



WLADIMIR RAFAEL BECK

RESPOSTA ERGOGÊNICA DA MELATONINA NO NADIR E ACROFASE DA
ATIVIDADE ESPONTÂNEA E SUAS CONSEQUÊNCIAS NA ATIVIDADE DA VIA IKK/
NF- κ B E DANO TECIDUAL MUSCULAR

Campinas

2015

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA

WLADIMIR RAFAEL BECK

RESPOSTA ERGOGÊNICA DA MELATONINA NO NADIR E ACROFASE DA
ATIVIDADE ESPONTÂNEA E SUAS CONSEQUÊNCIAS NA ATIVIDADE DA VIA IKK/
NF- κ B E DANO TECIDUAL MUSCULAR

Tese apresentada à Faculdade de Educação Física da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor
em Educação Física na área de Biodinâmica do
Movimento e Esporte.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
WLADIMIR RAFAEL BECK, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. CLAUDIO ALEXANDRE GOBATTO.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "C. Gobatto", written over a horizontal line.

Campinas

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Educação Física
Dulce Inês Leocádio dos Santos Augusto - CRB 8/4991

B388e Beck, Wladimir Rafael, 1982-
Resposta ergogênica da melatonina no nadir e acrofase da atividade espontânea e suas consequências na atividade da via IKK/NF-kB e dano tecidual muscular / Wladimir Rafael Beck. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Claudio Alexandre Gobatto.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Educação Física.

1. Melatonina. 2. Exercício aeróbio. 3. Ergogenia. 4. Fadiga. 5. Inflamação. I. Gobatto, Claudio Alexandre. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Educação Física. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Ergogenic response of melatonin at nadir and acrophase of spontaneous activity and its consequences on IKK/NF-kB pathway activity and muscle tissue damage

Palavras-chave em inglês:

Melatonin
Aerobic exercise
Ergogenic
Fatigue
Inflammation

Área de concentração: Biodinâmica do Movimento e Esporte

Titulação: Doutor em Educação Física

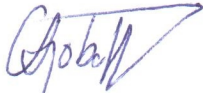
Banca examinadora:

Claudio Alexandre Gobatto [Orientador]
Eduardo Rochete Ropelle
Marco Túlio de Mello
Gustavo Gomes de Araújo
Taisa Belli


Data de defesa: 20-02-2015

Programa de Pós-Graduação: Educação Física

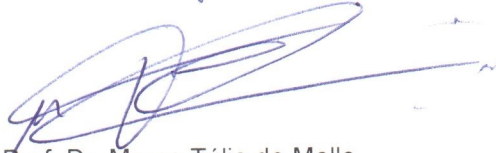
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto
Orientador



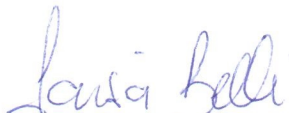
Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle
Membro Titular



Prof. Dr. Marco Túlio de Mello
Membro Titular



Prof. Dr. Gustavo Gomes de Araújo
Membro Titular



Profa. Dra. Taísa Belli
Membro Titular

RESUMO

Sintetizada principalmente na glândula pineal de mamíferos, a melatonina é uma indoleamina responsável classicamente por sincronizar o ritmo circadiano prioritariamente por meio do ciclo geofísico terrestre de luminosidade. A identificação de diversas outras propriedades a tornou alvo recente de estudos que buscam conhecer seus efeitos sobre o exercício físico. Otimizar o uso de substratos energéticos durante o esforço, inibir inflamação e lesões teciduais exacerbadas são propriedades documentadas na literatura e consideradas como potencialmente ergogênicas, fato que compreende um capítulo controverso da atual literatura científica esportiva. Diante disso, o objetivo da tese foi determinar a capacidade ergogênica da melatonina em exercício exaustivo sob intensidade de máxima capacidade aeróbia (*flim*) iniciados no nadir e acrofase da atividade espontânea (AE), identificando os efeitos dessas condições sobre a atividade da via inflamatória IKK/NF- κ B em músculo esquelético oxidativo, marcadores metabólicos, hematológicos e de lesão tecidual de ratos nadadores. Para isso, dois procedimentos foram originalmente padronizados: *i*) construção de aparato e confecção de rotina de cálculos para a determinação do ritmo circadiano da AE e *ii*) teste incremental (TI) para estimativa da intensidade de máxima capacidade aeróbia de ratos nadadores. Os animais foram mantidos sob condições ambientais adequadas e sob ciclo claro/escuro de 12 horas iniciando às 06:00h com luz clara (560nm; 60lux). A determinação da AE ao longo do dia foi utilizada para definição dos horários em que seriam iniciados todos os procedimentos, sendo nadir e acrofase desta variável correspondentes a 12:00 (ZT 6) e 20:00h (ZT 14), respectivamente. Ratos machos albinos da linhagem *Wistar* foram distribuídos aleatoriamente em grupos para aplicação do TI iniciando nestes momentos do dia, aos 90 dias de idade. Para os testes conduzidos no período noturno foi empregada luminosidade especial afim de minimizar a influência da luz na secreção fisiológica da melatonina (>600nm; <15lux). Aos 92 dias de idade os roedores receberam, via intraperitoneal, solução contendo 10 mg.kg⁻¹ de melatonina ou solução transporte de igual volume. Após 30 minutos, os animais foram submetidos ao *flim* e uma hora após o término deste esforço foram eutanasiados para coleta de amostras biológicas. Técnicas laboratoriais de *Western Blotting* e *ELISA* foram utilizadas, além de kits comerciais e técnicas bioquímicas. Melatonina aumentou significativamente a tolerância ao exercício proposto, contudo, comparações de *post hoc* apontaram diferença significativa apenas entre os animais cuja avaliação iniciou na acrofase, quando a melatonina endógena geralmente encontra-se elevada em ratos com hábitos noturnos. Maior inflamação e lesão tecidual foram encontradas principalmente nos animais que realizaram *flim* e receberam melatonina no período de vigília. Assim, concluímos que o massivo efeito ergogênico da melatonina, que promoveu maiores períodos de contração muscular continuada, sobrepôs sua capacidade de proteção ao dano tecidual e ação anti-inflamatória. O exercício proposto na presente tese se assemelha a esportes cíclicos de longa duração (como maratonas). Entretanto, inferências diretas entre modelos devem ser cautelosas uma vez que o ser humano apresenta vigília diurna combinada a reduzidas concentrações de melatonina neste momento do dia, logo, a interpretação da ação da melatonina pode ser diferente entre espécies.

Palavras-chave: Melatonina. Exercício aeróbio. Ergogenia. Fadiga. Inflamação.

ABSTRACT

Mainly produced by mammal's pineal gland, melatonin is an indoleamine classically related to circadian rhythm synchronizing, primarily through geophysical light dark cycle. Many recently identified properties of melatonin has stimulated many studies about its effect on exercised organism. Optimize the use of energy substrates during exercise, inhibit exacerbated inflammation and decrease tissue damage are well documented effects. Among others, these melatonin properties has been considered as potentially ergogenic out, what comprises a controversial issue in the current sports scientific literature. The aim of this thesis was to determine the ergogenic capacity of melatonin in exhaustive exercise at maximal aerobic capacity intensity ($\dot{V}O_{2max}$) at nadir and acrophase of spontaneous physical activity (SPA), identifying the effects of such condition on the oxidative skeletal muscle IKK/NF- κ B activity, metabolic, hematologic and tissue damage in swimming rats. Thus, two procedures were originally standardized: *i*) apparatus manufacture and mathematical calculations routine for determining the circadian rhythm of SPA in rats, and *ii*) the incremental test (IT) for estimative of the intensity corresponding to the maximal aerobic capacity of swimming rats. Animals were kept at light/dark cycle of 12 hours with bright lights on at 06:00h (560nm; 60lux). SPA were recorded throughout day, being nadir and acrophase of such variable corresponding to 12:00 (ZT 6) and 20:00h (ZT 14), respectively. Male Wistar albino rats were randomly splitted to incremental test (IT) performing, which begun at specific time of day (SPA nadir or acrophase) at 90 days-old. To acrophase swimming testing were employed special illumination to avoid influences of light on physiological melatonin secretion (>600nm; <15lux). At 92 days-old a solution with or with no exogenous melatonin (10 mg.kg⁻¹, I.P.) were administered to rats that were or not submitted to $\dot{V}O_{2max}$ 30 minutes after. Euthanasia was conducted one hour after $\dot{V}O_{2max}$ to biological material withdraw. Laboratory techniques of *Western Blotting* and *ELISA* were employed, and commercial kits and biochemical techniques. Melatonin significantly increases the tolerance to the proposed exercise, however, *post hoc* assumptions showed significant differences only between animals that assessments begun at SPA acrophase, when endogenous melatonin is usually higher in nocturnal rats. Significantly higher inflammatory and tissue damage markers were found to exercised animals assessed at wakefulness period (higher SA) that received exogenous melatonin, where were also found higher $\dot{V}O_{2max}$. Thus, the massive ergogenic effect of melatonin leads to higher periods of muscle contraction, which superimposed melatonin protective effect on the tissue damage and its anti-inflammatory action. The proposed exercise resembles cyclic long duration sports, as marathons. However, direct inferences between models should be carefully conducted once the Human Being presents wakefulness period during daily hours, when melatonin is found at lower concentrations, so, the interpretation of melatonin action may differ between species.

Keywords: Melatonin. Aerobic exercise. Ergogenic. Fatigue. Inflammation.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1. OBJETIVO GERAL	6
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3. HIPÓTESES	7
4. CAPÍTULO 1	8
4.1. Histórico e visão geral da cronobiologia e ritmos circadianos	8
4.1.1. Vias de ativação dos núcleos supraquiasmáticos	13
4.1.1.1. Estímulos fóticos	13
4.1.1.2. Estímulos não Fóticos	16
4.1.2. Mecanismos de controle do ritmo circadiano: dos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo à estimulação da glândula pineal	20
4.1.2.1. Estimulação da glândula pineal	20
5. CAPÍTULO 2	23
5.1. Melatonina: aspectos clássicos e atuais do hormônio da noite	23
5.1.1. História e visão geral	23

5.1.2. Biossíntese.....	25
5.1.3. Receptores melatonérgicos.....	28
5.1.4. Efeitos gerais da melatonina.....	30
5.1.5. Melatonina exógena: informações gerais.....	34
5.1.6. Melatonina e exercício.....	37
5.1.7. Catabolismo e excreção.....	41
6 – CAPÍTULO 3.....	43
6.1. Exercício físico, estresse oxidativo e resposta inflamatória: papel do fator de transcrição nuclear kb.....	43
7. CAPÍTULO 4.....	62
7.1. Validity and reliability of incremental test to estimates maximum aerobic capacity in swimming rats.....	62
8. CAPÍTULO 5.....	76
8.1. Melatonin as an ergogenic aid for exhaustive aerobic exercise during periods of lower and higher daily spontaneous physical activity in rats.....	76
9. CAPÍTULO 6.....	97
9.1. Melatonin acts as ergogenic but do not prevents muscle inflammation and damage from swimming exhaustive exercise at maximal aerobic capacity in rats.....	97
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
11. REFERÊNCIAS.....	126
12. ANEXOS.....	146
12.1. Certificado da Comissão de Ético no Uso de Animais.....	146

DEDICATÓRIA

À toda minha família, pelo apoio,
compreensão e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Claudio Alexandre Gobatto pela confiança, exemplo, amizade e pela oportunidade de realização dos cursos de mestrado e doutorado no Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte (LAFAE) sob sua valorosa orientação. Inestimável gratidão estará sempre presente, assim como os princípios e valores diariamente observados e executados na condução das diversas atividades impostas pela carreira acadêmica as quais tive a oportunidade de acompanhar ao longo destes 6 anos.

Ao Professor Doutor Alessandro Moura Zagatto por despertar meu interesse na pesquisa científica, pela confiança dispendida e por tornar possível meu acesso ao LAFAE

Aos Professores Doutores Marco Túlio de Mello e Eduardo Rochete Ropelle pelas consideráveis observações por ocasião da comissão avaliadora no processo de qualificação desta tese.

Aos Professores Doutores componentes da comissão avaliadora do processo de defesa da tese, por se deslocar de suas cidades e disponibilizar seu tempo com o intuito promover críticas construtivas ao trabalho.

Ao Professor Doutor José Rodrigo Pauli por disponibilizar suas instalações e seu tempo, imprescindíveis para a realização de grande parte dos procedimentos analíticos sobre as amostras biológicas desta tese. Ao Professor Doutor José Diego Botezelli pelo grande apoio e orientações prestadas nas análises biomoleculares.

A todos meus professores, doutores ou não, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas do LAFAE pela convivência sempre saudável e pelo apoio prestado por ocasião das coletas de dados dos experimentos desta tese. Especial agradecimento àqueles que por

diversas noites privaram seu sono para auxiliar quando os experimentos transcorriam madrugada adentro sob luz ambiente de 600nm e 15 lux. Estes bravos companheiros não sucumbiram e mantiveram o estado de alerta mesmo sob alta atividade de sua glândula pineal..

A todos os colegas de graduação/pós-graduação, aos colegas dos diversos laboratórios os quais tive a oportunidade de frequentar na UNESP e na UNICAMP e aos colegas das repúblicas, pela valiosa troca de informações, saudável convivência e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro concedido.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Ilustração esquemática da presença de estímulos fóticos ou não fóticos e o caminho a ser percorrido até que tal excitação seja transmitida aos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo.

Figura 2. Esquemática da ativação dos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo até a consequente excitação do pinealócito. Importante ressaltar a participação do ácido aminobutírico entre o núcleo paraventricular e o gânglio da medula espinhal torácica, possível por conta da transmissão proporcionada pelos neurônios pré-ganglionares. Após a chegada do estímulo elétrico ao gânglio cervical superior, os neurônios pós-ganglionares são os responsáveis pela ativação dos receptores β -adrenérgicos e $\alpha 1$ -adrenérgicos da membrana celular do pinealócito. Tal estimulação culminará no início do processo de biossíntese da melatonina pela ativação da adenilato ciclase do pinealócito e consequente excitação da enzima triptofano-5-hidroxilase. O processo de biossíntese será apresentado adiante.

CAPÍTULO 2

Figura 1. Ilustração da biossíntese da melatonina no meio intracelular de um pinealócito a partir do triptofano proveniente de um capilar sanguíneo. Após estímulo fótico ou não fótico os núcleos hipotalâmicos supraquiasmáticos são excitados sendo transmitidos estímulos elétricos capazes de ativar receptores adrenérgicos na membrana plasmática do pinealócito. Em consequência da atividade da enzima adenilato ciclase do pinealócito, o triptofano advindo da corrente sanguínea sofre a ação de uma sequência de enzimas para finalmente produzir melatonina. Este hormônio

recém-sintetizado pode ser liberado para a corrente sanguínea ou promover ações intracelulares, respeitando sua característica parácrina, endócrina ou exócrina. TTF: triptofano; TRH: triptofano-5-hidroxilase; 5-HTTF: 5-hidroxitriptofano; 5-TFD: 5-hidroxitriptamina-descarboxilase; 5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina); AANAT: arilalquilamina-N-acetiltransferase; NAS: N-acetilserotonina; HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferase; Melatonina: n-acetil-5-metoxitriptamina.

CAPÍTULO 3

Figura 1. Ilustração esquemática da ação do exercício físico sobre a atividade do NF- κ B. As setas azuis indicam ativação. As setas tracejadas indicam a consequência da atividade da IKK. 1: o exercício físico promove a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); 2: estes por sua vez estimulam a atividade da IKK, que (3) degrada o I κ B α , tornando o NF- κ B livre para se translocar ao núcleo e aumentar a produção de IL e TNF- α , retroalimentando o ciclo de ativação da via IKK/NF- κ B.

CAPÍTULO 4

Figure 1. Illustration of lactatemia and intensity data obtained from incremental swimming test plotted with two linear regressions. This data is regard re-test of rat 4, which does not completed the stage with 6.5% of body mass.

Figure 2. Bland-Altman plot for reliability analysis of incremental test and re-test.

CAPÍTULO 5

Figure 1. Experimental design of the study. Grav: gravimetric measurement; AA: aquatic adaptation; IT: incremental test; Solution: Melatonin or vehicle; t_{lim} : exhaustive exercise at maximal aerobic capacity intensity.

Figure 2. Illustration of the apparatus and data acquisition system for measurement of spontaneous physical activity.

Figure 3. Incremental swimming test for rats. The intercept of the two regression lines extrapolated to the X axis represents the maximal aerobic capacity intensity (iMAC), which in this test corresponded to 5.05 %bm and a lactate value of 4.59 mM.

Figure 4. Spontaneous physical activity results continuously recorded during 24 hours.

Figure 5. Descriptive data of the time to exhaustion at maximal aerobic capacity intensity of groups assessed during lower (L) and higher (H) spontaneous physical activity and that received melatonin (M) or vehicle (C), expressed in means and standard deviation. * $p < 0.05$ in relation to all other groups.

