pesando aproximadamente 567 g, e foram divididos em 4 grupos distintos:

- 1) ratos controles sedentários (CS);
- 2) ratos controles treinados (CT);
- 3) ratos suplementados com melatonina sedentários (MS);
- 4) ratos suplementados com melatonina treinados (MT).

3.2 Reposição sistêmica de melatonina

A reposição de melatonina foi feita por via oral, solubilizada na água que os animais ingeriram à noite, na dosagem de 1 mg de melatonina/kg de peso corporal. A melatonina (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) foi inicialmente diluída em 40 µl de etanol absoluto, adicionando 960 µl de água para um volume final de 1 ml. Após este procedimento, a melatonina preparada foi solubilizada na água dos bebedouros. Os bebedouros com melatonina foram colocados 1 h antes da mudança do claro para o escuro e retirados 1 h depois do acender das luzes, trocando-os por bebedouros contendo água sem melatonina. A suplementação com melatonina teve a duração de 16 semanas, sendo 8 semanas antes do início do protocolo de treinamento físico e 8 semanas durante o período de treinamento, conforme indica a figura 1.

Figura 1 – Esquema experimental de 4 meses de suplementação com melatonina e 2 meses de treinamento físico aeróbio

Fonte: Do próprio autor

3.3 Treinamento físico

O treinamento físico dos animais teve a duração de 2 meses (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 e Michelini (1997), adaptado de Negrão et al. (1992). Antes de começar o período de treinamento, os ratos dos grupos treinados foram adaptados na esteira durante uma semana em 15 min por dia, nas velocidades baixas de 0,3 e 0,5 Km/h em estágios de 2 min de duração cada. Após este período, foram feitos aumentos graduais da intensidade de esforço definida por tempo de exercício e velocidade de esteira, conforme indicado na figura 1. O protocolo não inclui alterações na inclinação da esteira. A intensidade de treinamento correspondeu a aproximadamente 50-60% do consumo máximo de oxigênio (VO₂ máx.) (Contarteze et al., 2007).

Para que não ocorressem alterações no horário do pico noturno de secreção de melatonina (atraso ou adiantamento de fase devido ao exercício) (BUXTON; HERMITE-BALERIAUX; HIRSCHFELD, 1997), os animais foram treinados em horários aleatórios, sempre no período de escuro do ciclo de iluminação ambiental, por ser o período circadiano de atividade dessa espécie.

Figura 2 – Desenho esquemático de 2 meses de treinamento físico aeróbio

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

Fonte: Adaptado de Negrão et al. (1992)

3.4 Determinação do peso corporal

Todos os animais foram pesados em balança digital quinzenalmente, durante todo o período experimental.

3.5 Consumo alimentar e ingestão hídrica

O consumo alimentar e a ingestão hídrica de todos os animais foram avaliados na última semana do protocolo experimental, tanto durante o período claro, quanto durante o período escuro. Para tanto, quantidades conhecidas de água e comida foram colocadas em cada caixa e, ao final de cada período (claro e escuro), o restante de comida nas gaiolas foi pesado em balança digital e o restante de água nos bebedouros foi mensurado em uma proveta de plástico.

3.6 Teste do esforço máximo

A eficiência do protocolo de treinamento físico foi avaliada por meio do teste de esforço máximo, que foi 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 atinja a exaustão (BROOKS; WHITE, 1987).

3.7 Teste do lactato

Para a determinação do limiar de lactato, os animais, na última semana do protocolo de treinamento físico, foram submetidos a um teste progressivo em esteira rolante com incremento da velocidade até a exaustão, concomitantemente, foi feita a dosagem do lactato no sangue por meio de lactímetro (Accutrend® Plus, Roche, Mannheim, Alemanha), conforme o esquema respresentado na figura 3:

Figura 3 – Desenho esquemático do teste do lactato

Fonte: Teixeira, 2000

1. corte da cauda.
2. deambulação por 10 minutos para circulação e remoção do lactato produzido devido ao estresse do corte da cauda.
3. repouso de 10 minutos e coleta de sangue ao final deste período para determinação da concentração de lactato em repouso.
4. teste de velocidade progressiva até a exaustão; protocolo escalonado com incrementos de 0,2 km/h a cada 3 min (velocidade inicial 0,3 km/h). A coleta do sangue foi realizada aos 20 s finais de cada carga até a exaustão do animal. (TEIXEIRA, 2010).

3.8 Determinação da atividade enzimática da citrato sintase

A citrato sintase catalisa a entrada de carbono no ciclo de Krebs, reação entre acetil – CoA e oxaloacetato para formar citrato e CoA. O oxaloacetato será regenerado após completada uma série do ciclo de Krebs.

Amostras do músculo sóleo (100 mg) foram suspensas em 1 ml de tampão de extração contendo Tris – HCl (50 mM), EDTA 1 mM, pH 7,4. O material mantido em gelo foi homogeneizado por 10 s e centrifugado (6000 rpm, 15 s, 4 °C) para separação dos restos

celulares. O sobrenadante foi utilizado para a análise da atividade enzimática da citrato sintase.

3.9 Dosagem de melatonina por HPLC

Para a determinação do conteúdo de melatonina na glândula pineal dos animais, foi empregado um sistema de Cromatografia Líquida 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 foram sonicadas (Microson XL 2005, Heat System Inc., Farmingdale, NY, USA) individualmente em 120 µl de uma solução de ácido perclórico 0,1 M, EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02%. Em seguida, foram centrifugadas por 20 min a 14.000 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 +750 mV e corrida com 10 min 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.

3.10 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 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.

As dosagens foram realizadas na última semana do período experimental, com os animais em privação alimentar de 12 horas.

3.11 Sacrifício dos animais

Após 24 h do término do protocolo de 8 semanas de treinamento físico aeróbio os animais foram sacrificados por decapitação (ZT 18) e, em seguida, os tecidos de interesse foram retirados para os testes biológicos.

3.12 Determinação da concentração de glicogênio hepático e muscular

Amostras de fígado e do músculo gastrocnêmio (500 mg) foram suspensas em 3 ml de tampão de extração (1:6), contendo NaF 50 mM; EDTA 5 mM; glicerol 60% e água deionizada, pH 6,5. O material foi homogenizado por 30 s e 500 µl do homogenato foi transferido para o tubo cônico de 15 ml contendo 2 ml de solução de KOH 30%. Em seguida, o tubo foi colocado em banho maria por uma hora. Feita a digestão do tecido, acrescentou-se 200 µl da solução saturada de Na₂SO₄ e o glicogênio foi precipitado em etanol (1 ml de solução / 2,5 ml de etanol) até atingir a concentração de 66%. Os tubos foram agitados em vórtex e colocados em banho maria (água fervente) e, assim que se observou o início de

formação de bolhas, foram retirados do banho. Repetiu-se de 2 a 3 vezes o procedimento de formação de bolhas. Após esta etapa, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm durante 15 min. A formação de um precipitado sob a forma de flocos insolúveis foi então isolada e suspensa em 2 ml de água fervente e acrescentou-se 5 ml de etanol, voltando para o banho maria e aguardando a formação de bolhas novamente. Observou-se novamente a formação de um precipitado e acrescentou-se 2 ml de HCL 1 N fervente e a suspensão foi mantida em banho maria durante uma hora para possibilitar a hidrólise do glicogênio. Em seguida, a solução foi neutralizada com uma solução de NaOH 1 N e submetida a dosagem de glicose.