CAPÍTULO 6

Figure 1. Schematic summary of study design. At 45 days-old (45d) animals were splitted in diurnal or nocturnal assessments, determining the time of day effect. At 76 days-old (76d) begun the aquatic environmental and swimming adaptation, being incremental swimming test performed

at 90 days-old (90d) at specific group's time of day. At 92 days-old (92d) *i*) animals were exposed to a placebo (PI) or melatonin (M) administration, comprising the melatonin effect and *ii*) were submitted to the exhaustive aerobic exercise (Exercised) or remained at rest (Control) to test the exercise effect. Group's acronyms are described in the text.

Figure 2. Data from experiment 1 expressed as mean \pm SEM and significant post hoc results to animals assessed at daily (DCt and DM) or night (NCt and NM) period and submitted (DM and NM) or no (DCt and NCt) to melatonin administration. Figure 2a shows pIKK β and I κ B α skeletal muscle content. Skeletal (CK-MM, left Y-axis) and cardiac (CK-MB, left Y-axis) isoforms of creatine kinase and lactate dehydrogenase (LDH, right Y-axis) data are illustrated in figure 2b. Figure 2c shows white blood cells (WBC, left Y-axis), lymphocytes (LYMP, left Y-axis) and neutrophils (NEUTR, right Y-axis) results from melatonin and time of day effects. *a*: P < 0.05 in relation to DCt for same variable.

Figure 3. Mean \pm SEM and post hoc results to animals assessed at daily (DCt and DEx) or night (NCt and NEx) period and submitted (DEx and NEx) or no (DCt and NCt) to exhaustive exercise at maximal aerobic capacity intensity. Figure 3a shows pIKK β and I κ B α skeletal muscle content. Skeletal (CK-MM, left Y-axis) and cardiac (CK-MB, left Y-axis) isoforms of creatine kinase and lactate dehydrogenase (LDH, right Y-axis) data are illustrated in figure 3b. Figure 3c illustrate the time to exhaustion at maximal aerobic capacity intensity. Figure 3d shows white blood cells (WBC, left Y-axis), lymphocytes (LYMP, left Y-axis) and neutrophils (NEUTR, right Y-axis) results from exercise and time of day effects. *a*: P < 0.05 in relation to DCt for same variable; *b*: P < 0.05 in relation to DEx for same variable; *c*: P < 0.05 in relation to NCt for same variable.

Figure 4. Mean±SEM and post hoc results to animals exposed to melatonin and assessed at daily (DM and DMEx) or night (NM and NMEx) period and submitted (DMEx and NMEx) or no (DM and NM) to exhaustive exercise at maximal aerobic capacity intensity. Figure 4a shows pIKKβ and IκBα skeletal muscle content. Skeletal (CK-MM, left Y-axis) and cardiac (CK-MB, left Y-axis) isoforms of creatine kinase and lactate dehydrogenase (LDH, right Y-axis) data are illustrated in figure 4b. Figure 4c illustrate the time to exhaustion at maximal aerobic capacity intensity. Figure 4d shows white blood cells (WBC, left Y-axis), lymphocytes (LYMP, left Y-axis) and neutrophils (NEUTR, right Y-axis) results from exercise and time of day effects. *a*: P < 0.05 in relation to DM for same variable; *b*: P < 0.05 in relation to DMEx for same variable; *c*: P < 0.05 in relation to NM for same variable.

Figure 5. Mean±SEM and post hoc results of skeletal muscle creatine kinase (CK-MM; figure 5a), lactate dehydrogenase (LDH; figure 5b), cardiac muscle creatine kinase (CK-MB; figure 5c) and time to exhaustion at maximal aerobic capacity intensity (*t*_{lim}; figure 5d) to exercised groups assessed during daily period (DEx with placebo and DMEx under melatonin effect) and night period (NEx with placebo and NMEx under melatonin effect). *a*: P < 0.05 in relation to DMEx for same variable; *b*: P < 0.05 in relation to NEx for same variable.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Apresentação dos diversos efeitos já descritos na literatura e associados à melatonina.

Tabela 2. Administração exógena de melatonina em diferentes modelos experimentais, considerando humanos e roedores.

CAPÍTULO 4

Table 1. Blood lactate concentration for 10th minute (BLC10'), 30th minute (BLC30') and difference between then (BLC10' - BLC30') during maximal lactate steady state test applied with intensities corresponding to 97, 100 and 105% of incremental test, showed in mean \pm standard deviation.

CAPÍTULO 6

Table 1. Descriptive and parametrical statistics results to total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLOB), cholesterol (CHOL), glucose (GLUC), urea, creatinine (CREAT), uric acid (UA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and total glutathione (GSH) expressed in mean \pm SEM for rats submitted to the main effects on melatonin and time of day.

Table 2. Descriptive and parametrical statistics results to total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLOB), cholesterol (CHOL), glucose (GLUC), urea, creatinine (CREAT), uric acid

(UA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and total glutathione (GSH) expressed in mean \pm SEM for rats submitted to the main effects on time of day and exercise.

Table 3. Descriptive and parametrical statistics results to total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLOB), cholesterol (CHOL), glucose (GLUC), urea, creatinine (CREAT), uric acid (UA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and total glutathione (GSH) expressed in mean \pm SEM for rats that received melatonin and were submitted to time of day and exercise effects.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'GGGRNNYYCC3 – sítio de ligação nuclear do NF- κ B

5-HT - Serotonina - 5-hidroxitriptamina

5-HTTF - 5-hidroxitriptofano

5-TFD - 5-hidroxitriptamina-descarboxilase

AANAT - Arilalilamina-N-acetiltransferase

AE - Atividade espontânea

AMP cíclico - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CD40 - Ligante leucocitário

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

c-Rel - Fator de transcrição da família NF- κ B

CYP1A2 - Citocromo P450 1A2

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DSGXXS - Resíduos de serina

EROs - Espécies reativas ao oxigênio (ERO)

HIOMT - Hidroxi-indol-O-metiltransferase

IKK - I κ B kinase (IKK α , IKK β)

IKK/NF- κ B - Complexo proteico citosólico

IL-1 R – Receptor da interleucina-1

I κ B – Inibidor de κ B (I κ B α , I κ B $\alpha\beta$, I κ B $\alpha\gamma$, I κ B $\alpha\zeta$, I κ B $\alpha\epsilon$, BCL-3, I κ Bns)

I κ B:NF- κ B - Complexo proteico citosólico

ML1 e ML2 - Classes de receptores melatonérgicos

MT1, MT2 e MT3 - Receptores melatonérgicos

N-acetil-5-metoxitriptamina - Melatonina

NaCl - Cloreto de Sódio

NADPH - Nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato

NAS - N-acetil-serotonina

NF- κ B - Fator de transcrição nuclear κ B

NF- κ B1 - p50 e seu precursor p105

NF- κ B2 - p52 e seu precursor p100

NSQ - Núcleos hipotalâmicos supraquiasmáticos

p50/c-Rel; p50/p50; RelB/p50; RelB/p52 – dímeros da família NF- κ B

p65/p65; p65/c-Rel; p65/p52; c-Rel/c-Rel; p52/c-Rel – dímeros da família NF- κ B

pIKK – IKK phosphorilated

PVC – Cloreto de polivinila

QR2 - Quinona redutase 2

RelB – Fator de transcrição da família NF- κ B

RNA - Ácido desoxirribonucléico

SCF-tipoE3 - Enzimas promotoras de ubiquitinação

TFH - Triptofano-5-hidroxilase

TNF – Fator de necrose tumoral

TNFR1 – Receptor de TNF

TTF - Triptofano

[lac]iMAC – Blood lactate concentration at maximal aerobic capacity intensity

[lac]post - Blood lactate concentration after exercise

[lac]pre - Blood lactate concentration before exercise

ALB – Albumin

AnT - Anaerobic threshold

BLC - Blood lactate concentration

CAT – Catalase

CHOL - Total cholesterol

CK - Creatine kinase

CK-MB - Cardiac muscle creatine-kinase

CK-MM - Skeletal muscle creatine-kinase

CREAT – Creatinine

dd - Dead domains

DD - Dimerization domain

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

EMSA - Electrophoretic Mobility Shift Assay

FADD - Dead domain protein

GLOB – Globulin

GLUC – Glucose

GSH - Total glutathione

iAnT – Anaerobic Threshold intensity

IL-1 - Interleukin-1

IL-6 - Interleukin-6

iMAC - Maximal aerobic capacity intensity

IRAK – Interleukin-1-receptor-associated-kinase

IT - Incremental test

JNK – c-Jun N-terminal kinase

LDH - Lactate dehydrogenase

LYMP- Lymphocytes

MAC - Maximum aerobic capacity

MLSS - Maximal lactate steady state

NEUTR - Neutrophils

NTD – N-terminal Domain

RHD - Rel Homology Domain

RIP – Receptor-interacting protein

SA - Spontaneous physical activity

SEM - Standard error of the mean

SOD - Superoxide dismutase

TAB – Anti-TAK binding protein

TADs - TransActivation Domain

TAK – Arabidopsisthylakoid membrane threonine kinases

tlim – Exhaustive exercise at maximal aerobic capacity

TLR4 –Toll-like receptor 4

TP - Total protein

TRADD – Dead domain protein

UA - Uric acid

WBC – White blood cells

ZT - Zeitgeber time

1. INTRODUÇÃO

Competições esportivas são alvo de interesse da humanidade desde séculos antes de Cristo. A criação de novos esportes e o aprimoramento de regras e materiais esportivos com o passar dos anos demonstra que tal interesse sempre prosperou. Na atualidade, o esporte representa um fenômeno social que transcende conceituações pontuais, sendo relevante em ambiente escolar, no desenvolvimento de atributos da área afetiva, âmbito social e destacadamente na economia mundial. Agências financeiras estimam que no ano de 2012 no Brasil o esporte movimentou cerca de 1,4 a 1,8% do produto interno bruto, capital suficiente para se equiparar a todas as riquezas produzidas em alguns países. Grande parte desta movimentação financeira ocorre devido à visão do esporte como entretenimento, baseada fortemente em competições onde a performance atlética é o principal interesse, seja no esporte individual ou coletivo.

Alimentando este mercado, pesquisadores do esporte buscam identificar formas de melhorar a performance a partir de experimentos laboratoriais e de campo. Uma das formas onde se possui adequado controle das intervenções de interesse é a partir de pesquisas laboratoriais sob emprego do modelo animal, cujos resultados tem auxiliado na compreensão de fenômenos e mecanismos fisiológicos concernentes ao desempenho físico.

Ratos são os animais mais utilizados na condução de experimentos científicos nas áreas médicas, biológicas e do esporte, certamente por apresentarem características genéticas e fisiológicas semelhantes ao ser humano. Prova disso é, especificamente em investigações que envolvem o exercício físico, que resultados obtidos a partir de diversos protocolos desenvolvidos para determinar ou estimar intensidades objetivas de esforço físico cíclico apresentam

características semelhantes quando humanos e ratos são comparados. Dentre estes procedimentos destacam-se os testes de máxima fase estável de lactato (Gobatto et al., 2001; Beneke e von Duvillard, 1996), de lactato mínimo (Tegtbur et al., 1993; Beck et al., 2012) e de esforço incremental (Kindermann et al., 1979; Beck et al., 2014). Estes protocolos se baseiam na concentração de lactato sanguíneo para identificar repercussões fisiológicas impostas por diferentes intensidades de exercício físico. São procedimentos que tornam possível identificar a maior intensidade de esforço na qual o lactato produzido no músculo é removido à corrente sanguínea e permanece em concentrações estáveis, indicando condições gerais adequadas para a continuidade do esforço sob utilização dos substratos energéticos majoritariamente clivados por via aeróbia. Esta tese padronizou, validou e testou a reprodutibilidade do teste incremental para ratos nadadores, cujos dados são apresentados no capítulo 4.

Rotinas envolvendo testes exaustivos sob máxima intensidade de estabilização fisiológica podem ser consideradas para determinação direta da máxima capacidade aeróbia (Bosquet et al., 2002; Fontana et al., 2009; Baron et al., 2008). Outra grande vantagem deste modelo é a possibilidade de se estudar mecanismos fisiológicos modulados com o exercício cíclico exaustivo de longa duração, quadro semelhante àquele encontrado em competições esportivas como maratonas. Além disso, o exercício físico passa a ser uma variável dependente, já que a duração do esforço não é pré-fixada, permitindo determinar a tolerância ao esforço na intensidade de capacidade aeróbia em animais de laboratório e assim testar intervenções capazes de potencializar a performance.

Apesar da semelhança do comportamento fisiológico de ratos e humanos frente ao exercício físico, os roedores apresentam algumas características distintas e relevantes, como o hábito noturno. Mesmo que nem todos os ratos apresentem hábitos noturnos (Refinetti, 2006), esta

característica é carregada pela maioria dos roedores empregados em investigações laboratoriais (Andersen et al., 2004), como os estudados nesta tese. Os hábitos noturnos conferem ao roedor uma relação particularmente diferente com o ambiente, em especial com a luminosidade, aspecto conexo à cronobiologia animal por ser considerada a principal sincronizadora dos ritmos circadianos (Moore et al., 1967). A ritmicidade circadiana é verificada por meio de monitoramentos longitudinais em parâmetros fisiológicos que apresentam variações diárias em períodos próximos de 24 horas (Ikonov et al., 1998). Assim, o termo “circadiano” deve ser restrito ao período de aproximadamente 24 horas, sendo esperada persistência da ritmicidade circadiana sob condições ambientais constantes (Rusak e Zucker, 1979). Um robusto parâmetro para a identificação da ritmicidade circadiana de animais é a atividade física espontânea, utilizada como parâmetro indicador do gasto energético e na identificação de alterações comportamentais promovidas por intervenções como dieta, exercício físico e administração de fármacos (Garland et al., 2011; Kotz et al., 2008). Nesta tese, foi originalmente desenvolvido um aparato para a determinação do nadir e acrofase, que compreendem momentos onde a atividade espontânea encontrou seus valores mínimos e máximos ao longo do dia, respectivamente. Trata-se de um sistema para determinação gravimétrica da atividade física espontânea de ratos capaz de registrar todas as alterações gravitacionais geradas pela contração muscular (Biesiadecki et al., 1999). Descrição e resultados provenientes deste aparato são apresentados no capítulo 5. Assim, tornou-se objetiva a determinação do horário de aplicação de todos os procedimentos a serem conduzidos.

A robustez da ritmicidade circadiana da atividade física espontânea ocorre devido a uma estrutura neural, os núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo (NSQ). Após extensivas investigações nos anos 1970 e 1980, ao final da década de 1990 os NSQ foram consolidados como os principais responsáveis pela ritmicidade circadiana (Solberg et al., 1999), cujo mecanismo

desde a captação da luminosidade até a ativação da glândula pineal é bem relatado. Sabe-se que a luminosidade percebida por esta estrutura neural influencia na inibição ou síntese da melatonina (n-acetil-5-metoxitriptamina), cuja secreção é aumentada na ausência de luz tanto para o ser humano quanto para o rato (apesar da característica noturna do roedor). Assim, a melatonina é sintetizada pela glândula pineal, que realiza um papel fisiológico extremamente importante no organismo sinalizando ao meio interno se é dia ou se é noite e, desta maneira, controlando o ciclo sono-vigília por determinar um padrão sincronizado de secreção diária de outras glândulas. Informações da síntese ao catabolismo da melatonina e suas funções em diferentes tecidos no organismo são exploradas no capítulo 2 desta tese. Contudo, a clássica atividade da melatonina sobre o ritmo circadiano vem sendo significativamente amplificada devido as inúmeras outras propriedades atribuídas a este hormônio, como otimizar o uso de substratos energéticos durante o exercício e inibir lesões teciduais exacerbadas.

Extrapolando as questões ora abordadas, tem sido conferido à melatonina o relevante papel de inibir a ativação exacerbada do fator nuclear transcricional kappa B (NF- κ B) (Caballero et al., 2008; Li et al., 2005). O NF- κ B é um fator de transcrição dimérico e pleiotrópico, capaz de regular pelo menos 200 genes envolvidos na função celular geral em múltiplos processos fisiológicos, sendo sua ativação diretamente relacionada com o disparo do processo inflamatório (Oeckinghaus e Ghosh, 2009; Pereira e Oakley, 2008). O capítulo 3 apresenta uma revisão de literatura sobre a via molecular do NF- κ B e sua relação com a melatonina e exercício físico. O aumento da ligação do NF- κ B a seu sítio nuclear ocorre em músculo de ratos sob estímulo do exercício físico (Hollander et al., 2001).

Relatos bem consolidados na literatura postulam que exercícios de longa duração ou alta intensidade promovem processos inflamatórios agudos, elevada produção de espécies reativas ao

oxigênio e dano tecidual. Quando se consideram os princípios básicos do treinamento desportivo postula-se que estas alterações são importantes para o processo adaptativo, já que estímulos débeis não produzem efeito positivo ao treinamento. Contudo, quando exacerbadas agudamente, estas condições tem sido atribuídas à dificuldade na manutenção da ordenada e otimizada contração muscular e conseqüente redução da função do parênquima muscular esquelético (Davis et al., 2007), o que poderia ao menos parcialmente explicar reduções na performance (Baldwin Lanier, 2003; Robson-Ansley et al., 2004; Warren et al., 2001).

Diante deste contexto, cabe ressaltar que os efeitos possivelmente ergogênicos da melatonina citados anteriormente, como otimização do uso de substratos energéticos (Mazepa et al., 2000), ação anti-inflamatória e redução de lesão tecidual causados pelo exercício físico (Maldonado et al., 2012; Alonso et al., 2006; Veneroso et al., 2009), foram em sua totalidade investigados em animais sob modelos que não conduzem os indivíduos a condições similares áquelas encontradas em competições de longa duração. Assim, esta tese visa identificar as respostas da administração exógena de melatonina sobre o exercício exaustivo em intensidade de máxima capacidade aeróbia e suas conseqüências sobre o perfil inflamatório e de lesão tecidual. Uma vez que a melatonina é diretamente associada a alterações no ritmo circadiano e o rato é um animal noturno, investigamos este cenário nos momentos de nadir e acrofase da atividade espontânea de ratos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a capacidade ergogênica da melatonina em exercício exaustivo sob intensidade de máxima capacidade aeróbia (t_{lim}) iniciados no nadir e acrofase da atividade espontânea (AE), identificando os efeitos dessas condições sobre a atividade da via IKK/NF- κ B do músculo esquelético oxidativo, marcadores metabólicos, hematológicos e lesão tecidual de ratos nadadores.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar os momentos de nadir e acrofase da atividade espontânea de ratos (AE) por meio de um sistema gravimétrico via *strain gages*;
- 2) Testar a validade e reprodutibilidade do teste incremental para exercício de natação para ratos visando estimar a intensidade correspondente à máxima capacidade aeróbia;
- 3) Determinar a capacidade ergogênica da melatonina exógena no exercício exaustivo realizado em intensidade de máxima capacidade aeróbia no nadir e na acrofase determinados por AE;
- 4) Determinar os efeitos da melatonina exógena e do no exercício exaustivo realizado em intensidade de máxima capacidade aeróbia aplicado no nadir e na acrofase da AE sobre parâmetros inflamatórios musculares e sanguíneos, marcadores metabólicos e de dano tecidual em músculo esquelético e cardíaco de ratos nadadores.

3. HIPÓTESES

- 1) A melatonina exógena deverá apresentar efeito ergogênico significativo para ratos nadadores submetidos ao modelo de exercício exaustivo proposto;
- 2) O efeito ergogênico da melatonina exógena deverá ser encontrado para os dois períodos do dia testados (nadir e acrofase da atividade física espontânea);
- 3) Ratos exercitados e sob administração exógena de melatonina apresentarão menor dano tecidual em músculos esquelético e cardíaco, além de menores valores para marcadores de inflamação tecidual e sanguínea quando comparados a ratos exercitados e não submetidos à ação do hormônio, independente do horário das avaliações.

4. CAPÍTULO 1

4.1. Histórico e visão geral da cronobiologia e ritmos circadianos

O campo de conhecimento científico conhecido como cronobiologia foi fundado por dois grandes biólogos e fisiologistas comportamentais alemães, a constar Jürgen Walther Ludwig Aschoff e Erwin Bünning, seguidos de perto pelo biólogo americano Collin Pittendrigh. O interesse desses grandes cientistas pelos ritmos biológicos que diversos organismos vivos apresentavam se tornou o estopim para um grande aprofundamento dos conhecimentos da cronobiologia. De posse de pioneiras publicações científicas no início da década de 1920, esses pesquisadores divulgaram seus primeiros achados em meados da década de 1930, os quais se caracterizavam extremamente descritivos, como não poderia ser diferente em um campo da ciência ainda muito pouco explorado e de conhecimento restrito. Dentre alguns desses importantes trabalhos desenvolvidos na década de 1920 deve-se destacar Richter (1922) como o primeiro pesquisador que ao realizar análises comportamentais de ratos, identificando ritmo na alimentação diária desses roedores quando mantidos em escuridão total. Mais tarde, observou a recorrência de eventos biológicos que se apresentavam em intervalos aproximadamente regulares, e chamou tal fenômeno de “ritmo biológico”. Anos depois, Aschoff aprimora o conceito postulando que os ritmos biológicos possuem complexidade ainda incompreendida e deveriam ser classificados por sua frequência, pelo sistema biológico envolvido, considerando o que gerou tal ritmicidade e a função que o ritmo cumpre (Aschoff, 1981).

Esse pareceu realmente ter sido o caminho percorrido pelo pesquisador. Segundo o obituário de Aschoff publicado na revista Nature (Daan e Gwinner, 1998), este pesquisador

identificou ainda no ano de 1952, que a perda de calor do seu próprio corpo possuía uma variação ao longo do dia. Idealizou que nosso organismo possui um oscilador intrínseco que responde de maneira natural em respeito a rotação terrestre, identificado pela resposta de um *zeitgeber*. Esta palavra, largamente utilizada atualmente no campo da cronobiologia, foi cunhada por Aschoff em seus estudos ainda publicados no idioma alemão e posteriormente empregada em outros idiomas. *Zeitgeber* significa literalmente “doador de tempo” e tem sido traduzido de maneira mais inteligível para a palavra “sincronizador” e absorvido conceitualmente como agente arrastador ou sincronizador dos ritmos de nosso organismo. Aschoff realizou outra importante observação, postulando que o ritmo circadiano é o produto de osciladores endógenos que respondem pelo principal *zeitgeber* que nosso planeta nos oferece: o ciclo claro escuro.

Apesar desses valiosos avanços, até o final da década de 1950 as produções científicas eram originalmente publicadas na língua alemã e dissertavam acerca da organização temporal da vida de indivíduos situados em um planeta engessado em uma rotação constante enquanto o sol permanecia no mesmo local, ou seja, planeta este fadado a existência permanente de um ciclo claro escuro que controlaria nosso ciclo de vigília e sono. Além disso, a maioria das produções apresentavam os primeiros conceitos que hoje são base de qualquer estudo que envolva cronobiologia e ritmos biológicos.

No final da década de 1960, Aschoff (1967) apresenta uma discussão envolvendo as marés, dia, noite e mobilidade sazonal que os ritmos biológicos proporcionam. Neste estudo o pesquisador demonstra pioneiramente que em algumas espécies o ritmo parece persistir mesmo quando isolados desses *zeitgebers* ambientais. Também apresenta que os ritmos influenciados pelo ciclo geofísico terrestre possuem um período ligeiramente maior que 24 horas.

O primeiro pesquisador a conceituar essa variação gerada pelo ciclo claro escuro foi Halberg (1959), que introduziu o prefixo “*circa*” para caracterizar o ritmo de um dia como circadiano. Em 1965, pesquisadores liderados por Halberg sugeriram a existência de ritmos ultradianos como aqueles que apresentam período mais curto que o circadiano, e infradianos para aqueles mais longos (Halberg ET al., 1965). Diversos pesquisadores contemporâneos reforçaram o conceito de ritmo circadiano, sendo consolidado que considerável quantidade de parâmetros fisiológicos é caracterizada por flutuações ao longo do dia que podem ser consequência de modulações causadas por fatores ambientais, tais como a luminosidade, promovendo modificações endógenas. Essa ritmicidade tem sido verificada através de monitorações longitudinais que mostram o espectro de significantes e recorrentes variações diárias em períodos próximos, no entanto distintos, de 24 horas (Ikononov ET al., 1998). Segundo estes pesquisadores o uso do termo “circadiano” reflete o contexto de que sob observação permanente do ambiente, modificações endógenas ocorrem de maneira livre no organismo no período em questão. Portanto, o termo circadiano deve ser restrito àqueles que tratam de um período de aproximadamente 24 horas e onde tal ciclo persiste em condições constantes (Rusak e Zucker, 1979). O ritmo circadiano possui enorme significância adaptativa, uma vez que este fenômeno auxilia a sincronização do organismo a flutuações periódicas do ambiente externo, informando ao meio interno sobre tais oscilações (Ruzak e Zucker, 1979).

Apesar dos diversos estudos desenvolvidos desde a descoberta da existência de ritmicidade nas atividades de mamíferos, até a década de 60 pouco foi agregado em conhecimento científico sobre os mecanismos de controle cronobiológico. Uma das principais descobertas que contribuíram para a evolução dos conhecimentos acerca da cronobiologia foi a consolidação da identificação do “relógio biológico” em mamíferos. Caminhando no sentido de apontar um local

que controlasse o ritmo circadiano, Richter (1967) reportou a eliminação de ritmos do consumo alimentar e hídrico de ratos com lesões hipotalâmicas. Certamente os autores já estavam muito próximos de identificar a estrutura responsável pelo controle do ritmo circadiano, no entanto, eles eram apenas capazes de sugerir alguma relação entre a porção ventral medial do hipotálamo e o fenômeno circadiano (Richter, 1967). Neste período, diversos estudos de alto nível científico estavam sendo desenvolvidos no sentido de aprofundar os conhecimentos na área, seja estudando enzimas envolvidas em estruturas cerebrais próximas (Moore ET al., 1967) ou as associações entre diferentes espectros luminosos e o controle da temperatura corporal (McGuire ET al., 1973), que nesta data já era reconhecida como palavra chave no estudo da ritmicidade circadiana.

Como podemos identificar nas datas dessas referências, os conhecimentos nesse campo cresceram exponencialmente a partir da década de 1970. Quando Moore e Eichler (1972) e Stephan e Zucker (1972) identificaram os núcleos hipotalâmicos supraquiasmáticos como sendo a estrutura possivelmente responsável pela oscilação circadiana em mamíferos. Assim, passamos a conhecer um tecido específico, um pequeno local do cérebro que estaria diretamente ligado aos fenômenos que ainda não entendíamos completamente. Fato é que esta estrutura já havia sido detalhadamente reportada há muitas décadas, entretanto, sua principal função ainda se tratava de uma informação desconhecida pelos pesquisadores. Os núcleos hipotalâmicos supraquiasmáticos (NSQ) correspondem a um par de núcleos com forma oval, localizados na base do terceiro ventrículo no hipotálamo anterior, ligeiramente dorsal à borda caudal do quiasma óptico (Gurdjian, 1927).

Rusak e Zucker (1979) entenderam que estando estabelecido o consenso de que o ritmo circadiano é influenciado pelo ciclo claro escuro, o grande objetivo dos neurocientistas a partir de então seria a descrição dos processos de transdução e da determinação das vias pelas quais a

informação fótica acessa os marcadores centrais. Isso gerou um aumento exponencial do interesse pelos pesquisadores, refletido pelo número de estudos publicados a partir de então.

Schwartz et al. (1983) estudaram vários tecidos de ratos, macacos e gatos, buscando gerar persistência desta ritmicidade *in vitro*. Neste estudo em particular, os autores analisaram o uso da glicose por células dos NSQ e verificaram que alguns processos bioquímicos responsáveis pela modulação da atividade circadiana do organismo são similares, mesmo em mamíferos que apresentam diferentes padrões de expressão da ritmicidade circadiana. Ralph et al. (1990) permaneceram investigando os NSQ por meio de transplantes dessas estruturas em ratos de diferentes características circadianas, o que lhes possibilitou verificar modificações nos padrões rítmicos no período pós-operatório. Com este estudo, concluíram que os NSQ possuem de fato uma posição muito alta na hierarquia do controle circadiano de mamíferos. Corroborando com estes estudos, Harrington et al. (1993) promoveram lesões em porções dos NSQ e postularam que essas pequenas estruturas são definitivamente necessárias para a expressão de ritmicidade circadiana em ratos. Solberg et al. (1999) complementam que a geração de ritmos circadianos é de responsabilidade dos NSQ, que por meio da recepção de informações de luminosidade advindas da retina controla a maioria dos ritmos periféricos biológicos do organismo. Atualmente o papel dos NSQ no controle circadiano está muito bem consolidado. Roedores possuem NSQ com aproximadamente 10^4 neurônios, sendo certamente sua maioria com capacidade intrínseca de oscilar sua atividade com uma periodicidade aproximada de 24 horas (Welsh ET al., 2010). Para acompanhamento sistemático do ritmo circadiano do organismo, diversos parâmetros tem sido utilizados, destacando-se a temperatura corporal (Tanaka et al., 1990; Ikeda et al., 2000) e a atividade espontânea (AE), cuja característica em mensuração de movimento tem sido diretamente relacionada a estudos que envolvam doenças metabólicas devido a possibilidade de estimativa de

gasto energético (Garland et al., 2011; Martin et al., 2007; Teske et al., 2012). Muitos sistemas tem sido empregados para a mensuração da AE diária de animais de laboratório, sendo o sistema de gravimetria (Biesiadecki et al., 1999) muito interessante. Trata-se da medida de variações gravitacionais geradas pela contração muscular dos animais nos momentos de solicização, busca por alimento e em quaisquer deslocamentos horizontais e verticais. Este sistema é interessante devido à precisão na captação dos dados, ao fato de o animal ser avaliado de maneira imperceptível e no mesmo ambiente onde permanece alojado (dentro das estantes ventiladas) e por permitir captação de sinal em alta frequência por tempo indeterminado.

Apesar de o ritmo circadiano da atividade espontânea, temperatura e oscilações hormonais serem influenciados pela luminosidade, se conhece diversos outros estímulos não fóticos que igualmente se constituem como importantes osciladores dos NSQ. Vejamos agora as vias de ativação dos NSQ, identificadas especialmente da década de 1980 em diante.

4.1.1. Vias de ativação dos núcleos supraquiasmáticos

Grandes avanços têm sido realizados no sentido de entender profundamente as complexas vias que relacionam os estímulos capazes de ativar os neurônios que compõe os núcleos supraquiasmáticos. A importância dessa elucidação é compreendida quando se observa o importante papel dos NSQ no controle do ritmo circadiano de inúmeras variáveis fisiológicas do nosso organismo. Assim, nesse tópico abordaremos detalhadamente os dois mecanismos pelos quais os NSQ são principalmente estimulados: fótico ou não fóticos.

4.1.1.1. Estímulos fóticos

Como já abordado anteriormente, trata-se de um conhecimento altamente consolidado que o ciclo geofísico capaz de gerar considerável luminosidade ambiental por um período do dia (ciclo claro-escuro) é o principal parâmetro que nosso relógio biológico (NSQ) utiliza para determinar a ritmicidade circadiana no organismo (Clough, 1982; Menaker, 2003; Filgueiras, 2006). Apesar de estímulos não fóticos, como a temperatura ambiente, encenar importante papel no controle do ritmo circadiano, alterações na luminosidade ambiental são certamente mais relevantes (Gander e Moore-edde, 1983). Além de Clough (1982) e Menaker (2003), Fuller et al. (2008) também disseminou a importância da luminosidade na ritmicidade circadiana por meio da revista *Science*, argumentando que na plena disponibilidade da alimentação, o ciclo claro-escuro é o mais poderoso sincronizador circadiano. Neste momento apresentaremos alguns pressupostos e componentes teóricos imprescindíveis para abordar adequadamente tal processo.

Cones e bastonetes são os fotorreceptores clássicos da retina encontrados em sua camada nuclear externa. Inicialmente acreditava-se que essas células seriam responsáveis pela captação da luminosidade que finalmente estimularia eletricamente os axônios dos NSQ. Contudo, não era encontrada qualquer alteração no ritmo circadiano quando promovida uma destruição seletiva desses fotorreceptores, enquanto que a extração do globo ocular como um todo parece ser capaz de influenciar nessa sincronização ao longo de um período próximo de 24 horas (Freedman et al., 1999). Buscando complementar os conhecimentos sobre esse fenômeno, alguns estudos analisaram a influência do ciclo claro-escuro em indivíduos cegos, indicando que mesmo com deficiência visual a luminosidade parece ter a capacidade de modificar o ritmo circadiano de hormônios como melatonina, hormônio do crescimento, cortisol, luteinizante, prolactina, testosterona, hormônios tireoideanos e função das gônadas (Ballastela et al., 1998). Além disso, Silva et al. (2005) analisaram primatas cegos e verificaram que mesmo sem possuir os

fotorreceptores clássicos os animais respondiam normalmente a estímulos de luminosidade, assim como ocorre em humanos.