3.13 Teste de tolerância à glicose (GTT)

O teste de tolerância à glicose foi realizado no ZT 10, na última semana do período experimental, com os animais em privação alimentar de 12 h. Uma primeira coleta de sangue foi feita através de um único corte na extremidade da cauda de cada animal (tempo 0) e, na sequência, foi injetada uma solução de glicose na proporção de 2 g/kg de peso corporal. As amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. 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. O aparelho foi previamente calibrado de acordo com as instruções do fabricante e a cada troca de lote de tiras reagentes.

3.14 Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real

Para que fosse realizada a extração do RNA, as amostras de hipotálamo foram descongeladas em gelo, para que seu RNA não fosse degradado. Em seguida os tecidos foram homogenizadas em 800 µL de Trizol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, California usando-se um Polytron (Kinematica, EUA). Esse macerado foi então deixado durante 5 min em temperatura ambiente. A seguir foi adicionado em cada amostra 160 µL de clorofórmio, e então foram submetidas a homogeneização no Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA). Essa mistura foi deixada mais uma vez em temperatura ambiente durante 10 min e então levada para a centrifuga refrigerada (5417R, Eppendorf, Germany) durante 15 min a 4 °C e em uma velocidade de 14000 rpm. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente e nelas foi acrescentado 400 µL de isopropanol, após misturar por inversão, cada amostra foi

acondicionada a -20°C , durante uma noite. Após esse período, as amostras foram levadas para a centrífuga durante 20 minutos a 4°C e em uma velocidade de 14000 rpm. Após a centrifugação eliminou-se o sobrenadante e adicionou-se ao pellet restante 800 μL de álcool etílico (EtOH) gelado em uma concentração de 70%. E mais uma vez as amostras foram levadas à centrífuga durante 10 min a 4°C em um velocidade de 14000 rpm. O pellet foi então 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 H_2O DEPC para dissolução do pellet. As amostras sofreram então uma rápida centrifugação, foram deixadas por mais 10 minutos em temperatura ambiente, para ter certeza de que o pellet 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, USA). Como o volume final da amostra era de 12 μL , foi adicionada à própria amostra 1 μL da enzima Turbo DNase e 2 μL de Tampão Turbo DNase. As amostras foram então misturadas por inversão e levadas à centrífuga para uma rápida centrifugação. Após foram deixadas a 37°C por 30 min. Após esse período foram imediatamente colocadas em gelo, e sofreram a adição de 2,2 μL do reagente de inativação do kit. Foram então mantidas em temperatura ambiente por 2 min e homogeneizadas por inversão, 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 pellet foi então descartado.

As amostras foram quantificadas no NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). 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 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNA em um volume final de 10 μL .

Após esse procedimento as amostras sofreram a reação de transcriptase reversa pelo kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) para a obtenção de cDNA. Foi adicionado 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®) que foi programado de acordo com as seguintes especificações de ciclo descritas pelo fabricante do kit: 65°C por 5 min, tirar do aparelho e colocar no gelo durante 1 min e adicionar em cada amostra 8 μL de um mix previamente preparado, voltar para o termociclador, ficar a 25°C por 5 minutos, depois a 50°C por 60 minuto e por fim 70°C por 15 min. O mix contém para cada amostra: 4 μL de tampão de enzima, 2 μL de DDT, 1 μL de transcriptase reversa e 1 μL de H_2O estéril.

Para a análise quantitativa por PCR, as amostras foram diluídas dez vezes em água Ultra-Pure™ Distilled Water (Gibco, USA) para que chegassem à concentração de 0,5 ng/μL de cDNA. Para a preparação das placas utilizadas na corrida de PCR em tempo real foram pipetados em cada poço 1 μL de amostra e também 11,5 μl do mix, composto por: 6,25 μl de Power SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), 4,25 μl de água Ultra-Pure, 0,5 μl de cada primer (sense e antisense) por cada gene investigado (volume final por poço de 12,5 μl). Os seguintes primers foram utilizados: *MT1*, *MT2* e *RORA*, os quais foram desenhados a partir da sequência genômica do rato disponível no GenBank®, e fabricados por IDT.

Depois de pipetadas as amostras, 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).

3.15 Extração protéica e immunoblotting

Cada tecido foi submetido à sonicação em 3 ml de tampão de extração constituído de Triton-X 100 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml. Os extratos foram centrifugados a 12000 rpm a 4 °C por 20 min para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação os sobrenadantes das amostras tiveram seu conteúdo protéico quantificado utilizando o reagente de Bradford (*Bio-Rad*®). As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970), acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 5:1 (v:v) e 50 a 100 μg de proteína total foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida, em cada gel havia como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos. A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose através de um aparelho semi-dry (*Bio-Rad*®) por 75 min a 15 V, porém no tampão foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (LiCor) a 4 °C durante a noite. Estas membranas foram então incubadas com anticorpos específicos por 4 horas a temperatura ambiente e em seguida lavada com solução basal (Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%), por 30 min. As membranas foram então incubadas com anticorpo conjugado com fluoróforo (LiCor 800 anti-rabbit e 600 anti-mouse) por 1 h a temperatura ambiente, em caixa escurura. A intensidade das bandas nas membranas foi determinada e quantificada através do

scanner Odyssey (USA). Foram utilizados anticorpos contra AKT, AMPK, MAPK e PI3K (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA,USA).

3.16 Teste de Captação de glicose, síntese de glicogênio e oxidação de glicose no músculo estriado esquelético

Os animais foram sacrificados por decaptação, seus músculo sóleos foram cuidadosa e rapidamente isolado, divididos longitudinalmente em tiras pesando entre 25-35 mg e pré – incubados em tampão bicarbonato de Krebs-Ringer contendo 5,6 mM de glicose, pH 7,4 por 30 min em banho aquecido a 37 °C, 95% O₂ e 5% CO₂, com agitação contínua (100 oscilações por min). Após este período, o músculo foi transferido para outro frasco contendo o mesmo tampão, porém acrescido de 74.10⁸ µBq/ml de 2-deoxi-[2,6-³H] -D-glicose, 111.10⁸ µBq/ml de [U-¹⁴C]-D-glicose. Feniletilamina (0,4 ml), diluída em metanol (1:1, v/v), foi adicionada em compartimento separado para adsorção do ¹⁴CO₂. Os músculos foram incubado por 1 h, nas mesmas condições. Ao final dessa incubação, os músculos foram brevemente lavados em salina (0,9% de NaCl) a 4° C, congelados em nitrogênio líquido, pesados e digeridos em KOH a 1 M, a 70 °C, por 20 min. A captação de 2-deoxi-[2,6-³H] - D-glicose, síntese de [¹⁴C]-glicogênio e oxidação de [U-¹⁴C]-D-glicose foram determinados segundo os métodos descritos por Challiss et al. (1986), Espinal et al. (1983) e Leighton et al. (1985), respectivamente.