A explicação para o fato de indivíduos cegos ou com bastonetes e cones seletivamente destruídos atingirem normalmente uma sincronização circadiana por meio fótico, passou a ser parcialmente alcançada com a descoberta recente de um fotopigmento presente no sistema óptico de mamíferos: a melanopsina (Berson et al., 2002; Ecker et al., 2010). Este fotopigmento encontra-se presente em células ganglionares intrinsecamente foto sensitivas (Provencio et al., 1998), distintas dos cones e bastonetes. A melanopsina corresponde a células altamente especializadas que são responsáveis pela composição de 1-2% das células ganglionares da retina, realizando a detecção e transdução de espectros luminosos específicos advindos do meio externo (*zeitgeber* luminosidade ambiente).

Atualmente se entendem diversas outras funções e mecanismos nos quais a melanopsina se encontra presente. Esse fotopigmento, que se difere morfológicamente e fisiologicamente dos fotorreceptores clássicos denominados cones e bastonetes (Schmidt et al., 2011), apresenta cinco tipos: M1 a M5, sendo que cada uma possui via de projeção específica no sentido do interior do sistema nervoso central. Importante ressaltar que a melanopsina que se projeta aos NSQ é do tipo M1 (Ecker et al., 2010).

Com base nessas informações, atualmente se conhece profundamente o mecanismo fótico para a estimulação dos NSQ. Em resumo, o olho é ligado diretamente ao sistema nervoso central por um tipo de células ganglionares que saem da retina pelo disco óptico (Purves ET al., 2010). Um feixe dessas células ganglionares constitui o nervo óptico, que é uma via direta até o quiasma óptico, estrutura esta situada na base do diencéfalo. Os axônios dessas células ganglionares atingem diversas estruturas no diencéfalo e mesencéfalo, dentre elas, os núcleos supraquiasmáticos

do hipotálamo. Essa extensão das células ganglionares até os NSQ é chamada de via retino-hipotalâmica (Purves ET al, 2010). A melanopsina é automaticamente despolarizada quando detecta espectros luminosos contendo comprimentos de onda específicos (460-480 nm). Importante notar que os axônios das células ganglionares da retina que contém o fotopigmento melanopsina se projetam no sentido dos núcleos hipotalâmicos supraquiasmáticos via trato retino-hipotalâmico no nervo ótico.

4.1.1.2. Estímulos não fóticos

Apesar da maior importância na estimulação dos NSQ atribuída ao mecanismo fótico acima descrito, o estímulo para que este fenômeno ocorra também pode ser mediado por mecanismos não fóticos (Mistlberger, 1994; Mrosovsky, 1995). Desde algumas investigações pioneiras datadas do final da década de 1970 sabe-se que humanos mesmo quando mantidos em total escuridão apresentam ritmos que variam ao longo do dia controlados principalmente pelo sono e refeições (Aschoff, 1979; Wever, 1979). Entretanto, pesquisadores apenas passaram a compreender como isso ocorria após grandes avanços foram realizados no final da década de 90 e início dos anos 2000, os quais consolidavam fortemente a presença dos sincronizadores não fóticos do ritmo circadiano em diversas espécies de animais, inclusive humanos. Mesmo considerando essas duas possibilidades de arrastamento circadiano, atualmente é conhecido que mecanismos fóticos e não fóticos possuem um complexo nível de interação (Antle et al., 2007).

Mistlberger e Skene (2005) postularam em seu artigo de revisão a existência de mecanismos não fóticos capazes de causar o arrastamento ou reinicialização do ritmo circadiano em humanos, registrando assim um modelo muito interessante que contempla diversos estímulos

não fóticos. Apesar de o sol (ou fonte luminosa) ser considerado em seu modelo, os autores apontam que este astro seria capaz de promover alterações comportamentais, que são identificadas como sincronizadores não fóticos. Tal interação corrobora com a afirmativa de Antle et al. (2007) acima apresentada. Assim, Mistlberger e Skene (2005) identificam o estímulo social como um sincronizador não fótico.

Além de o estímulo social atuar como sincronizador circadiano não fótico, existem diversos outros estudos que identificam o consumo alimentar como forte candidato a um dos principais osciladores circadianos desprovidos de estímulos luminosos. Quando ratos Wistar ou camundongos noturnos recebem alimentação uma vez por dia exatamente no meio do período diurno (horário de sono), é estimulada a resincronização da periodicidade circadiana para que a alimentação seja realizada no único horário em que existe a disponibilidade de alimento (Schibler ET al., 2003; Mistlberger, 2011). Nesses casos a atividade física, mensurada por revoluções voluntárias geradas na roda de atividade, sofre uma alteração em dependência do consumo alimentar, conforme apresentado por Mistlberger (2009; 2011).

Outros estímulos não fóticos podem ser capazes de arrastar o ritmo circadiano, como a realização de atividades novas para os animais de laboratório (Reebs e Mrosovsky, 1989), injeção de placebo ou simples manipulação em diferentes horários do dia para esses animais (Mead et al., 1992). Além disso, alterações forçadas no horário de dormir e acordar (Mistlberger et al., 1997), no horário de trabalho (Mistlberger e Skene, 2005) ou viagens transmeridionais (Forbes-Robertson et al., 2012) para humanos também são considerados *zeitgebers*. Mistlberger e Skene (2005) registram ainda a presença de estímulos sonoros, táteis, olfativos, de estresse, locomoção, ou comportamentais participando de maneira importante nesse complexo sistema de oscilação circadiana.

Apesar dos diversos estímulos não fóticos capazes de atuarem como *zeitgebers* sobre os NSQ apresentados até o momento, existe outro oscilador no qual a presente tese se apoia com grande relevância: o exercício físico. O exercício físico também é classicamente apontado como um agente não fótico capaz de gerar alterações circadianas em humanos e também em roedores noturnos (Turek, 1989; Edgar e Dement, 1991; Mistlberger, 1991; Van Reeth et al., 1994; Buxton et al., 1997; Mrosovsky, 1996; Mislberger e Skene, 2005). Os ergômetros mais utilizados para tais verificações são em roda de atividade, natação em tanques ou corrida na esteira, certamente promotores de oscilações no ritmo circadiano desses animais (Yamanaka et al., 2006), assim como ocorre em seres humanos (Buxton et al., 1997). Note-se que a roda de atividade compreende um tipo de exercício mensurável, contudo, voluntário. Por isso, compreende característica distinta daqueles em que o animal é submetido ao exercício físico forçado, como em esteiras ou natação.

Uma vez que já entendemos a grande participação dos NSQ no controle do ritmo circadiano de diversos parâmetros fisiológicos, basta a compreensão de como o exercício físico age como estimulador destes núcleos e consecutivamente influencia na ritmicidade circadiana. Os estímulos não fóticos atribuídos diretamente ao exercício físico atingem o sistema nervoso central por meio do trato genículo hipotalâmico (axônios do folheto intergeniculado do tálamo se ligam ao hipotálamo, mais precisamente aos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo) (Johnson et al., 1988) pela ação do neuropeptídeo Y, ácido gama aminobutírico, endorfina (Card and Moore, 1989; Johnson et al., 1989; Janik et al., 1995; Dudley et al., 1998; Grossman et al., 2000) ou serotonina (Dudley et al., 1998; Grossman et al., 2000). O exercício físico também possui a propriedade de aumentar o estado excitatório e a temperatura corporal, variáveis altamente relacionadas com o controle do ritmo circadiano (Yamanaka et al., 2006). Essa condição promove a transferência de estímulos aferentes aos NSQ via intergeniculado lateral do tálamo (neuropeptídeo Y ou ácido gama

aminobutírico), como visto. Entretanto, outro ramo de estimulação é conduzido aos núcleos da rafe no tronco encefálico (via serotonina) (Mrosovsky, 1996; Yamanaka et al., 2006). O processo de estimulação dos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo estão ilustrados na figura 1.

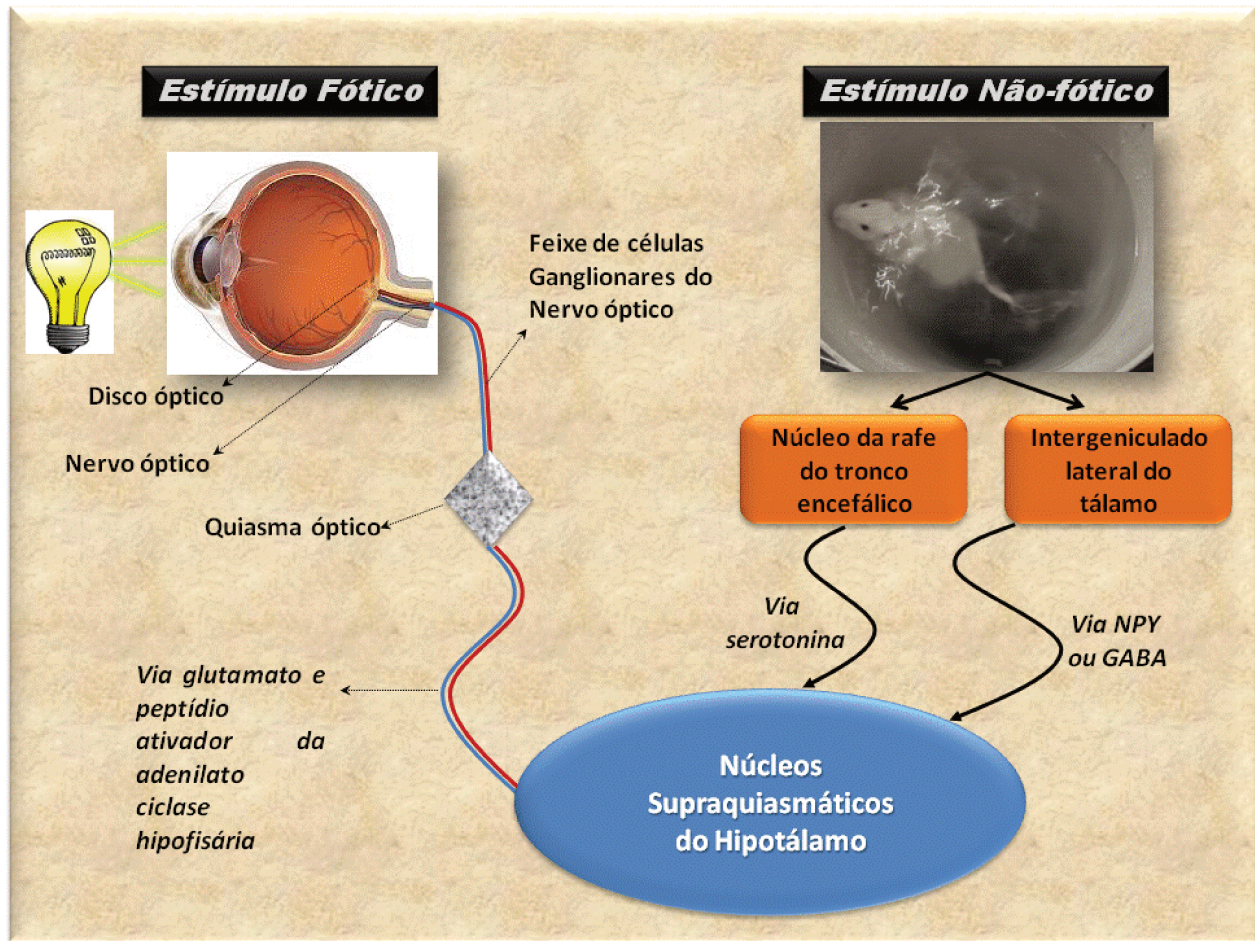


Figura 1. Ilustração esquemática da presença de estímulos fóticos ou não fóticos e o caminho a ser percorrido até que tal excitação seja transmitida aos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo.

Uma vez estimulados os neurônios dos NSQ, esta estrutura está ativada e pronta para gerar as modulações no ritmo circadiano, conferindo sua principal função.

4.1.2. Mecanismos de controle do ritmo circadiano: dos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo à estimulação da glândula pineal

Uma vez identificados os mecanismos responsáveis pela excitação elétrica dos neurônios componentes dos NSQ, o próximo passo compreende o entendimento de como sinais luminosos, ou àqueles advindos de mecanismos não fóticos, possuem a capacidade de influenciar a ritmicidade circadiana de inúmeros parâmetros fisiológicos em nosso organismo.

4.1.2.1. Estimulação da glândula pineal

Ruzak e Zucker (1979) já apontavam a possibilidade de os NSQ transmitirem informações à glândula pineal, porém, na época os autores não se arriscavam em afirmações mais concretas, deixando claro que não existiam evidências suficientes para a tomada de conclusões robustas. Com o avanço dos conhecimentos na área, atualmente possuímos informações relativamente suficientes para afirmar que com a estimulação dos NSQ existe uma transdução elétrica à glândula pineal (detalhes adiante).

Como outrora abordado, a transmissão de sinais elétricos pelos axônios advindos do trato retino-hipotalâmico pelo nervo ótico chega até os NSQ. Essa estimulação elétrica promove a liberação de neurotransmissores, como glutamato e peptídeo ativador da adenilato ciclase hipofisária, que propagam estímulos ao núcleo paraventricular hipotalâmico (Back et al., 2007; Reiter et al., 2010). Neste processo os axônios dos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo projetam para o núcleo paraventricular, o que estimula a liberação de ácido gama aminobutírico (GABA) (Reiter et al., 2010). O sinal é então transmitido dos neurônios pré-ganglionares simpáticos até a medula espinhal torácica (em uma coluna de células da zona intermediolateral),

passando pelo gânglio cervical superior. Esse estímulo se projeta no sentido da glândula pineal por meio dos neurônios pós-ganglionares.

Na ausência de luz ocorre a liberação de noradrenalina naqueles neurônios pós-ganglionares simpáticos, os quais interagem com receptores β -adrenérgicos e α_1 -adrenérgicos nas membranas dos pinealócitos, o que excita a glândula pineal e promove a possibilidade de esta estrutura exercer sua atividade principal: produção e liberação do hormônio melatonina. Tal ligação ativa a adenilato ciclase da enzima arilakilamina-N-acetiltransferase (Schomerus e Korf, 2005) e outras enzimas envolvidas na biossíntese da melatonina (Srinivasan et al., 2012), estimulando a síntese e liberação do hormônio (para maiores informações sobre a estimulação da glândula pineal, ver Jasser et al., 2006; Back et al., 2007; Brainard et al., 2008; Bear et al, 2008; Purves et al, 2010; Lent, 2010; Reiter et al., 2010; Schmidt et al., 2011).

Uma vez estimulados, os núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo exercem seu importante papel sinalizando ao meio interno quais são as condições ambientais extrínsecas ao organismo. Este processo se dá por meio da estimulação (ou inibição) da glândula pineal, que controla a secreção da melatonina (figura 2), um hormônio chave na regulação cronobiológica.

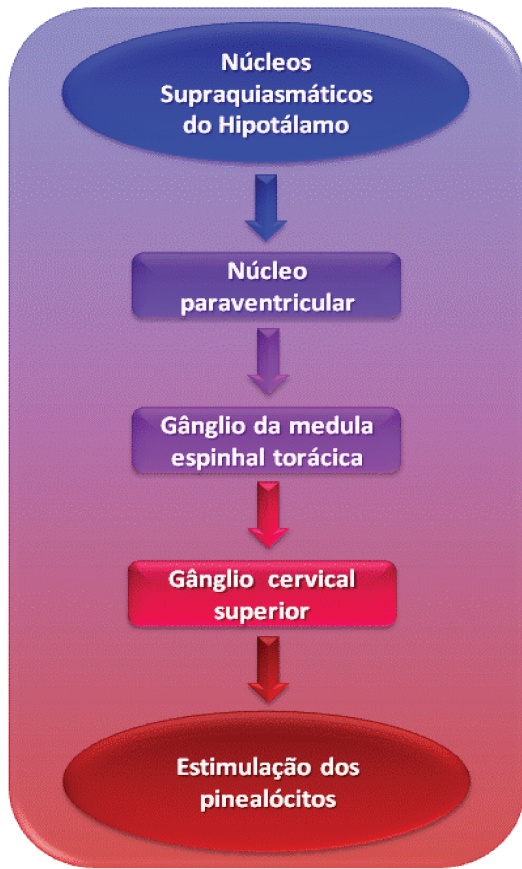


Figura 2. Esquemática da ativação dos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo até a consequente excitação do pinealócito. Importante ressaltar a participação do ácido aminobutírico entre o núcleo paraventricular e o gânglio da medula espinal torácica, possível por conta da transmissão proporcionada pelos neurônios pré-ganglionares. Após a chegada do estímulo elétrico ao gânglio cervical superior, os neurônios pós-ganglionares são os responsáveis pela ativação dos receptores β -adrenérgicos e α 1-adrenérgicos da membrana celular do pinealócito. Tal estimulação culminará no início do processo de biossíntese da melatonina pela ativação da adenilato ciclase do pinealócito e consequente excitação da enzima triptofano-5-hidroxilase. O processo de biossíntese será apresentado adiante.

5. CAPÍTULO 2

5.1. Melatonina: aspectos clássicos e atuais do hormônio da noite

5.1.1. História e visão geral

Absorvendo os conhecimentos da química orgânica, um “metoxilo”, também chamado “metoxi”, consiste em um grupo metil (um carbono e três hidrogênios) associado a uma molécula de oxigênio. No final da década de 1950 dois grupos de pesquisadores quase que simultaneamente descobriram tal composto orgânico a partir da derivação da 5-hidroxitriptamina (serotonina) em estudos na glândula pineal bovina (Lerner et al., 1958, 1959; Alberti, 1958). Alberti (1958) foi o primeiro pesquisador a isolar esta substância, que segundo Reiter et al. (2010), recebeu o nome de melatonina por conta de duas características: 1) sua alta afinidade com a melanina (“*mela-*”) nos melanócitos de anfíbios e, 2) o fato de ser derivado da serotonina (“*-tonina*”). Não muito tempo após o isolamento do hormônio alguns pesquisadores identificaram porções da via de formação da melatonina na glândula pineal e apontavam pioneiramente que a secreção desse hormônio possuía grande relação com a luminosidade ambiental (Axelrod e Weissbach, 1960; Axelrod et al., 1965). Seguindo as importantes descobertas da época, Moore et al. (1967) identificaram que a atividade da enzima hidroxindol-O-metiltransferase se mostrava exacerbada quando os animais eram continuamente submetidos à escuridão, enquanto importante supressão era observada no momento em que a luz constante era o regime no qual os animais eram submetidos. Tais informações denotam que a luminosidade já era conhecida como predeterminante para a produção e liberação de melatonina ou sua inibição.

Desde então o interesse de cientistas cresceu consideravelmente até o ano de 1997, momento em que se constata uma visível estabilização no número de publicações científicas encontradas na base de dados da maior ferramenta de busca do gênero, o *PubMed*. Entre 1997 e 2011, esta valiosa base de dados aponta números em torno de 430 e 500 trabalhos por ano. Porém, o ano de 2012 desrespeita essa relativa estabilização quando apresenta um número de publicações consideravelmente maior: 561 artigos científicos publicados (que contenham a palavra “melatonina” em seus respectivos títulos, apenas). Quando completamente considerada a palavra melatonina (não apenas no título) esses números aumentam significativamente, apresentando 863 trabalhos publicados no ano de 2012, 933 em 2013 e mais de mil trabalhos em 2014. Isso denota as importantes recentes descobertas sobre as propriedades da melatonina, detalhadamente discutidas adiante.

Análise realizada na revisão de Reiter et al. (2010) aponta alguns aspectos que discriminam a glândula pineal das demais, entre eles: *i*) a atividade secretória é regulada exclusivamente via neural e não por influência de outros hormônios ou órgãos; *ii*) a glândula pineal não armazena quantidades residuais de melatonina; *iii*) a melatonina possui ações mediadas por receptores específicos e independentes, tornando a maioria das células um alvo em potencial, enquanto a maioria dos hormônios possuem receptores específicos em determinado grupo de células. Além disso, a presença da melatonina nos fluídos corporais não se dá apenas no sangue, mas também no fluído da câmara anterior do olho (Yu et al., 1990), fluído cerebrospinal (Skinner e Malpoux, 1999) na bile (Tan et al., 1999), além do fluído folicular ovariano (Nakamura et al., 2003). Certamente essa capacidade de estar presente em diversos tecidos e fluídos corporais é associada a sua característica lipofílica (Roberts e Wishart, 1998) e hidrofílica (Shida ET al., 1994), vencendo facilmente as barreiras fisiológicas e atuando em diversos locais no organismo. Atualmente se sabe

que a melatonina é secretada primariamente no período noturno, quando os níveis séricos atingem pelo menos 10 vezes maiores que no período diurno (Touitou, 2001).

5.1.2. Biossíntese

A N-acetil-5-metoxitriptamina, comumente conhecida como melatonina, possui particularidades circadianas indiscutíveis e altamente destacadas, tendo sua síntese principalmente na glândula pineal para os animais vertebrados (Brzezinski, 1997). Apesar de existirem relatos de que Herophilus identificou esta glândula cerca de três séculos depois de Cristo, esta estrutura fotoneuroendócrina passou a ser anatomicamente e biologicamente investigada com grande relevância a partir da década de 1940 e apenas possuiu sua relação com luminosidade evidenciada após a descoberta da melatonina (Axelrod e Weissbach, 1960; Axelrod et al., 1965). Apesar dessa grande relação com a luminosidade ter sido descoberta há muitos anos, mais recentemente foi identificado que o estímulo inicial para que a melatonina seja produzida e liberada da glândula pineal também pode ser não fótico, como explorado anteriormente (ativação dos NSQ e consequentemente da glândula pineal via não fótica).

Em termos anatômicos a glândula pineal se situa acima do mesencéfalo, na porção superior e posterior ao diencéfalo, mais precisamente no epítalamo (“epi” denota “sobre”, portanto, sobre o tálamo) (Filgueiras, 2006; Lent, 2010). Apesar da maior parte da melatonina ser produzida por esta estrutura glandular, ela pode ser sintetizada em menores quantidades por células enterocromafins da mucosa do intestino (tipo de célula com característica endócrina que reveste o lúmen do trato digestivo, presente no epitélio), órgão linfoide e fotorreceptor da retina (Reiter,

2003). Outros locais onde a melatonina pode ser sintetizada em pequenas quantidades é nos leucócitos, pele, sistema imune e ovário (Aygün et al., 2012).

Como qualquer hormônio produzido pelo organismo, a melatonina também depende de um elemento precursor e todo um processo para a finalização de sua biossíntese. Nesse caso, tal substância necessária para a iniciação da biossíntese trata-se de um neurotransmissor aminérgico conhecido como triptofano (TTF). O sangue é a fonte de triptofano para o cérebro, enquanto que a dieta é a fonte do triptofano circulante (grãos, laticínios, carne) (Bear et al., 2008). A partir desta estrutura é formado o 5-hidroxitriptofano (5-HTTF) pela ação da enzima triptofano-5-hidroxilase (TFH). Transcorrido esse processo, a serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) é formada como produto final da atividade da enzima 5-hidroxitriptamina-descarboxilase (5-TFD), sendo sequencialmente acetilada pela arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT) em N-acetilserotonina (NAS) a qual é finalmente metilada pela hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT). Esse último processamento biológico resulta na biossíntese da melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Srinivasan et al., 2012). Todo o processo de síntese da melatonina encontra-se ilustrado pela figura 1.

Considerando os elementos precursores da melatonina alguns autores apontam que a síntese de serotonina poderia ser limitada pela disponibilidade de triptofano no fluido extracelular no entorno neuronal (Lent, 2010). Apesar disso, são reportadas quantidades excepcionalmente altas de serotonina na glândula pineal (Quay, 1963). Além disso, outro importante aponta que baixos níveis desse precursor jamais limitariam a síntese de melatonina (Reiter et al., 2010). De fato, quantidade de serotonina na glândula pineal é determinada pela atividade da enzima triptofano-5-hidroxilase, sendo que sua expressão varia conforme o ciclo claro-escuro (Sugden,

2003). Diante deste contexto, Reiter et al. (2010) apontam que a determinação da concentração circulante de melatonina reflete a atividade metabólica da glândula pineal para o período analisado.

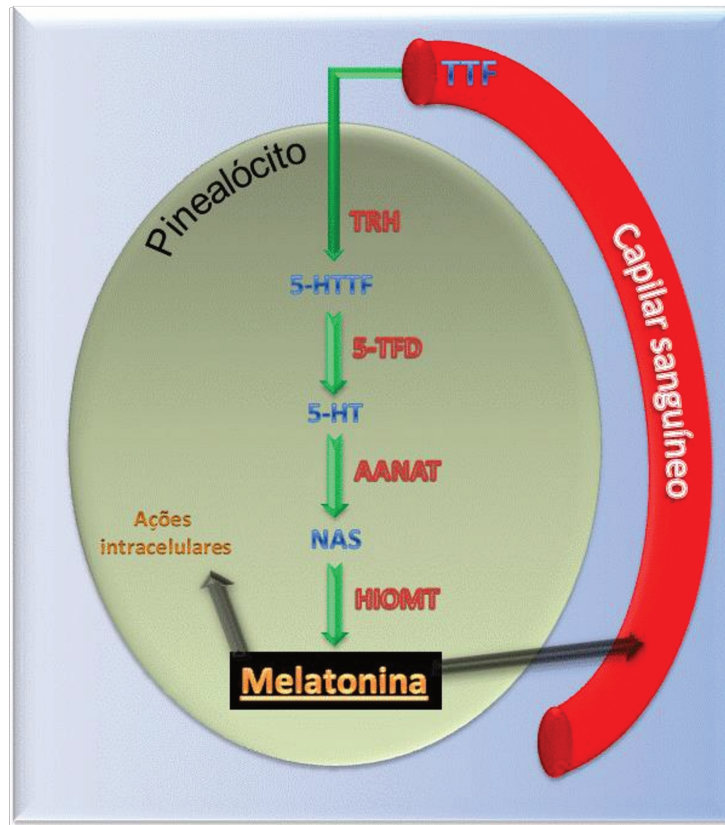


Figura 1. Ilustração da biossíntese da melatonina no meio intracelular de um pinealócito a partir do triptofano proveniente de um capilar sanguíneo. Após estímulo fótico ou não fótico os núcleos hipotalâmicos supraquiasmáticos são excitados sendo transmitidos estímulos elétricos capazes de ativar receptores adrenérgicos na membrana plasmática do pinealócito. Em consequência da atividade da enzima adenilato ciclase do pinealótico, o triptofano advindo da corrente sanguínea sofre a ação de uma sequência de enzimas para finalmente produzir melatonina. Este hormônio recém-sintetizado pode ser liberado para a corrente sanguínea ou promover ações intracelulares, respeitando sua característica parácrina, endócrina ou exócrina. TTF: triptofano; TRH: triptofano-5-hidroxilase; 5-HTTF: 5-hidroxitriptofano; 5-TFD: 5-hidroxitriptamina-descarboxilase; 5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina); AANAT: arilakilamina-N-acetiltransferase; NAS: N-acetil-serotonina; HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferase; Melatonina: n-acetil-5-metoxitriptamina.

Finalmente, é importante relatar que a exposição à luminosidade suficiente durante o período noturno (ou durante o ciclo escuro para animais mantidos em inversão de ciclo luminoso) suprime a produção e consequente liberação de melatonina para a corrente sanguínea, uma vez que tal procedimento gera a degradação da enzima arilalkilamina-N-acetiltransferase (Klein, 2007). Outra informação pertinente é que pesquisas têm consolidado que cones e bastonetes realmente possuem pequena parcela na inibição da produção de melatonina induzida pela luz (Reiter et al., 2010).

5.1.3. Receptores melatonérgicos

Após entendermos todo o processo de biossíntese da melatonina, os estímulos fóticos e não fóticos para sua produção e liberação, passemos agora a abordar os mecanismos de ação deste hormônio.

A melatonina é liberada para o sistema vascular, além de possivelmente no fluído cerebrospinal do terceiro ventrículo, possuindo direto acesso aos neurônios dos núcleos supraquiasmático do hipotálamo (Reiter et al., 2010). Uma vez liberada, a melatonina pode se acoplar a duas distintas classes de sítios de ligação conhecidas como ML1 e ML2, apesar de pontes de ligação da melatonina com receptores nucleares também terem sido demonstrados em tecido hepático de ratos (Acuña-Castroviejo et al., 1994). Da classe ML1 derivam os receptores melatonérgicos 1 e 2 (MT1 e MT2, respectivamente) (von Gall et al., 2002) e da classe ML2 deriva o MT3. Esses receptores têm sido identificados em uma grande variedade de tecidos com diferentes perfis de expressão (Tardito et al., 2012).

Este neuromônio exerce a maioria de seus múltiplos papéis por meio de dois domínios distintos que perpassam sete vezes a membrana plasmática celular, são acoplados a proteína G, possuem alta afinidade à melatonina (Lanfumej et al., 2013) e fazem parte da classe ML1: trata-se do MT1 e MT2. Comprovando sua ligação com a proteína G, alguns autores mostraram um decaimento na atividade da adenilil ciclase via proteína G durante a ativação de MT1 e MT2 quando administrado concentrações picomolares de melatonina (entre 1 e 10 pM) (Carlson et al., 1989; Reppert, 1997). O sinal de transdução dos dois receptores ocorre via proteína G mediada pela inibição da adenilil ciclase, no entanto, após essa fase cada receptor apresenta certa distinção. O MT1 ativa a fosfolipase C, enquanto o MT2 inibe a via do ciclase guanilato solúvel (von Gall et al., 2002).

A segunda classe, ML2, é composta por um sítio de ligação de baixa afinidade à melatonina e N-acetilserotonina e com perfil farmacológico distinto, chamado de MT3 (Lanfumej et al., 2013). Segundo Lanfumej et al. (2013) o MT3 foi inicialmente encontrado no cérebro, testículos e rins (Paul et al., 1999), sendo posteriormente identificada como uma quinona redutase 2 (QR2) (Nosjean et al., 2000) que possui funções enzimáticas de oxido redução. Este receptor é o que possui menor afinidade à melatonina quando comparados com MT1 ou MT2 (Lanfumej et al., 2013).

O MT1 e MT2 são verdadeiros receptores acoplados a proteína G que possuem entre 350 e 364 aminoácidos tanto para humanos quanto para roedores (Lanfumej et al., 2013). Conhece-se diferentes propriedades farmacológicas para cada receptor, sendo o MT2 o receptor melatonérgico com maior afinidade a melatonina em si (Zawilska e Nowak, 1999).

O RNA mensageiro do MT1 é expresso em estruturas do sistema nervoso central, incluindo os núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo, cerebelo, hipocampo e córtex cerebral (Bittman e

Weaver, 1990; Mazzucchelli et al., 1996), enquanto o MT2 é distribuído principalmente na retina e hipocampo em altas densidades (Dubocovich et al., 1997). Ainda, segundo Tardito et al. (2012), MT1 e MT2 são expressos na região pré-frontal, córtex frontal, gânglios basais e área tegmental ventral, dentre outras estruturas do sistema nervoso. Enquanto isso, o MT3 é encontrado em maiores concentrações no fígado e rins, com menores participações no cérebro, coração e tecido adiposo, com ainda menores concentrações no músculo esquelético e pulmões (Nosjean et al., 2001).

A melatonina conhecidamente possui ritmicidade circadiana, logo, não poderia ser diferente com a expressão gênica de seus receptores. Os níveis de RNA mensageiro do MT1 geralmente encontram-se elevados conforme existe aumento do AMP cíclico (Lanfumej et al., 2013). Esses dados são comprovados em estudos que utilizaram o modelo animal que identificaram o pico da expressão gênica dos receptores melatonérgicos no meio do período noturno (Masana et al., 2000; Von Gall et al., 2002).

Em resumo, a melatonina exerce seus efeitos atuando sobre três proteínas específicas (MT1, MT2 e MT3) nos tecidos que expressam sítios de ligação para este hormônio tanto no sistema nervoso central quanto periférico (Boutin et al., 2005).

5.1.4. Efeitos gerais da melatonina

Para que este hormônio seja produzido e liberado para se acoplar às proteínas G de seus receptores celulares, vimos que é necessário o controle direto dos NSQ, modulados pelo ciclo geofísico da luminosidade ambiental (principalmente). Uma vez ocorrida a liberação da melatonina, seus efeitos são iniciados com a ligação a receptores de membrana acoplados à

proteína G, denominados MT1 ou MT2. Em concentrações fisiológicas esses dois receptores são os que possuem maior afinidade, logo são mais importantes, no entanto, em concentrações não fisiológicas existe a considerável participação dos receptores MT3 independentes de sítio de ligação (Boutin et al., 2005; Jockers et al., 2008; Devavry et al., 2012).

Para a consolidação dos efeitos da melatonina sobre seus alvos é imprescindível o entendimento de como ocorre o processo de transdução dos sinais após ligação com os receptores MT1, MT2 ou quando a melatonina age no sistema antioxidante pela QR2 (quinona redutase, atualmente denominada MT3 – terceiro tipo de receptor da melatonina). Esse assunto se caracteriza como relativamente recente na história da melatonina, visto que estudos de alto nível produzidos há menos de uma década não consideravam tal receptor (Witt-Enderby et al., 2003; Boutin et al., 2005). Apesar de consideráveis avanços refletirem os diversos estudos na área, Jockers et al. (2008) relatam que se conhece profundamente a capacidade de a melatonina agir sobre os NSQ e modular o ritmo circadiano deste que os autores denominam como “*clock master*” (principal relógio biológico - NSQ), no entanto, as bases moleculares ainda são muito pouco compreendidas.