3.17 Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada por análise de variância bifatorial (two-way ANOVA), e as eventuais diferenças encontradas avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni, prefixando-se o nível de significância em 95% (p<0,05). Os valores estão representados como média ± erro padrão. Os testes estatísticos foram realizados mediante o programa GraphPad Prism, v.5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Conteúdo de melatonina na glândula pineal

A quantificação de melatonina por HPLC ao final do protocolo experimental mostrou que, conforme o esperado, os animais idosos do grupo controle sedentário apresentaram menor produção deste hormônio em relação a animais jovens, com aproximadamente 2 meses de vida. Mostrou também que o treinamento físico, no grupo CT, induziu uma forte tendência de maior produção de melatonina pela pineal, quando comparado ao grupo CS. Em relação aos que receberam tratamento com melatonina, tanto treinados, quanto sedentários, observa-se maior conteúdo deste hormônio em relação aos animais controles sedentários (figura 4).

Figura 4 – Conteúdo de melatonina na glândula pineal

Conteúdo de melatonina na glândula pineal em cada um dos grupos experimentais (n=7) e em animais jovens (n=6). Significância: & vs Jovens, * vs CS ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.
Fonte: Do próprio autor

4.2 Avaliação do protocolo de treinamento físico

4.2.1 Teste de esforço máximo e ganho de capacidade física

A eficiência do protocolo de treinamento físico foi avaliada por meio da capacidade de corrida no teste de esforço máximo. A figura 5 demonstra que no início do protocolo, os animais dos grupos sedentários e dos grupos treinados apresentavam a mesma capacidade física. Observa-se um aumento significativo da velocidade alcançada pelos animais CT e MT na oitava semana de treinamento, em comparação aos animais CS e MS.

Figura 5 – Velocidade alcançada nos testes de esforço máximo

Avaliação da velocidade máxima (km/h) alcançada durante o teste de esforço realizado no início e no fim do protocolo de treinamento físico ($n=8$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

$p<0,001$ CS vs CT

$p<0,001$ CS vs MT

$p<0,01$ CT vs MS

$p<0,01$ MS vs MT

Fonte: Do próprio autor

O tempo de corrida dos animais durante o teste de exaustão é mostrado na figura 6. Na última semana de treinamento, os animais dos grupos treinados correram por mais tempo em relação aos sedentários. Além disso, o grupo MS realizou o teste durante um tempo significativamente maior em relação ao grupo CS.

Figura 6 – Tempo de corrida nos testes de esforço máximo

Avaliação do tempo de corrida (min) percorrido durante o teste de esforço realizado no início e no fim do protocolo de treinamento físico ($n=8$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

$p<0,001$ CS vs CT

$p<0,05$ CS vs MS

$p<0,001$ CS vs MT

$p<0,001$ CT vs MS

$p<0,001$ MS vs MT

Fonte: Do próprio autor

A figura 7 quantifica o ganho da capacidade física (diferença entre a oitava e a primeira semana de treinamento), demonstrando claramente a eficácia do treinamento em melhorar a potência aeróbia dos animais MT e CT em relação aos grupos sedentários.

Figura 7 – Ganho de capacidade física

Efeito das 8 semanas de treinamento ou sedentarismo sobre a capacidade física dos animais ($n=8$).
Significâncias: + vs S, * vs CS, # vs CT ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.
Fonte: Do próprio autor

4.2.2 Atividade da citrato sintase

A atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo sóleo é comumente utilizada como indicador da capacidade aeróbia do músculo esquelético. Na figura 8, observa-se que o treinamento físico não foi capaz de aumentar significativamente a atividade da citrato sintase nos animais controles treinados, porém, quando associado ao tratamento com melatonina, induziu um aumento da atividade desta enzima, sendo consideravelmente maior no grupo MT em comparação a todos os demais grupos experimentais. Além disso, a melatonina, por si só, foi capaz de aumentar a capacidade aeróbia dos animais MS em relação aos animais dos grupos controles.

Figura 8 – Atividade enzimática

Efeito das 8 semanas de treinamento ou sedentarismo sobre a atividade máxima da citrato sintase ($n=8$). Significâncias: + vs S, * vs CS, # vs CT ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão. Fonte: Do próprio autor

4.2.3 Teste do lactato

Durante a fase inicial de testes progressivos máximos, o metabolismo aeróbio supre as demandas musculares de energia. Com o aumento da intensidade do exercício, torna-se cada vez maior a ativação de um grande número de músculos da via glicolítica e, portanto, aumento da concentração de lactato sanguíneo (SIMÕES et al., 1999).

Verificou-se que em todos os animais ocorreu diferença estatística significativa quando comparadas as concentrações de lactato no repouso e no ponto de exaustão. A descompensação entre produção e remoção do lactato, ou seja, o limiar de lactato (ou limiar anaeróbio) foi maior no grupo MT quando comparado com os outros grupos experimentais. Os animais CT, apesar de terem apresentado maior limiar de lactato em relação aos CS, tiveram um desempenho inferior no teste em relação aos animais MS.

Figura 9 – Conteúdo de lactato sanguíneo

Valores de lactato ao longo do tempo durante teste com velocidade progressiva até a exaustão ($n=4$). Significância: * vs repouso ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

4.3 Expressão gênica dos receptores de melatonina no hipotálamo

As figuras 10, 11 e 12 mostram a expressão gênica dos receptores MT1, MT2 e ROR - alpha no hipotálamo, respectivamente.

A suplementação com melatonina e o exercício físico induziram menor expressão do RNA mensageiro do receptor de membrana MT2 e do receptor nuclear ROR – alpha, quando em comparação com os animais controles sedentários. Em relação ao primeiro, esta redução também foi significativa em relação aos animais treinados do grupo controle. Quanto à expressão gênica do receptor MT1, não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 10 – Expressão gênica de MT1

Expressão gênica do receptor de melatonina MT1 no hipotálamo ($n=6$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: do próprio autor

Figura 11 – Expressão gênica de MT2

Expressão gênica do receptor de melatonina MT2 no hipotálamo ($n=6$). Significâncias: * vs CS, # vs CT ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

Figura 12 – Expressão gênica de ROR - alpha

Expressão gênica do receptor de melatonina ROR-alpha no hipotálamo ($n=6$). Significâncias: + vs S, * vs CS ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

4.4 Ingestão hídrica e consumo alimentar

Nas figuras 13 e 14, temos, respectivamente, a comparação da ingestão hídrica e do consumo alimentar entre os grupos experimentais. Conforme o esperado, o consumo de água e comida dos animais foi maior durante a noite, já que este é o período circadiano de maior atividade da espécie. Observa-se que a suplementação com melatonina e o treinamento físico não induziram qualquer alteração em relação ao consumo alimentar e hídrico.

Figura 13 – Ingestão hídrica

Avaliação da ingestão hídrica entre os grupos experimentais ($n=15$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

Figura 14 – Consumo alimentar

Avaliação do consumo alimentar entre os grupos experimentais ($n=15$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

4.5 Peso corporal

O peso corpóreo dos animais foi avaliado quinzenalmente ao longo de todo período do protocolo experimental. O ganho ou a perda de peso durante esse período foram calculados pela diferença dos pesos final e inicial (Δ) dos animais (figura 15). No início, os quatro grupos apresentavam peso corporal semelhante (Figura 16), porém, ao final das 8 semanas, houve perda ponderal em todos os grupos, exceto no grupo dos animais controles sedentários, que apresentaram um pequeno aumento de peso. Os animais suplementados com melatonina treinados apresentaram uma redução de peso significativa em relação aos seus homólogos sedentários e em relação aos animais controles, tanto treinados, quanto sedentários.

Figura 15 – Delta do peso corporal

Diferença entre o peso corporal final e inicial (Δ) dos animais ($n=14$). Significâncias: + vs S, * vs CS, # vs CT ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

Figura 16 – Evolução do peso corporal

Evolução do peso corporal de todos os grupos ao longo das 8 semanas do protocolo experimental. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

4.6 Peso do coxim adiposo periepididimal e retroperitoneal

Após o sacrifício, os tecido adiposos periepididimal e retroperitoneal dos animais foram retirados e imediatamente pesados. O treinamento foi capaz de reduzir o coxim de gordura periepididimal no grupo CT em relação aos controles sedentários. Além disso, todos os animais dos grupos suplementados com melatonina (treinados e sedentários) apresentaram redução considerável deste tecido em relação ao grupo controle sedentário (figura 17). Porém, não houve diferença estatística entre os grupos quando em comparação ao peso do coxim retroperitoneal, conforme mostra a figura 18.

As figuras 19 e 20 referem-se, respectivamente, à porcentagem dos tecidos adiposos periepididimal e retroperitoneal em relação à massa corpórea total.

Figura 17 – Peso do tecido adiposo periepididimal

Peso do coxim periepididimal dos animais ($n=14$). Significâncias: + vs S, * vs CS ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

Figura 18 – Peso do tecido adiposo retroperitoneal

Peso do coxim retroperitoneal dos animais ($n=8$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.
Fonte: Do próprio autor

Figura 19 – Porcentagem do tecido adiposo periepídidimo em relação à massa corporal

Coxim periepídidimo em relação à massa corporal ($n=14$). Significância: * vs CS ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

Figura 20 – Porcentagem do tecido adiposo retroperitoneal em relação à massa corporal

Coxim retroperitoneal em relação à masa corporal ($n=8$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.
Fonte: Do próprio autor

4.7 Dosagens plasmáticas

A figura 21 mostra que, ao final do período experimental, não houve diferença entre os grupos em relação à glicemia de jejum. Semelhantemente, também não houve diferença em relação ao nível de colesterol sanguíneo (figura 22). Porém, o conteúdo de triglicérides foi menor nos grupos suplementados com melatonina e no grupo CT em relação aos controles sedentários (figura 23).

Figura 21 – Glicemia de jejum

Avaliação da glicemia dos animais ($n=14$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.
Fonte: Do próprio autor

Figura 22 – Conteúdo de colesterol plasmático

Avaliação do colesterol dos animais ($n=8$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.
Fonte: Do próprio autor

Figura 23 – Conteúdo de triglicérides plasmático

Avaliação do triglicérides dos animais ($n=14$). Significâncias: + vs S, * vs CS ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.
Fonte: Do próprio autor

O ganho ou a perda dos conteúdos de triglicérides e colesterol foram calculados pela diferença dos valores finais e iniciais (Δ) dos animais, conforme mostram as figuras 24 e 25, respectivamente.

Figura 24 – Delta do conteúdo de triglicérides plasmático

Delta do conteúdo de triglicérides dos animais ($n=14$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.
Fonte: Do próprio autor

Figura 25 – Delta do conteúdo de colesterol plasmático

Delta do conteúdo de colesterol dos animais ($n=8$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.
Fonte: Do próprio autor

4.8 Teste de tolerância à glicose (GTT)

O perfil glicêmico (figura 26) e a área sob a curva (figura 27) durante o GTT evidenciaram que a suplementação com melatonina induziu uma melhora significativa na tolerância à glicose quando em comparação com os animais controles sedentários.

Figura 26 – Curva glicêmica durante GTT

Curva glicêmica de todos os grupos ao longo do teste de tolerância à glicose. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

Figura 27 – Área incremental sob a curva dos níveis séricos de glicose

Área sob a curva da glicose sérica durante teste de tolerância á glicose ($n=14$). Significância: * vs CS ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

4.9 Expressão proteica no fígado

No estudo hepático de expressão protéica, proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina, como: PI3K (fosfatidilinositol – 3 kinase), AKT ou PKB (proteína kinase B) e MAPK (mitogen-activated protein kinase), além da AMPK (proteína kinase ativada por adenosina monofosfato), foram quantificadas.

A expressão da proteína PI3K no fígado foi significativamente maior no grupo dos animais suplementados com melatonina e exercitados quando em comparação com todos os demais grupos, conforme mostra a figura 28. Apesar de uma tendência de maior expressão da proteína AKT no fígado dos animais suplementados com melatonina quando em comparação com os animais dos grupos controles e, ainda, nos treinados em relação aos seus homólogos sedentários, não houve diferença estatística entre os grupos (figura 29). Na figura 30, observa-se que o tratamento com melatonina aliado ao exercício físico, induziu maior expressão da proteína MAPK no fígado, em comparação com o grupo CT.

Figura 28 – Conteúdo proteico da PI3K

Expressão da PI3K no fígado dos animais ($n=6$). Significâncias: + vs S, * vs CS, # vs CT ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

Figura 29 – Conteúdo proteico da Akt

Expressão da AKT no fígado dos animais ($n=6$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.
Fonte: Do próprio autor

Figura 30 – Conteúdo proteico da MAPK

Expressão da MAPK no fígado dos animais ($n=6$). Significâncias: # vs CT ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

A proteína kinase ativada por AMP, a AMPK, apresentou maior expressão no fígado dos animais suplementados com melatonina e treinados em relação aos animais controles treinados, conforme mostra a figura 31.

Figura 31 – Conteúdo proteico da AMPK

Expressão da AMPK no fígado dos animais ($n=6$). Significâncias: # vs CT ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

4.10 Avaliação do conteúdo de glicogênio hepático e muscular

As figuras 32 e 33 a seguir ilustram o conteúdo de glicogênio hepático e muscular (gastrocnêmio) dos animais, respectivamente. No estado treinado, a reposição sistêmica com melatonina provocou um aumento do conteúdo de glicogênio hepático em relação ao estado sedentário com ou sem reposição do hormônio. Quanto ao tecido muscular, os animais MT apresentaram maiores valores de conteúdo de glicogênio em comparação com todos os demais grupos, porém, as diferenças foram estatisticamente diferentes apenas em relação aos animais CS.