De fato, até o momento não existem estudos concretos que demonstrem todo o processo de sinalização celular disparado após a ligação da melatonina com seus receptores (Devavry et al., 2012). É possível que alguns processos possuam um mapeamento concreto de toda a transdução de sinais deste neuromônio, no entanto, são inúmeros alvos. Neste estudo de Devavry e colaboradores recém citado (2012), é relatado que tal processo está sendo realizado em seu laboratório por meio da utilização do método de cultura de células e receptores de melatonina advindos de várias espécies e analisados em diferentes alvos. Finalizadas tais análises e discussões dos resultados desses experimentos, e de diversos outros que certamente vem sendo realizados em

outros laboratórios ao redor do mundo, possivelmente passaremos a compreender com maior clareza a ação da melatonina em nível molecular considerando seus diversos alvos.

Apesar deste contexto, postula-se sem titubear que a melatonina regula grande número de processos neuroendócrinos e fisiológicos. Algumas revisões de literatura já foram concebidas e publicadas, mostrando as diversas funções associadas à melatonina (Boutin et al., 2005; Jockers et al., 2008; Devavry et al., 2012). Dentre as principais, à capacidade de controlar o sono, auxiliar processos digestivos, modular o ritmo circadiano de inúmeros parâmetros fisiológicos. Além disso, possui importante participação em processos antioxidativos (Hara et al., 1996; Hara et al., 1997; Ghosh et al., 2007; Carloni et al., 2008) e antiinflamatórios (Li et al., 2005; Kireev et al., 2008; Caballero et al., 2008) e por consequência, seu envolvimento com a patologia clínica vem aumentando exponencialmente, sendo associada ao tratamento de câncer (de diversas etiologias) e utilizada na investigação de respostas imunológicas diversas. Atualmente se sabe que a melatonina é capaz de induzir a apoptose em células neoplásicas de diferentes linhas, incluindo o hepatocarcinoma celular (Carbajo-Pescador et al., 2013), atua no metabolismo energético associado à obesidade (Cipolla-Neto et al., 2014), previne disfunção mitocondrial e resistência à insulina (Teodoro et al., 2014) e apresenta efeitos positivos em importantes doenças neurológicas (Phillipson, 2014). Uma sumarização das funções associadas à melatonina pode ser visualizada na tabela 1.

Apresentadas as diversas funções da melatonina, os tópicos seguintes aprofundarão os conhecimentos sobre como vem sendo realizada a administração exógena deste hormônio e as consequências dessa condição sobre a performance em exercício físico.

Tabela 1. Apresentação dos diversos efeitos já descritos na literatura e associados à melatonina.

Modulação do ritmo circadiano;
Modulação da atividade neuronal no hipocampo de ratos;
Atividade anticonvulsiva;
Regulação do fluxo sanguíneo cerebral de ratos;
Possui fator hipotensivo;
Potencializa a vasoconstrição mediada por receptores noradrenérgicos via MT1 e media a vasodilatação via MT2 em ratos;
Inibe o rolamento leucocitário em capilares de ratos;
Inibe o infarto do miocárdio;
Previne necrose celular e disfunção renal;
Reduz o ganho de peso em ratos obesos;
Promove a secreção de bicarbonato duodenal em ratos;
Possui efeito analgésico;
Possui efeito antioxidante;
Inibe a inflamação aguda exacerbada, mediando resposta de citocinas;
Reduz impacto da indução de doença de Parkinson em ratos;
Modulações positivas do sistema energético durante o exercício físico;
Inibe a excitação exacerbada do fator transcricional kappa B;
Inibição do câncer de diversas etiologias;
Auxilia no tratamento de doenças de alteração de humor e depressão;
Apresenta respostas termorregulatórias;
Utilizada no tratamento da hipertensão e hipertrofia ventricular;
Previne disfunção mitocondrial e resistência à insulina;
Extraído de: Mazepa et al., 2000; Boutin et al., 2005; Atkinson et al., 2005; Caballero et al., 2008; Reiter et al., 2010; Aygün et al., 2012; Srinivasan et al., 2012; Forbes-Robertson et al., 2012; Lanfumey et al., 2013; Di Bella et al., 2013; Cipolla-Neto et al., 2014; Teodoro et al., 2014; Phillipson, 2014.

5.1.5. Melatonina exógena: informações gerais

Inúmeros estudos realizam a aplicação deste hormônio com a finalidade de investigar os mecanismos nos quais a melatonina participa. Para que possamos analisar os efeitos da melatonina sobre seus diversos alvos é imprescindível que seja identificado se tais fenômenos ocorrem em concentrações fisiológicas ou altas concentrações geradas pela administração exógena.

A tabela abaixo apresenta diversas soluções de transporte, concentrações da droga e vias de administração da melatonina em modelos contemplando diferentes roedores e humanos. Diante da tabela 2 se pode constatar que a administração de melatonina geralmente é conduzida após sua dissolução em etanol puro e empregando solução salina como transporte (NaCl 0,9%). A dose de aplicação da melatonina possui grande variação quando utilizada em ratos Wistar, sendo mais comumente aplicado 10 mg (diluída na menor concentração possível de etanol, geralmente 0,1 a 0,5%) por quilograma de peso corporal dos animais, por dia. Além disso, geralmente é aplicada a melatonina 30 minutos antes da intervenção (exercício, por exemplo) ou eutanásia. Diversos estudos citados nessa tabela ressaltam alguns cuidados imprescindíveis no manuseio da droga após a diluição. A mesma deve ser mantida em frasco âmbar e em freezer escuro a fim de evitar os efeitos da luminosidade sobre a estabilidade da solução.

Conhecidamente, a concentração sérica fisiológica da melatonina varia ao longo do dia, sendo sua secreção marcadamente aumentada no período noturno (Huang et al., 2013) principalmente em torno de duas horas antes do horário normal de sono (Burgess et al., 2008). Burgess et al. (2008) ainda postulam que a melatonina possui altos níveis durante todo o período noturno, iniciando o decréscimo na concentração sérica conforme se aproxima o horário normal do despertar para um novo dia. Isso explica o fato de a melatonina ser comumente utilizada para

modular o ritmo circadiano ou para induzir o sono em pessoas com quadro crônico de insônia (Breslow ET al., 2013).

Tabela 2. Administração exógena de melatonina em diferentes modelos experimentais, considerando humanos e roedores.

Animal	Quantidade	Diluição	Via de administração	Referência
Rato Wistar	10mg.kg ⁻¹	Dissolvida em etanol (5mg/0,02ml); Diluída em solução salina pré injeção até 1mg/ml.	-	Zhong et al., 2013
Rato Wistar	100mg.kg ⁻¹	Dissolvida em etanol (0,5%)	Intraperitoneal	Zurowski et al., 2012
Rato Wistar	10mg.kg ⁻¹	Dissolvida em etanol (<1%); Diluída em solução salina pré-injeção até 1mg/ml.	Intraperitoneal	Bharti et al., 2012
Rato Wistar	10mg.kg ⁻¹	Dissolvida em etanol (<1%); Diluída em solução salina.	Intraperitoneal	Tasdemir et al., 2012
Ratos Wistar	3mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹	Dissolvido em 0,1ml de etanol (10%) e diluído em solução salina.	Subcutânea	Özdemir et al., 2013
Rato Wistar	2mg.kg ⁻¹	Dissolvida em etanol (0,5%) e diluída em solução salina 0,2ml a 0,9%.	Intraperitoneal	Mazepa et al., 2000
Camundongo 3xTg-AD	10mg.kg ⁻¹	Dissolvida na menor quantidade possível de etanol; Diluída em solução salina.	Diluído na água (bebedouro)	García-Mesa et al., 2012.
Sprague-Dawley	3mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹	Dissolvido em puro etanol e diluído em 0,1ml para 0,9ml de NaCl.	Intraperitoneal	Bicer et al., 2011
Sprague-Dawley	3mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹	-	Intraperitoneal	Kaya et al., 2010
Humano	15mg administrados em 3 dias	5 cápsulas de 3 mg de melatonina	Oral	Ochoa et al., 2011
Humano	6mg	Diluído em 200 ml de água	Oral	Mero et al., 2006

A concentração sérica fisiológica de melatonina em ratos Wistar mantidos em condição de controle experimental é de aproximadamente 20 pg.ml⁻¹ (Özdemir et al., 2013). Diversos estudos analisaram o pico da concentração da melatonina após administração exógena assim como a meia vida do hormônio, sendo que a maioria aponta rápida metabolização da melatonina exógena, com meia vida entre 10 e 60 minutos em Humanos (Waldhauser et al., 1984; Maldonado et al., 2012) e ratos (Yeleswaram et al., 1997). Geralmente, doses que totalizam quantidades entre 0,3 e 10 mg de melatonina produzem efeitos de semelhante magnitude (Dollins et al., 1994; Zhdanova et al., 1995). Apesar disso, diversos estudos encontrados na literatura e apresentados nessa tese demonstram que a melatonina pode possuir uma relação dependente da dose administrada. Doses menores que 0,3 mg parece não produzir alteração da concentração sérica deste hormônio (Zhdanova et al., 1995). Não obstante, altíssimas concentrações de melatonina não parecem representar qualquer toxicidade além de não se conhecer uma dose letal para nenhum animal (Barchas et al., 1967; Maldonado et al., 2012), no entanto, sabe-se que seus receptores encontram-se totalmente saturados após administração exógena de 200 pg.ml⁻¹ (Zhdanova et al., 1995).

Importante observar que muitos estudos analisam os efeitos da melatonina exógena sobre órgãos específicos. Quando administrada sistemicamente, a melatonina pode facilmente transpor barreiras fisiológicas de vários tecidos, logo, se atribui a capacidade de ação do hormônio nos tecidos conhecendo sua concentração sérica (Reiter et al., 2010).

5.1.6. Melatonina e exercício

A partir das características da melatonina anteriormente abordadas nesta tese, indicamos algumas prerrogativas que possivelmente seriam capazes de tornar este hormônio um agente ergogênico para exercício de longa duração (endurance). Assim, esse tópico visa discutir os efeitos do exercício físico sobre a secreção de melatonina e os efeitos da administração exógena da melatonina sobre o exercício físico.

O exercício físico, conforme conhecido classicamente, possui grande interação com a estimulação adrenérgica. O que se sabe de novo é que esta estimulação dos nervos adrenérgicos pode potencialmente modular a secreção da melatonina (Escames et al., 2012), visto a participação deste hormônio na estimulação da biossíntese (ver tópico biossíntese da melatonina, deste capítulo). Isso retrata o mecanismo não fótico “exercício físico” estimulando os NSQ, conforme anteriormente discutido.

Diante disso, maior atenção será despendida nesse momento no entendimento de quais mecanismos a melatonina (exógena ou liberada a partir da estimulação não fótica gerada pelo exercício, logo, endógena) age no sentido de aperfeiçoar o desempenho atlético. Para isso, seguiremos os principais elementos relacionados por Escames et al. (2012) e publicados em recente revisão de literatura: sistema cardiovascular, efeitos no músculo esquelético e na prevenção do estresse oxidativo.

Em relação ao sistema cardiovascular, Escames e colaboradores (2012) postulam que a administração exógena de melatonina possui a propriedade de aumentar o débito cardíaco e a fração de ejeção ventricular esquerda, fatores que conhecidamente podem auxiliar de maneira positiva na continuidade do exercício físico. Enquanto o exercício físico aumenta a estimulação

simpática, a administração exógena de melatonina em humanos possui efeitos supressivos nesta estimulação, o que paradoxalmente pode ser um fator positivo para a performance. Além disso, algumas condições de exercício físico podem disparar o infarto do miocárdio em indivíduos com suscetibilidade presente, enquanto a melatonina exógena parece possuir importante papel preventivo nesses casos. Isso pode ser observado em indivíduos exercitados e submetidos a doses de melatonina que apresentaram menores concentrações de creatina quinase muscular cardíaca, marcador sérico para lesão tecidual cardíaca. Sabe-se ainda que, enquanto o exercício físico estimula o processo inflamatório (interleucinas, fatores de necrose tumoral, fatores de transcrição específicos estimuladores da inflamação aguda ou crônica) a melatonina tem propriedade inibitória. Além dos fatores cardiovasculares, Escames et al. (2012) alertam para possível relação da melatonina com receptores dos alfa motoneurônios, a qual seria capaz de promover um incremento na performance atlética.

Informação bem conhecida e já consolidada na literatura é de que a melatonina possui importante participação no metabolismo energético durante o exercício físico. Um dos primeiros estudos que investigaram o efeito ergogênico da melatonina realizado com a utilização de ratos Wistar (Mazepa et al., 2000) submeteu roedores com vigília noturna a doses de 0,5 ou 2 mg.kg⁻¹ de melatonina, 30 min antes de um exercício em esteira rolante. Este estudo apresenta pioneiramente que a melatonina não afeta significativamente a glicemia em animais mantidos em repouso, no entanto, é capaz de reduzir significativamente o decaimento de glicose sérica após o exercício, principalmente quando administrada uma dose de 2 mg.kg⁻¹. Além disso, a melatonina foi capaz de aumentar significativamente a disponibilidade de ácidos graxos livres, preservando glicogênio muscular e hepático. Houve, sobretudo, decréscimo na concentração de lactato sanguíneo em detrimento a um aumento deste metabólito no tecido hepático dos animais tratados.

Na consolidação destas informações facilmente se é conduzido ao entendimento de que a melatonina pode possuir alterações metabólicas favoráveis à prática de exercícios de longa duração, uma vez que o glicogênio muscular é o principal substrato energético para exercícios na intensidade correspondente à máxima fase estável de lactato (Beneke et al., 2000) e que o lactato sanguíneo quando produzido em excesso é capaz de induzir acidose metabólica por meio da liberação de íons hidrogênio na corrente sanguínea e inibir a atividade enzimática (como da ATPase). Apesar de o estudo de Mazepa et al. (2000) produzir dados satisfatórios e até empolgantes, a intensidade de esforço não foi individualizada aos animais, além de não ter sido realizado nenhum procedimento de determinação de intensidade relativa de esforço, tornando a interpretação dos resultados extremamente limitada. Além disso, o critério de exaustão é outro fator que merece forte crítica a este estudo, visto que os autores utilizaram o choque elétrico como meio estimulante para a continuidade do exercício, o que certamente possui importante papel na estimulação adrenérgica e poderia influenciar nos resultados. É possível que desenhos experimentais envolvendo exercícios controlados em diferentes intensidades sem utilização do choque elétrico culminem em diferentes respostas.

Em outro estudo, Kaya et al. (2010) realizaram uma investigação envolvendo ratos Sprague-Dawley submetidos a 30 minutos de exercício de natação sem intensidade de esforço relatada, administrando 3 mg.kg^{-1} de melatonina nos animais. Apesar de concluírem que os estoques de glicogênio hepático permanecem restaurados nos animais que receberam melatonina, a falta da indicação da intensidade de esforço impede qualquer análise dos efeitos do exercício sobre as variáveis. Caso os animais tenham se exercitado na natação sem imposição de sobrecarga, é possível que a flutuabilidade intrínseca a esses animais tenha conduzido a maior estresse gerado pelo ambiente aquático que a própria execução do exercício.

Mais recentemente outro estudo (Bicer et al., 2011) investigou os efeitos da melatonina no exercício encontrando dados positivos e similares aos anteriormente citados (Mazepa et al., 2000; Kaya et al., 2010). Apesar disso, o modelo de natação utilizado para ratos Sprague-Dawley consistiu em exercício de natação em pares, o que impede o correto padrão de nado dos animais, além de não identificar a intensidade de esforço a qual os roedores foram submetidos, apenas o volume de 30 minutos.

Outro efeito marcadamente positivo da administração de melatonina previamente ao exercício físico é sua capacidade de promover um balanço oxidativo no organismo. Durante o exercício físico a contração muscular promove grandes aumentos na produção de radicais livres, ou espécies reativas ao oxigênio (EROs), as quais culminarão em estresse oxidativo caso nosso sistema antioxidante não seja capaz de combatê-las. Essas substâncias reativas ao oxigênio são produzidas na mitocôndria, no retículo sarcoplasmático durante a oxidação de nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), dentre outros (para mais informações, ver Powers et al., 2010). Estudos têm demonstrado que a inibição do excesso desses radicais livres, ou seja, a diminuição do estresse oxidativo pela ação de antioxidantes, é capaz de promover menores danos ao tecido muscular esquelético e cardíaco (Hara et al., 1996; 1997).

O parênquima muscular esquelético ou cardíaco pode ser danificado por lesão celular mediada pelo exercício físico, cenário comumente observado após exercício físico extenuante ou de alta intensidade. Desta maneira, o músculo é incapaz de promover a mesma ação contrátil para a geração de força mecânica (Davis et al., 2007), o que poderia conduzir a performances prejudicadas (Baldwin Lanier, 2003; Robson-Ansley et al., 2004; Warren et al., 2001). Diante deste quadro, a prevenção do estresse oxidativo seria capaz de otimizar a performance. Interessante notar que a melatonina possui considerável capacidade antioxidante, sendo um agente de forma

direta e indireta (Reiter et al., 2004; Bonnefont-Rousselot et al., 2011), dez vezes mais potente que o alfa-tocoferol e a vitamina C na prevenção de peroxidação lipídica. Além disso, é fato que a melatonina apresenta um papel de proteção do dano muscular em ratos exercitados (Tan et al., 1993; Hara et al., 1996)

Além desses achados, Escames et al. (2012) aponta ainda estudos que tem investigado a capacidade de a melatonina atuar positivamente no sistema de termorregulação do organismo exercitado em ambientes com altas temperaturas. Diante dessas observações, percebe-se a importância de se estudar os efeitos da melatonina em seus diversos alvos quando administrada em diferentes períodos do ritmo circadiano.