Figura 32 – Conteúdo de glicogênio hepático

Comparação do conteúdo de glicogênio hepático entre os animais ($n=6$). Significâncias: + vs S, * vs CS ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

Figura 33 – Conteúdo de glicogênio muscular

Comparação do conteúdo de glicogênio muscular entre os animais ($n=6$). Significâncias: * vs CS ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

4.11 Captação de glicose, síntese de glicogênio e oxidação da glicose a CO_2 no tecido muscular

Apesar de os grupos treinados apresentarem maiores valores de captação de glicose, síntese de glicogênio e oxidação da glicose a CO_2 no músculo estriado esquelético (figuras 32, 34 e 35, respectivamente), em comparação com os animais dos grupos sedentários, não houve diferença estatística significativa entre os grupos, tanto na taxa basal, quanto na taxa máxima.

Figura 34 – Captação de glicose no músculo sóleo

Taxas basais e máximas da captação de glicose no tecido muscular ($n=5$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

Figura 35 – Síntese de glicogênio no músculo sóleo

Taxas basais e máximas da síntese de glicogênio no tecido muscular ($n=5$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

Figura 36 – Oxidação de glicose a CO_2 no músculo sóleo

Taxas basais e máximas da oxidação de glicose a CO_2 no tecido muscular ($n=5$). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, investigamos o papel da suplementação com melatonina na adaptação ao treinamento físico aeróbio em animais idosos. Nós demonstramos que, nestes animais, o tratamento com melatonina e o exercício induziram redução da massa corporal ao longo do período experimental, ganho de capacidade física, diminuição do conteúdo de triglicérides, maior tolerância à glicose durante o GTT, aumento dos estoques de glicogênio hepático e muscular e, ainda, aumento hepático das proteínas PI3K, MAPK e AMPK. Comprovamos também que a produção de melatonina pela glândula pineal estava prejudicada nos animais idosos controles sedentários e que, o exercício crônico, induziu uma tendência de maior produção do hormônio. Os resultados observados em relação ao aumento do conteúdo de melatonina nos animais tratados devem-se, provavelmente, não à maior produção, mas sim ao contato da pineal com melatonina graças à suplementação, realizada no período noturno, há algumas horas precedentes ao sacrifício.

Em relação ao programa de treinamento físico aeróbio, os resultados do teste de esforço máximo indicaram que o esquema experimental utilizado é válido, uma vez que houve sinal de adaptação nos animais treinados.

A atividade da citrato sintase também foi utilizada como parâmetro indicativo de adaptação ao exercício, uma vez que é uma importante marcadora do metabolismo oxidativo (BASSET; HOWLEY, 2000). Diversos estudos demonstraram um aumento significativo na atividade dessa enzima na musculatura estriada esquelética de ratos após o programa de treinamento, tanto em animais jovens, quanto de meia idade (ALESSIO; GOLDFARB, 1988; RÁDAK et al., 1999). Neste trabalho, os dados mostraram que apenas os animais que receberam o tratamento diário com melatonina apresentaram efeito adaptativo na atividade da citrato sintase, sendo que, somente o exercício, não foi capaz de induzir tais melhoras. De maneira semelhante, os animais controles também apresentaram desempenho inferior no teste do lactato, utilizado para identificar o limiar anaeróbio, ponto em que ocorre aumento brusco da razão de produção e remoção do lactato (BROOKS, 1986). Uma possível explicação para esses resultados seria uma diminuição da capacidade oxidativa do músculo sóleo em decorrência da menor produção de melatonina, levando a uma redução da atividade do ciclo de Krebs e, conseqüentemente, queda na geração de ATP e mais rápida exaustão no esforço prolongado. Esses dados mostram claramente que a melatonina é de grande importância na regulação do metabolismo oxidativo (REITER et al., 2004) e que o tratamento diário melhora

consideravelmente o desempenho físico induzido pelo treinamento, favorecendo a adaptação metabólica a ele (LOPES, 2009).

Após o período experimental, demonstramos que o exercício físico aeróbio de intensidade moderada e a suplementação com melatonina induziram uma diminuição do ganho de peso e do tamanho do adipócito, em particular, do coxim adiposo periepídimal, mesmo sem alterações significativas na ingestão alimentar, mostrando, deste modo, um importante papel da melatonina na regulação do peso corpóreo. Estes dados estão de acordo com Alonso-Vale et al. (2005), que mostraram um papel anti lipogênico da melatonina por meio da inibição da diferenciação de pré adipócitos em adipócitos, reduzindo, portanto, provavelmente, o número de células. Ainda dentro deste contexto, Rasmussen et al. (1999) verificaram que a simples administração diária de melatonina diminui a gordura visceral em ratos de meia idade.

Além da redução de peso, observamos também que os animais treinados e os animais suplementados com melatonina (treinados e sedentários) apresentaram redução das taxas de triglicérides, que se encontravam aumentadas nos animais idosos controles mantidos sedentários.

No presente trabalho, demonstramos que o treinamento físico aeróbio aliado ao tratamento com melatonina promoveu um aumento hepático das proteínas que participam da via intracelular de sinalização à insulina PI3K e MAPK. Já o exercício físico, por si só, não induziu alterações significativas nestas proteínas. Sendo assim, esses achados confirmam que a glândula pineal, via síntese e secreção de melatonina, desempenha um importante papel no metabolismo de carboidratos, conforme demonstrado por diversos estudos. Lima et al. (1998) demonstraram que a pinealectomia crônica prejudica a resposta e ação da insulina em roedores e provoca uma redução de 40% do conteúdo de GLUT4 no tecido adiposo e uma redução de mais de 50% no tecido muscular (SERAFIM et al., 1997). Além disso, a pinealectomia também prejudica a organização metabólica em relação à maior ou menor capacidade pancreática de secretar insulina frente a um estímulo glicêmico (PICINATO et al., 2002).

A AMPK é uma enzima importante para a manutenção energética intracelular, especificamente durante situações de estresse, como o exercício ou privação alimentar. Evidências sugerem que esta proteína participa de eventos metabólicos importantes como: a lipólise (adiposo), metabolismo de lipídios (fígado e músculo), transporte de glicose (músculo e adiposo) e metabolismo de glicogênio (músculo e fígado) (HARDIE, 1997). Diversas pesquisas demonstraram que a ativação da AMPK durante o exercício promove aumento na

captação de glicose, melhora na homeostasia glicídica e sensibilidade à insulina e aumenta a capacidade oxidativa (MUSI et al., 2001; WINDER et al., 2000). Neste estudo, os resultados mostraram que 8 semanas de treinamento físico aeróbico em animais idosos, sem o tratamento com melatonina, não induziu alterações significativas na expressão desta proteína no fígado, porém, o conteúdo hepático de AMPK foi significativamente maior nos animais treinados que foram suplementados com melatonina por 16 semanas. Deste modo, esses resultados fornecem evidência de que a melatonina é fundamental para adaptações a situações de estresse, como o exercício físico.

Está bem estabelecido na literatura que o treinamento físico regular é extremamente benéfico na intolerância à glicose (EVANS et al., 1997; TUOMILEHTO et al., 2001), apesar disso, verificamos durante o GTT, que o exercício, apesar de induzir uma tendência, não aumentou significativamente a tolerância à glicose em animais idosos, em relação aos controles sedentários. Porém, o exercício físico, quando associado à suplementação com melatonina, foi eficaz em melhorar as respostas glicêmicas durante o teste. Além disso, a simples suplementação com melatonina foi capaz, por si só, de melhorar a tolerância à glicose nos animais MS em comparação com os animais sedentários que não receberam o hormônio. Estes dados vão ao encontro dos relatos de Milcu et al. (1971) que reportaram que a infusão de extrato de pineal promove aumento da tolerância à glicose em resposta a uma sobrecarga glicídica.

O aumento dos estoques de glicogênio é um fator determinante para o desempenho no exercício aeróbico moderado e prolongado (BERGSTROM et al., 1967), sendo considerado o fator limitante mais importante para performance em provas de resistência (HAGERMAN, 1992). Mazepa et al. (2000), demonstraram que a melatonina tem um efeito poupador dos estoques de glicogênio, visto que o conteúdo de glicogênio (hepático e muscular) aumentou em animais exercitados tratados com melatonina em relação aos sedentários. Outros trabalhos também mostraram que a suplementação com melatonina antes do exercício preserva os estoques de glicogênio, mantém a glicemia e reduz os níveis plasmáticos e hepáticos de lactato (KAVA et al., 2006; SANCHEZ-CAMPOS; AREVALO; MESONERO, 2001). No presente estudo, o treinamento físico aeróbico via suplementação com melatonina aumentou os estoques de glicogênio tanto no fígado, quanto no tecido muscular esquelético, demonstrando a importância da melatonina na manutenção do conteúdo de glicogênio hepático e muscular e na adaptação ao treinamento físico em animais idosos. Esses achados complementam os relatos de Borges-Silva et al. (2007), que demonstraram que em animais jovens, a

pinelectomia reduz os estoques de glicogênio no músculo e no fígado e atenua a capacidade de adaptação ao exercício.

A presença de receptores da melatonina no sistema nervoso central, especialmente no hipotálamo, está relacionada, entre outras coisas, à regulação do metabolismo energético (DREW et al. 2001). Neste contexto, Anhê et al. (2004) mostraram que no hipotálamo de ratos, a melatonina é capaz de induzir a rápida ativação do receptor de insulina através de sua interação com o receptor MT2 e, ainda, induzir a ativação do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1). Mais recentemente, Nogueira et al. (2011) e Faria (2012) demonstraram que a melatonina, agindo no hipotálamo de ratos, inibe a neoglicogênese durante a noite e facilita durante o dia, de maneira a regular o ritmo diário do metabolismo, alocando a neoglicogênese ao período de repouso e a glicólise e maior ação da insulina ao período de maior atividade da espécie. Neste trabalho, o exercício físico realizado sempre no período noturno associado à suplementação com melatonina, podem ter reforçado esse sinal circadiano, atuando como sincronizadores adicionais da distribuição diária do metabolismo energético. Sendo assim, a diminuição da expressão gênica dos receptores de melatonina no hipotálamo observada nos animais tratados com melatonina exercitados, pode ser graças não apenas a uma *down regulation* devido à suplementação (MASSON-PÉVET, 2007), mas também a uma intensificação da sinalização insulínica periférica a hipotalâmica.

Existe uma relação entre glândula pineal e a regulação do metabolismo de carboidratos (LIMA et al., 1998). Evidenciamos que, em animais idosos, o treinamento físico via suplementação com melatonina melhorou diversas respostas em relação ao metabolismo de carboidratos, como tolerância à glicose durante o GTT e aumento do conteúdo hepático de proteínas importantes que participam da homeostasia glicêmica. Porém, em relação à captação de glicose e à capacidade de oxidação da glicose a CO_2 e água no sóleo, apesar de uma leve tendência de maiores valores nos animais CT e MT, não verificamos diferenças estatísticas entre os grupos. Houve aumento no conteúdo de glicogênio pelo treinamento físico e suplementação com melatonina, mas não houve aumento na resposta à insulina com relação à síntese de glicogênio no músculo estriado esquelético.

Com o controle das doenças infectocontagiosas e a melhora na qualidade de vida, o número de pessoas que atingem a terceira idade tende a aumentar, seguido por um crescente predomínio das morbidades crônicas relacionadas ao envelhecimento, como hipertensão, obesidade, doença da artéria coronária e o diabetes mellitus (SMITH, 2007). Devido a este fato, torna-se cada vez mais necessária a adoção de um estilo de vida saudável associado à prática regular de atividade física. Neste âmbito, o presente estudo demonstra a grande

importância do uso terapêutico da melatonina como uma forma de melhorar as respostas benéficas induzidas pelo exercício físico regular em indivíduos idosos que, sabidamente, apresentam prejuízo de sua produção.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a diminuição da produção de melatonina pela glândula pineal, que ocorre ao longo do envelhecimento, parece impedir as adaptações metabólicas necessárias induzidas pelo treinamento físico aeróbio em animais idosos.