A melatonina tem sido recentemente investigada em associação ao exercício físico e, como vimos, diversos efeitos são identificados conforme o horário e dose administrada. Diante das evidências, alguns países elencam a utilização desse hormônio como ilegal, como o Reino Unido, Brasil, Alemanha, Canadá, África do Sul, Áustria, Bélgica, França, dentre outros (Forbes-Robertson et al., 2012), contudo, a organização mundial anti dopagem não inclui a melatonina na lista de drogas ilícitas até o momento de publicação desta tese (2014). Nesses países o uso deve ser prescrito por um médico, visto que diversos tratamentos são baseados nessa droga, no entanto, em países como Estados Unidos da América, Tailândia e Singapura a melatonina é vendida normalmente e encontrada em diversos alimentos contendo diferentes concentrações sem quaisquer restrições.

5.1.7. Catabolismo e excreção

O processo de catabolismo e excreção da melatonina é relativamente simples perante os mecanismos anteriormente abordados. De maneira geral, a melatonina circulante é rapidamente

metabolizada quando recebida no fígado. O primeiro processo é a hidroxilação na posição 6 pelos P450 mono-oxigenases do hepatócitos. A estrutura resultante desta hidroxilação é então conjugada com o elemento sulfato, e em menores proporções ao glucoronido, sendo liberada em muito poucas quantidades de forma não conjugada. Na última fase do catabolismo da melatonina, a estrutura 6-hidroxilada é liberada das células do fígado à corrente sanguínea e finalmente excretada pela urina em forma de 6-sulfatoximelatonina (Skene et al., 2001).

Observando as ações mediadoras da melatonina como agente antioxidante, é importante ressaltar que os melatólitos produzidos nesses processos (incluindo hidroximelatonina-3-cíclica, N1-acetil-Ne-formil-5-metoxiquinuramina e N1-acetil-5-metoxiquimunamina) também são excretados pela urina (Reiter et al., 2010).

Skene et al. (2001) postularam que o CYP1A2, componente de uma família de proteínas altamente associadas a capacidade de hidroxilação, é a principal substância na metabolização da melatonina no fígado de ratos quando este hormônio encontra-se em concentrações farmacológicas.

Como metabólito do catabolismo da melatonina encontrado na urina, o 6-sulfatoximelatonina também tem sido utilizado como parâmetro para a mensuração indireta da concentração de melatonina em diversos tipos de experimentos (vide Sun et al., 1993).

6. CAPÍTULO 3

6.1. Exercício físico, estresse oxidativo e resposta inflamatória: papel do fator de transcrição nuclear κ B

Physical exercise, oxidative stress and inflammatory responses: role of nuclear factor κ B

Wladimir Rafael Beck, Claudio Alexandre Gobatto.

RESUMO

Estímulos estressantes são constantemente assimilados pelo organismo, promovendo transduções de sinais intracelulares mediadas por complexos proteicos. Tais comunicações ocorrem visando o processo de adaptação celular ao estímulo ou o combate a agentes promotores quando em caso de patologias. O exercício físico aplicado sob alta intensidade ou volume se caracteriza como um agente estressor relevante, promovendo estresse oxidativo e estimulação pró-inflamatória considerável. Estas consequências são necessárias para que nosso organismo reaja adequadamente e se prepare para novas sessões de esforço, basicamente caracterizando o treinamento físico. Neste processo inflamatório um complexo proteico tem papel fundamental: o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B). Elemento dimérico e pleiotrópico, é constituído por diferentes combinações de homodímeros, sendo altamente influenciado pelo estresse oxidativo e interleucinas, assim como o exercício físico. Nesta revisão apresentamos a via principal de transduções de sinais que envolve o NF- κ B e a relacionamos com o exercício físico, verificando que o processo inflamatório promovido pelo exercício físico parece ocorrer com relevante participação do NF- κ B, o qual se situa em um campo altamente ativo da produção científica atual

e merece constante atualização devido às complexas interações que tal fator de transcrição se envolve.

Palavras chave: NF- κ B, estresse oxidativo, inflamação, exercício físico.

ABSTRACT

Our organism constantly absorbs stressful stimuli leading to intracellular transductions mediated by proteins. Such communication aims cell adaptation or pathogens strike. The physical exercise of high intensity or volume comprises a relevant stressful agent, leading to oxidative stress and pro-inflammatory responses. This is important to adequate responses of our organism when it is preparing to future exercise sessions, basically characterizing the physical training. During such inflammatory process there is a protein complex with an important role: the nuclear factor κ B (NF- κ B). Dimeric and pleiotropic, is constituted by some homodimers combination, being highly influenced by oxidative stress and interleukins, as well as physical exercise. In this review we show the main transductions pathway involving NF- κ B, relating with exercise, observing that the paradoxical phenomena described on inflammatory process generated by exercise seems to occur under relevant participation of NF- κ B. This protein complex comprises a highly active field on scientific information and deserves constantly actualization due to its complex interactions.

Keywords: NF- κ B, oxidative stress, inflammation, physical exercise.

INTRODUÇÃO

É por meio da expressão gênica induzida por regulações que o organismo se adapta ao ambiente, a estresses térmicos, químicos, mecânicos e biológicos. O exercício físico conhecidamente é um fator gerador de estresse, demandando adaptações orgânicas. Para que tais adaptações ocorram, o organismo recorre a transduções de sinais intracelulares envolvendo complexos proteicos com a finalidade de influenciar as células a produzirem as respostas adequadas. Envolvido nesse complexo processo encontra-se o fator de transcrição kappa B (NF- κ B). Este fator nuclear compreende um elemento dimérico, pleiotrópico (um único gene controla diversas características fenotípicas), capaz de regular pelo menos 200 genes envolvidos na função celular geral em múltiplos processos fisiológicos, patológicos (Oeckinghaus et al., 2009) e inflamatórios (Pereira e Oackely, 2008) mediados por citocinas, antígeno-receptores, apoptose, caquexia e atrofia (Pahl, 1999), possuindo um papel extremamente importante na conservação de aspectos evolucionários do sistema imune (Gerondakis et al., 2013). A maior parte de todo o conhecimento sobre este complexo proteico advém de estudos que promovem manipulações de respostas imunológicas, apesar de sua considerável participação na proliferação, diferenciação e seu impacto na sobrevivência celular mediada por expressão gênica (Hayden e Ghosh, 2012). Apesar disso, sua influência sobre as adaptações demandadas ao organismo pelo exercício físico agudo e/ou crônico vem chamando a atenção de pesquisadores ao redor do mundo.

Diante desse contexto, a presente revisão visa identificar o NF- κ B, suas interações intracelulares e a relação deste complexo proteico com o exercício físico. Para tal, foi realizada busca de evidências científicas em revistas de impacto internacional por meio da base de dados *Pubmed* e *SciELO* datadas desde a descoberta desse complexo proteico a 2013.

DESENVOLVIMENTO

O fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B)

O primeiro experimento que investigou o hoje chamado NF- κ B buscava caracterizar complexos proteicos ligados a cadeias pesadas de imunoglobulinas ou potencializadores da cadeia leve do sítio de ligação nuclear κ . Quando Sen e Baltimore (1986) investigaram extratos de diferentes estágios da maturação de células B linfoides por meio de ensaios de deslocamento da mobilidade eletroforética (*Electrophoretic Mobility Shift Assay – EMSA*), verificaram que um complexo núcleoproteico formado com o sítio de ligação κ 3 foi detectado. Assim, os autores determinaram que o sítio de ligação para este complexo núcleoproteico se chamaria B (sítio de ligação B) e se referiram ao fator nuclear como NF- κ B, sendo um fator de transcrição nuclear potencializador da cadeia leve do sítio de ligação nuclear κ de células B linfoides (Sen e Baltimore, 1986). Incrivelmente, já em 1989 uma revisão de literatura foi escrita a partir de alguns estudos já publicados, mostrando a importância daquele complexo proteico recém-batizado. Neste estudo, Leonardo e Baltimore (1989) comentam que o NF- κ B havia sido detectado em todos os extratos celulares testados em mamíferos, os conduzindo a explorar a promiscuidade deste fator potencializador do sítio de ligação dos gene κ . Visto o grande interesse dos pesquisadores sobre este novo campo de pesquisa, rapidamente se identificou sua relação com o estresse oxidativo (Schreck et al., 1992), abrindo horizontes para futuras investigações.

Atualmente nos resta atestar a presença deste fator nuclear em praticamente todas as células e tecidos do organismo(Oeckinghaus et al., 2009). Sabemos que o NF- κ B medeia respostas biológicas de grande importância, incluindo respostas imunológicas inatas e

adaptativas (Gerondakis et al., 2013; Li et al., 2002), regulação do crescimento tumoral (Perkins, 2004) e desenvolvimento de doenças (Hoesel e Schmid, 2013), geralmente teciduais (Cai et al., 2004). As vias de transdução de sinais intracelulares do NF- κ B também são consideradas na etiologia da inflamação gerada pela obesidade (Baker et al., 2011), tumores malignos gerados por perpetuação e manutenção de processo inflamatório (Ben-Neriah e Karin, 2011) e diretamente envolvidas com doenças metabólicas (Baker et al., 2011).

Apesar de o NF- κ B possuir importantes propriedades na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular mediada por processos adaptativos (como hipertrofia, hiperplasia ou atrofia), este complexo proteico, quando ativado de maneira exacerbada, é fortemente associado à patologia. A forma mais estudada e conseqüentemente conhecida de ativação do NF- κ B se dá por meio de receptores do fator de necrose tumoral alfa (TNFR1, da família TNFR), sendo a via clássica ativada por meio de uma proteína que cliva (IKK) a sequestradora do NF- κ B no citosol. Assim, as conseqüências da ativação exacerbada das IKK podem ser consideráveis no organismo, visto que o exacerbado estímulo às IKK podem excitar proteínas com domínios de morte celular (*Dead domains* – dd), como por exemplo, as TRADD e FADD (Hayden e Ghosh, 2012). Além disso, proteínas como RIP, IRAK, JNK, TAB, TAK e caspases são ativadas durante a sinalização celular intermediária entre o TNFR1 (receptor celular de membrana do TNF- α) e as IKK.

A inapropriada regulação da ativação do NF- κ B tem sido diretamente associada à inflamação crônica e a patogênese de diversas doenças, como câncer de diversas etiologias, artrite, doenças renais, gastrointestinais e metabólicas. A literatura atual é praticamente conclusiva neste sentido, associando o NF- κ B ligado ao sítio nuclear como agente pró-inflamatório e a doenças crônicas. Isso porque o NF- κ B ativado promove uma retroalimentação

na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6 (esta última especificamente do tecido adiposo), que sinalizam para o aumento do processo inflamatório.

Diante desse envolvimento do NF- κ B em uma imensidão de processos biológicos, fisiológicos e patológicos, o número de estudos encontrados na literatura a partir da década de 1990 tem ultrapassado 1000 por ano, chegando ao espetacular número de mais de 5000 estudos por ano, apenas em revistas indexadas, no ano de 2010 (Hayden e Ghosh, 2012).

A família de proteínas que compreendem o complexo NF- κ B (ou Rel) pode compor diferentes combinações hetero ou homodiméricas. Essas combinações são compostas de basicamente cinco subunidades polipeptídicas, em mamíferos, para constar: NF- κ B1 (p50 e seu precursor p105); NF- κ B2 (p52 e seu precursor p100); RelA (p65); RelB e c-Rel (Ghosh et al., 1998). Até a década de 1990 se acreditava que a forma ativada do NF- κ B é um heterodímero, formado pelo p50 e p65 (Barnes e Karin, 1997), apesar de esses autores, à frente de seu tempo, até consideravam a existência de outros heterodímeros. De fato, atualmente se conhece a importante participação de pelo menos 15 heterodímeros possíveis. Hayden e Ghosh (2004), de certa forma confirmando a importância destacada por Barnes e Karin (Barnes e Karin, 1997), postularam que o heterodímero p50/p65 representa a combinação mais abundante dentre as possíveis na família Rel, sendo encontrada em praticamente todas as células já estudadas. Apesar disso, outros complexos tem sido descritos, como p65/p65, p65/c-Rel, p65/p52, c-Rel/c-Rel, p52/c-Rel, p50/c-Rel, p50/p50, RelB/p50, e RelB/p52 (Hayden e Ghosh, 2004), sendo a relevância dessas associações díméricas ainda não bem explorada até o momento (Oeckinghaus et al., 2009).

Apresentaremos agora algumas informações muito bem consolidadas na literatura atual, que podem ser encontradas em alguns artigos de revisão recentes (Hayden e Ghosh, 2012; Häcker e Karin, 2006; Huxford et al., 2011; Oeckinghaus et al., 2009; Pereira e Oakley, 2008).

Uma característica das proteínas que formam o NF- κ B é a presença de um terminal chamado RHD (*Rel Homology Domain*, um domínio homólogo à família Rel; família do NF- κ B) formado por aproximadamente 300 aminoácidos, cuja função é o contato com o DNA. Esse terminal, que dá a característica de fator nuclear, é subdividido em um terminal-N (NTD – *N-terminal Domain*; Domínio do Terminal-N), DD (*dimerization domain* – domínio de dimerização, formado por 100 aminoácidos) e polipeptídeo NLS (Huxford et al., 2011). Para que a transcrição nuclear seja realizada, é insubstituível a presença de um terminal, denominado TAD (TADs - *TransActivation Domain*, é um C-terminal), presente apenas no p65, c-Rel e RelB. Essas formações proteicas se unem aos sítios κ B nos genes exercendo efeitos positivos ou negativos na expressão gênica. Apesar de apenas essas proteínas possuírem TADs, não quer dizer que o p50 e p52 não participem de processos transcripcionais. Esses dímeros podem atuar por meio da ligação a outras proteínas da família Rel e formar heterodímeros capazes de realizar a transcrição nuclear, ou podem atuar como reguladores negativos da ativação do NF- κ B

Quando não ativado, o NF- κ B (formado por seus diversos heterodímeros) é sequestrado no citoplasma por proteínas inibitórias denominadas I κ B (I κ B α , β , γ , ζ , ϵ , BCL-3 e I κ Bns). As I κ B e proteínas chamadas de precursoras p100 (NF- κ B2) e p105 (NF- κ B 1) são definidas pela presença de múltiplos domínios repetidos de anquirina, formado por 33 aminoácidos arranjados helicoidalmente (Gaudet, 2008). Pelo fato de possuírem esses domínios repetidos de anquirina, são conhecidos como inibidores clássicos do NF- κ B (Hatada et al., 1993; Mourkioti e Rosenthal, 2008). Para que o NF- κ B seja ativado, é, portanto, necessário o desligamento desta

proteína inibidora citosólica. Tal processo é realizado principalmente por duas proteínas denominadas I κ B quinases, as IKK (IKK α ou β).

Essas proteínas quinases degradam as proteínas citosólicas inibidoras do NF- κ B muito rapidamente quando devidamente estimuladas. Esses estímulos podem ser enviados na presença de um fator de necrose tumoral (TNF- α), respostas imunológicas e de estresse, bactérias, vírus e citocinas inflamatórias, por exemplo. De maneira geral, a fosforilação das I κ B pela IKK gera a ativação de enzimas promotoras de ubiquitinação (SCF-tipoE3), o que conseqüentemente promove degradação do proteossomo 26S do I κ B (Chen, 2005). Dessa forma, o I κ B é transformado em resíduos de serina (DSGXXS), tornando o complexo NF- κ B livre para se translocar ao núcleo e promover transcrição por meio de sítios de ligação conhecidos como sítios de κ B (5'GGGRNNYYCC3, sendo: N= qualquer terminal base, R=purina; Y=pirimidina) (Hayden e Ghosh, 2004).

De longe, a proteína citoplasmática inibitória do NF- κ B mais estudada é a I κ B α , que possui maior poder de inibição quando comparado ao I κ B β . Por característica, a ação de degradação do I κ B α é mais rápida, enquanto do I κ B β depende do tipo celular e do estímulo envolvido, além disso, o I κ B α possui a propriedade de adentrar ao núcleo celular e desligar o NF- κ B do DNA.