REFERÊNCIAS*

- ALESSIO, H. M.; GOLDFARB, A. H. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. **J. Appl. Physiol.**, v. 64, p. 1333-1336, 1988.
- ALONSO-VALE, M. I. C.; ANHÊ, G.; BORGES-SILVA, C. N.; ANDREOTTI, S.; PERES, S. B.; CIPOLLA-NETO, J.; LIMA, F. B. Pinealectomy alters adipose tissue adaptability to fasting in rats. **Metabolism**, v. 53, p. 500-506, 2004.
- ALONSO-VALE, M. I. C.; PERES, S. B.; VERNOCHE, C.; FARMER, S. R.; LIMA, F. B. Adipocyte differentiation is inhibited by melatonin through the regulation of C/EBP β transcriptional activity. **J. Pineal Res.**, v. 47, p. 221-227, 2009.
- ANHÊ, G. F.; CAPERUTO L. C.; PEREIRA-DA-SILVA, M.; SOUZA L. C.; HIRATA, A. E.; VELLOSO, L. A.; CIPOLLA-NETO, J.; CARVALHO, C. R. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus, **J. Neurochem.**, v. 90, p. 559-566, 2004.
- ARMSTRONG, S. M. Melatonin and circadian control in mammals. **Experientia**, v. 45, p. 932-938, 1989.
- ATKINSON, G.; DRUST, B.; REILLY, T. The relevance of melatonin to sports medicine and science. **Sports Med.**, v. 33, p. 809–831, 2003.
- BEN-EZRA, V.; JANKOWSKI, C.; KENDRICK, K.; NICHOLS, D. Effect of intensity and energy expenditure on postexercise insulin responses in women. **J. Appl. Physiol.**, v. 79, p. 2029 – 2034, 1995.
- BERGSTROM, J.; HERMANSEN, L.; HULTMAN, E.; SALTIN, B. Diet, muscle glycogen and physical performance. **Acta Physiol. Scand.**, v. 71, p. 140–50, 1967.
- BJORNTORP, P. Neuroendocrine aging. **J. Intern. Med.**, v. 238, 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, p. 674-678, 1996.
- BORGES-SILVA, C. N.; ALONSO-VALE, M. I. C.; FRANZÓI DE MORAES S. M.; TAKADA, J.; ANDREOTTI, S.; PERES, S. B.; SKOPURA, A.L.; CIPOLLA-NETO, J.; PITHON-CURI, T. C.; LIMA, F. B. Pinealectomy impairs adipose tissue adaptability to exercise in rats. **Pineal Res.**, v. 38, p. 278–283, 2005.
- BACKER, J. M.; MYERS JR., M. G.; SHOELSON, S. E.; CHIN, D. J.; SUN, X. J.; MIRALPEIX, M.; HU, P.; MARGOLIS, B.; SKOLNIK, E. Y.; SCHLESSINGER, J. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **The Embo Journal**, v. 11, p. 3469-3479, 1992.

* De acordo com:

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

BASSET, D. R.; HOWLEY, E. T. Maximum oxygen uptake: “classical” versus “contemporary” viewpoints. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, v. 29, p. 591-603, 1997.

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.; 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.

BRAMBRINK, J. K.; FLUCKEY, J. D.; HICKEY, M.S.; CRAIG, B.W. Influence of muscle mass and work on post – exercise glucose and insulin responses in young untrained subjects. **Acta Physiol. Scand.**, v. 161, p. 371-377, 1997.

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

BROOKS, G. A. The lactate shuttle during exercise and recovery. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, v. 18, p. 360-368, 1986.

BROOKS, G. A.; WHITE, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats totreadmill exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 45, p. 1009- 1015, 1987.

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

BRYDON, L.; PETIT, L.; STROSBERG, A. D.; JOCKERS, R. Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. **Endocrinology**, v. 142, p. 473-481, 2003.

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

CARDINALI, D. P.; GOLOMBEK, D. A.; ROSENSTEIN, R. E.; CUTRERA, R. A.; ESQUIFIN, A.I. Melatonin site and mechanism of action: single or multiple? **J. Pineal Res.**, v. 263, p. 32- 39, 1997.

CHALLISS, R. A. J.; LOZEMAN, F. J.; LEIGHTON, B.; NEWSHOLME, E. A. Effects of the beta-adrenoceptor agonist isoprenaline on insulin-sensibility in soleus muscle of the rat. **Biochem. J.**, v. 233, p. 377-381, 1986.

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

CONTARTEZE, R. V.; MANCHADO, F. B.; GOBATTO, C. L.; MELLO, M. A. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. **Comp, Biochem. Physiol.**, v. 151, p. 415-422, 2008.

CZECH, M. P.; CORVERA, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 1865-1868, 1999.

DIAZ, B.; BLAZQUEZ, E. Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. **Horm. Metab. Res.**, v. 18, p. 225-229, 1986.

DREW, J. E.; BARRETT, P.; MERCER, J.G.; MOAR, K.M.; CANET, E.; DELAGRANGE, P.; MORGAN, P. J. Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. **J. Neuroendocrinol.**, v. 13, p. 453-458, 2001.

DUFLOTH, D. L.; MICHELINI, L. C. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarius. **Am. J. Physiol.**, v.273, p. 1271-1287, 1997.

EKSTROM, 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. 1679-700; 2003. Review.

ELIAS, A. N.; WILSON, A. F.; PANDIAN, M. R. Melatonin and gonadotropin secretion after acute exercise in physically active males. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.**, v. 66, 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, p. 871-877, 2001.

ESPINAL, J.; DOHM, G. L.; NEWSHOLME, E.A. Sensitivity to insulin of glycolysis and glycogen synthesis of isolated soleus muscle strips from sedentary, exercised-trained rats. **Biochem. J.**, v. 212, p. 453-458, 1983.

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

FARIA, J.A. **Comunicação inter-órgão ativada pela melatonina promove o controle da neoglicogênese.** 2012. Dissertação (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2012.

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

GEPTS, W.; LECOMPTE, P. M. The pancreatic islets in diabetes. **Am. J. Med.**, v. 70, p. 105-115, 1981.

GRAPHPAD Software, Inc. 2007. Prism (data analysis system), version 5. Software e Guia do Usuário. Disponível em: <<http://www.graphpad.com/welcome.htm>>.

GINALDI, K.; DE MARTINIS, M.; D’OSTILIO, A.; MARINI, L.; LORETO, M. F.; CORSO, M. D.; QUOGLINO, D. The immune system in the elderly: I. Specific humoral immunity. **Immunol. Res.**, v. 20, p. 101–108, 1999a.

GINALDI, K.; DE MARTINIS, M.; D'OSTILIO, A.; MARINI, L.; LORETO, M. F.; CORSO, M. D.; QUOGLINO, D. The immune system in the elderly: II. Specific cellular immunity. **Immunol. Res.**, v. 20, p. 109–115, 1999b.

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

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

HARDIE, D. G.; CARLING, D. The AMP-activated protein kinase - fuel gauge of the mammalian cell? **Eur. J. Biochem.**, v. 246, p. 259-273, 1997.

HARDIE, D. G. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. **Endocrinology**, v. 144, p. 5179-5183, 2003.

HAGERMAN, F. C. Energy metabolism and fuel utilization. **Med .Sci Sports. Exerc.**, v. 24, p. 309–314, 1992.

HANSEN, A .K.; FISCHER, C. P.; PLOMGAARD, P.; ANDERSEN, J. L.; SALTIN, B.; PEDERSEN, B. K. Skeletal muscle adaptation: train-ing twice every second day vs. training once daily. **J. Appl. Physiol.**, v. 98, p. 93–99, 2005.

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

JOHNSON, R. F.; MORIN, L .P.; MOORE, R. Y. Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. **Brain Res.**, v. 462, p. 301-312, 1988.

KAHN, C. R. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. **Ann. Rev. Med.**, v. 36, p. 429-451, 1985.

KARASEK, M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. **Exp. Gerontol.**, v. 39, p. 1723-172, 2004.

KAYA, O.; GOKDEMIR, K.; KILIC, M. Melatonin supplementation to rats subjected to acute swimming exercise: itseffect on plasma lactate levels and relation with zinc. **Neuro Endocrinol. Lett.**, v.27, p. 263–266, 2006.

KNIGHT, J. A.; THOMPSON, S.; RABOUD, J .M. Light and exercise and melatonin production in women. **Am. J. Epidemiol.**, v. 162, p. 1114–1122, 2005.

KOIVISTO, V. A.; YKI-JARVINEN, H.; DEFRONZO, R. A. Physical training and insulin sensitivy. **Diabetes Metab. Rev.**, v. 1, p. 4445-4481, 1986.

LEIGHTON, B.; BUDOHOSKI, L.; LOZEMAN, F.J.; CHALLISS, R.A.; NEWSHOLME, E. A. The effect of prostaglandins E1, E2 and F2 alpha and indomethacin on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis to insulin in stripped soleus muscles of the rat. **Biochem. J.**, v. 277, p. 337 – 340, 1985.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LIMA, F. B.; MACHADO, U. F.; BARTOL, L.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA D. H.; MORAES, S. M. F. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. 934-941, 1998.

LOPES, A. M. S. **Efeitos do exercício sobre a atividade metabólica do tecido adiposo e muscular de ratos pinealectomizados tratados ou não com melatonina**. 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MAESTRONI, G. J. M. The immunotherapeutic potential of melatonin. **Exp. Opin. Invest. Drugs**, v. 10, p. 467–476, 2001.

MASSON-PÉVET, M. Melatonin in the circadian system. **J. Soc. Biol.**, v. 201, p. 77-83, 2007.

MAZEPA, R. C.; CUEVAS, M. J.; COLLADO, P. S.; GONZALES-GALLEGO, J. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in non exercised and exercised rats. **Life Sci.**, v. 66, p. 153-160, 2000.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. L.; KATCH, V. L. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

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.

MILCU, S. M.; NANU-LONESCU, I. The effect of pinealectomy on the plasma insulin rats. In: WOLTENSHOLME, G. E. W.; KNIGHT, J. (Ed.) **The pineal gland**. Edinburg: Churchill Livingstone, 1971. p. 345-357.

MOLLER, M. Fine structure of the pinealopetal innervations of the mammalian gland. **Microrosc. Res. Techn.**, v. 21, n. 3, p. 188-204, 1992.

MONDON, C. E.; DOLKAS, C. B.; REAVEN, G. M. Site of enhanced insulin sensitivity in exercise-trained rats at rest. **Am. J. Physiol.**, v. 239, p. E169-177, 1980.

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

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

MUSI, N.; HAYASHI, T.; FUJII, N.; HIRSHAN, M. F.; WITTERS, L. A.; GOODYEAR, L. J. AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 280, p. 677-684, 2001.

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

NOGUEIRA, T. C.; LELLIS-SANTOS, C.; JESUS, D. S.; TANEDA, M.; RODRIGUES, S. C.; AMARAL, F. G.; LOPES, A. M. S.; CIPOLLA-NETO, J.; BORDIN, S.; ANHE, F. G. Absence of Melatonin Induces Night-Time Hepatic Insulin Resistance and Increased Gluconeogenesis Due to Stimulation of Nocturnal Unfolded Protein Response. **Endocrinology**, v. 152, p. 1253–1263, 2011.

PANG, S. F.; TSANG, C. W.; HONG, G. X.; VIP, 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.**, p. 179-192, 1990.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J. Bas. Clin. Physiol. Pharmacol.**, v. 9, p. 89-109, 1998.

PICINATO, M. C.; HARBER, E. P.; CARPINELLI, A. R., CIPOLLA-NETO, J. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. **J. Pineal Res.**, v. 33, p. 172-177, 2002.

RADÁK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; OHNO, H.; SASVÁRI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 69-74, 1999.

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, 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, p. 100-102, 1996.

RALPH, C. L. Pineal bodies and thermoregulation. In: REITER, R. J. (Ed.). **The pineal gland**. New York: Raven, 1984. p. 193-220.

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 youth levels. **Endocrinology**, v. 140, p. 1009– 1012, 1999.

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

REITER, R. The ageing pineal gland and its physiological consequences. **Bioessays**, v. 14, p. 169-175, 1992.

REITER, R. J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. **Experientia**, v. 49, p. 654-664, 1993

REYNOLDS, T. H.; BROZINICK, J. T.; ROGERS, J. R., M. A.; CUSHMAN, S. W. Effects of exercise training on glucose transport and cell surface GLUT4 in isolated rat epitrochlearis muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. 320-325, 1997.

RICHTER, E. A.; JENSEN, P.; KIENS, B.; KRISTIANSEN, S. Sarcotomal glucose transport and GLUT – 4 translocation during exercise are diminished training. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. 89-95, 1998.

RONKAINEN, H.; VAKKURI, O.; KAUPPILA, A. Effects of physical exercise on the serum concentration of melatonin in female runners. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 65, p. 827–829, 1986.

SANCHEZ-CAMPOS, S.; AREVALO, M.; MESONERO, M. J. Effects of melatonin on fuel utilization in exercised rats: role of nitric oxide and growth hormone. **J. Pineal Res.**, v. 31, p. 159–166, 2001.

SERAPHIM, P. M.; BARTOL, CIPOLLA-NETO, J.; MACHADO, U.F. Quantification of Glut 4 transporters in insulin sensitive tissues from pinealectomized rats. **Pineal Update.**, v. 99, p. 106, 1997.

SIMÕES, G.; CAMPBELL, C. S. G.; KOKUBUN, E.; DENADAI, B. S.; BALDISSERA, V. Blood glucose responses in humans mirror lactate responses for individual anaerobic threshold and for lactate minimum intrack tests. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 80, p. 34-40, 1999.

SPEH, J. C.; MOORE, R. Y. Retinohypothalamic tract development in the hamster and rat. **Dev. Brain Res.**, v. 76, p. 171-178, 1993.

STALLKNECHT, B.; VINTEN, J.; PLOUG, T.; GALBO, H. Increased activities of mitochondrial enzymes in white adipose tissue in trained rats. **Am. J. Physiol.**, v. 24, p. 410-414, 1991.

SMITH JR., S. C. Multiple risk factors for cardiovascular disease and diabetes mellitus, **Am J Med.**, v. 120, p. 3-11, 2007

TEIXEIRA, P. S. A. **Caracterização do treinamento físico experimental de endurance em esteira adaptada através de marcadores metabólicos energéticos.** 2010. 172 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da saúde , Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

TUOMILEHTO, J.; LINDSTROM, J.; ERIKSSON, J. G.; VALLE, T.; AMALAINEN, H.; LLANNE-PARIKKA, P. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in life-style among subjects with impaired glucose tolerance. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 343-350, 2001.

WINDER, W. W.; THOMSON, D. M. Cellular energy sensing and signaling by AMP-activated protein kinase. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 47, p. 332-347, 2007.

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, p. 3783-3790, 2001.

ZANQUETTA, M. M.; SERAPHIM, P.M.; SUMIDA, D. H.; CIPOLLA-NETO, J.; MACHADO, U. F. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT 4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. **J. Pineal Res.**, v. 35, p. 141-148, 2003.