Apesar dessas relevantes informações, sabe-se que o NF- κ B pode ser encontrado em algumas células já no núcleo, constitutivamente ativo, como ocorre em células B maduras, macrófagos, neurônios, células vasculares e inúmeros tipos de tumores. Assim, o complexo proteico encontrado no citosol é I κ B:NF- κ B, uma formação não covalente e muito estável (Whiteside e Israel, 1997), e quando estudamos a via IKK/NF- κ B estamos nos referindo a

ativação do fator de transcrição κ B após liberado de seu sequestrador citosólico, o I κ B, promovendo sua translocação em direção ao núcleo e a consequente expressão gênica específica.

Portanto, o balanço entre a localização nuclear ou citoplasmática do complexo proteico NF- κ B é alterado conforme o I κ B é degradado (Birbach et al., 2002), resultando em duas vias de sinalização já bem relatadas: a via canônica e via não-canônica. A primeira é considerada como clássica, quando por reconhecimento de um ligante de membrana (TNFR – receptor do fator de necrose tumoral-1; IL-1 R – receptor da interleucina-1; TLR4 – receptor *Toll-like* 4; receptores de antígenos) dispara uma cascata de sinalizações celulares que culminam na ativação do IKK β (também conhecido como IKK2) (Gerondakis et al., 2013). Importante ressaltar a grande interação entre as IKK α , β e γ . Tal processo irá culminar na fosforilação da I κ Be gerar a possibilidade de o NF- κ B se ligar ao DNA nuclear (para informações mais completas sobre as proteínas ativadas nessa via de sinalização, ver Hayden e Ghosh (2012), figuras 3, 4 e 5). Enquanto isso a via não-canônica é conhecida como alternativa por depender exclusivamente de citocinas específicas, como o ligante CD40 leucocitário, ativando o IKK α .

Para que o organismo não seja acometido por uma ativação exacerbada do NF- κ B nuclear devido a um simples estímulo excitatório às IKK, existe um processo de regulação importante responsável pelo desligamento do fator de transcrição de seu sítio nuclear de ligação. A forma mais bem aceita na literatura é que o grande número de NF- κ B ligados ao núcleo induz a produção de I κ B, particularmente a α citosólica, que é capaz de adentrar ao núcleo e remover a ligação do NF no sítio κ B, realocando-o no citosol associado a recém-formadas I κ B α (Hayden e Ghosh, 2004).

Relação do exercício físico com a via IKK/NF-κB

Nos tópicos discutidos acima, destacamos como a presença de um estímulo reconhecido por proteínas de membrana (como TFNR1, por exemplo) desencadeia uma cascata de transdução de sinais que finalmente fosforila as IKK, degradando IκB e tornando o NF-κB livre para promover a transcrição em diversos genes, o que resulta, dentre outras, em respostas pró-inflamatórias. Classicamente, o NF-κB é estudado por essa via. Contudo, a contração muscular gerada durante o exercício físico também tem sido destacada como um elemento indutor da atividade desta via.

A relação entre a contração muscular e o incremento da atividade da via IKK/NF-κB foi demonstrada já na década de 1990, destacando a importante participação do estado redox mitocondrial causado pelo exercício físico como mediador da ativação da via de transdução de sinais pró-inflamatórios. Importante destacar que este estudo de Sen e Packer (1996) trata-se do estudo pioneiro em demonstrar que sob estresse oxidativo (aumento das espécies reativas ao oxigênio –EROs- em relação ao combate antioxidante) a via IKK/NF-κB era superativada. Portanto, sabe-se que o estado redox intracelular é capaz de modular a translocação nuclear do NF-κB e regular a transcrição gênica deste complexo proteico (Sen et al., 1997; Muñoz e Costa, 2013).

Quando se trata do exercício crônico parece que a ativação exagerada do NF-κB encontrada no exercício extenuante agudo é suprimida, possivelmente mediado por aumento dos níveis de glutathiona muscular (conhecido agente antioxidante) tornando o estado redox mais próximo da normalidade e diminuindo a ativação do NF-κB (Sen, 1999). Vemos com isso a estreita relação entre o estresse oxidativo induzido pela contração muscular durante exercício

físico e a ligação do NF- κ B ao núcleo celular. Apesar de o aumento da ligação do NF- κ B aos sítios nucleares causado pelo exercício físico estarem geralmente associados ao aumento dos EROs intracelulares, a elevação dos níveis de cálcio intracelular gerado pela contração muscular também deve ser considerada como importante promotor do aumento da atividade da via IKK/NF- κ B (Hughes et al., 1998).

Diversos estudos buscaram investigar a relação do exercício com a superativação da via após as descobertas de Sen (supracitado). Em indivíduos jovens o exercício em intensidade de 80% do consumo máximo de oxigênio durante uma hora gerou altas concentrações de TNF- α , o que os autores associaram ao motivo da também elevada ligação do NF- κ B ao núcleo de linfócitos (Vider et al., 2001). Cristi-Montero et al. (2012) verificaram que o aumento do *toll like receptor 4* (TLR-4) em ratos pode contribuir para a ativação do NF- κ B mediado pelo exercício físico com duração de uma hora a 25 metros por minuto em esteira com 10% de inclinação.

Um estudo que merece destaque quando analisamos a evolução dos conhecimentos acerca da ativação da via IKK/NF- κ B no músculo esquelético durante o exercício físico é o de Ji et al. (2004). Apesar de este grupo de autores já terem apresentado o aumento da ligação do NF- κ B em músculo de ratos exercitados (Hollander et al., 2001), o estudo de Ji et al. (2004) mostrou, dentre outros importantes achados, que o aumento da ligação do NF- κ B ao núcleo foi acompanhado de uma série de outros eventos relevantes. Dentre eles podemos relacionar o aumento da fosforilação da I κ B α seguido de sua diminuição no citosol, além do aumento do dímero p50 no conteúdo nuclear em resposta ao exercício de 25 metros por minuto em esteira com 5% de inclinação, realizado por uma hora (ou até a exaustão) em ratos Sprague-Dawley de 120 dias de idade. Apesar de não haver individualização da intensidade de esforço, estes pesquisadores postularam que tal velocidade foi correspondente a aproximadamente 75% do

consumo máximo de oxigênio dos animais avaliados. Estes autores ainda realizaram importantes investigações a respeito do tempo em que algumas proteínas levaram pra serem detectadas por consequência do exercício. Enquanto a fosfo-I κ B α aumenta imediatamente após o exercício, o pico da quantidade de ligações do NF- κ B ao núcleo se dá aproximadamente em duas horas após o esforço físico. Segundo esses autores, isso demonstra que a fosforilação do I κ B α ocorre ainda durante o esforço. Tais informações comprovam os achados de Schreck et al. (1992), onde altos níveis de I κ B α citosólico são capazes de reduzir a ligação exacerbada de NF- κ B ao núcleo de células eucarióticas (Schreck et al., 1992).

A atividade da via NF- κ B foi investigada após o exercício em esteira de diversas durações (Ho et al., 2005). Esses autores encontraram aumentos na ordem de 50% na atividade da via no músculo esquelético mesmo em exercício 60 minutos em intensidade moderada (conforme caracterização dos autores). Este estudo demonstra que a atividade da via se apresentou muito elevada uma a duas horas após o exercício, decaindo rapidamente após tal período e atingindo níveis basais em aproximadamente 5 horas. Neste experimento pode se constatar claramente que a atividade das IKK encontra-se elevada durante o exercício, permanecendo muito baixa (não significativamente diferente do repouso) uma, duas ou três horas após o esforço.

Durante este período outros estudos foram realizados com ratos para a investigação da ativação da via em questão pelo exercício físico. De fato, o exercício físico em esteira rolante para ratos Wistar (25 metros por minuto durante 60 minutos, com 10% de inclinação) promove aumento da I κ B quinase (IKK α) e conseqüente decréscimo do conteúdo de I κ B α no músculo desses animais (Alonso et al., 2006). No ano de 2007, Ji et al. apresentaram uma breve revisão de literatura, a qual permanecia apontando que o aumento das EROs induzida pelo exercício é capaz

de ativar as IKK, fosforilando as I κ B e promovendo a translocação do NF- κ B ao núcleo celular mediada pela contração muscular, de maneira completamente dependente do estado redox intracelular (Ji et al., 2007), realmente consolidando tal informação na literatura.

Em um experimento onde a indução de lesão pulmonar se caracterizou como principal foco, o exercício físico foi utilizado como tratamento crônico não farmacológico (Cunha et al., 2013). Esses autores encontraram considerável diminuição do perfil inflamatório e de estresse oxidativo em ratos Wistar que realizaram o treinamento físico e foram induzidos à lesão pulmonar quando comparado com animais controle, mostrando o efeito de proteção promovido pelo exercício físico pela diminuição do NF- κ B/p65 e do estresse oxidativo geral no tecido pulmonar.

A partir das postulações observadas na literatura atual, apresentamos abaixo um diagrama (figura 1) que analisa as interações do exercício físico com EROs, interleucinas e as proteínas envolvidas na via IKK- NF- κ B.

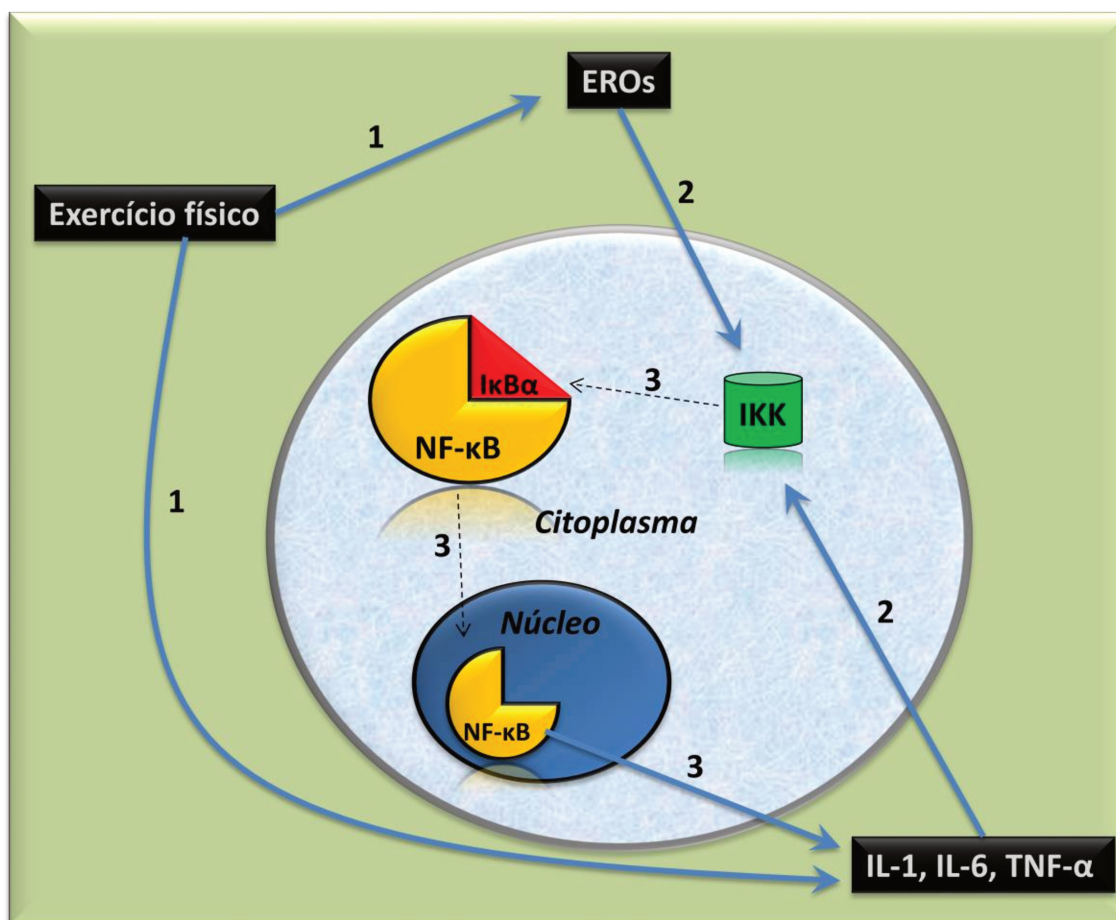


Figura 1. Ilustração esquemática da ação do exercício físico sobre a atividade do NF- κ B. As setas azuis indicam ativação. As setas tracejadas indicam a consequência da atividade da IKK. 1: o exercício físico promove a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); 2: estes por sua vez estimulam a atividade da IKK, que (3) degrada o I κ B α , tornando o NF- κ B livre para se translocar ao núcleo e aumentar a produção de IL e TNF- α , retroalimentando o ciclo de ativação da via IKK/NF- κ B.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estresse oxidativo e diversas interleucinas pró-inflamatórias são excitadores clássicos do NF- κ B, que quando superativado é fortemente associado a facilitação da atuação de patógenos. A ativação exacerbada deste complexo proteico parece ocorrer em relevantes eventos

estressantes, como em doenças ou no exercício agudo de intensidade ou duração elevada. Entretanto, em se tratando de exercício físico, o fenômeno parece ser suprimido com a exposição continuada (treinamento) devido às adaptações celulares.

Estudiosos do treinamento físico conhecem de longa data os efeitos agudos de um exercício de alta intensidade sobre os processos inflamatórios em atletas. Cabe ressaltar que a inflamação é condição *Sine qua non* para o reparo tecidual necessário após as microlesões promovidas pelo estresse mecânico do exercício de alta intensidade, entretanto, o processo inflamatório exacerbado pode ser capaz de aumentar a lesão tecidual.

Por fim, o processo inflamatório promovido pelo exercício físico parece ocorrer com importante participação do NF- κ B, o qual se situa em um campo altamente ativo da produção científica atual e merece constante atualização devido às complexas interações que tal fator de transcrição se envolve.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi produzido sob financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob processos número 2011/13226-1 e 2012/20501-1 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico sob processo número 305650/2009-2. Os autores destacam que não houve conflito de interesse na produção deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Alonso M, Collado PS, González-Gallego J. Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. *J Pineal Res.* 41:48–14, 2006.
- Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab.* 3:11–22, 2011.
- Barnes P, Karin M. Nuclear factor- κ B – a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 15:1066-1071, 1997.
- Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol.* 12:715–723, 2011.
- Birbach A, Gold P, Binder BR, Hofer E, de Martin R, Schid JA. Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem.* 277:10842–10851, 2002.
- Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr, Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, et al. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell.* 119:285–298, 2004.
- Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nat Cell Biol.* 7:758–765, 2005.
- Cristi-Montero C, Sánchez-Collado P, Veneroso C, Cuervas MJ, González-Gallego, J. Efecto del ejercicio agudo sobre la expresión del receptor tipo Toll-4 y los mecanismos inflamatorios en corazón de rata. *Rev Med Chile.* 140:1282-1288, 2012.
- Cunha MJ, Cunha AA, Ferreira GK, Baladão ME, Savio LEB, Reichel CL, et al. The effect of exercise on the oxidative stress induced by experimental lung injury. *Life Sci.* ;92:218-227, 2013.

Gaudet R. A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol Biosyst.* 4:372–379, 2008.

Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, Grumont RJ. NF- κ B control of T cell development. *Nat immunol.* 15:15-25, 2013.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 16:225–260, 1998.

Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006;357.

Hatada EN, Naumann M, Scheidereit C. Common structural constituents confer I κ B activity to NF- κ B p105 and I κ B/MAD-3. *EMBO J.* 12:2781–2788, 1993.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18:2195–2224, 2004.

Hayden NS, Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 26:203-234, 2012.

Ho RC, Hirshman MF, Li Y, Cai D, Farmer JR, Aschenbach WG, et al. Regulation of I {kappa} B kinase and NF- {kappa}B in contracting adult rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 289:C794–C801, 2005.

Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer.* 12:86-100, 2013.

Hollander J, Fiebig R, Ookawara T, Ohno H, Ji LL. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise. *Pfluegers Arch.* 442:426–434, 2001.

Hughes K, Antonsson A, Grundstrøm T. Calmodulin dependence of NF- κ B activation. *FEBS Lett.* 441:132–136, 1998.

Huxford T, Hoffmann A, Ghosh G. Understanding the logic of I κ B:NF- κ B regulation in structural terms. *Curr topics microbial.* 349:1-24, 2011.

Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Steinhafel N, Viña J. Acute exercise activates nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J.* 18:1499–1506, 2004.

Ji LL, Gomez-Cabrera M-C, Vina J. Role of nuclear factor κ B and mitogen-activated protein kinase signaling in exercise-induced antioxidant enzyme adaptation. *App Physiol Nutr Metab.* 32:930-935, 2007.

Leonardo MJ, Baltimore D. NF- κ B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell.* 58:227-229, 1989.

Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2:725–734.

Mourkioti F, Rosenthal N. NF- κ B signaling in skeletal muscle: prospects for intervention in muscle diseases. *J Mol Med (Berl).* 86:747-759, 2008.

Muñoz A, Costa M. Nutritionally mediated oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2013:610950, 2013.

Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factor and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a000034, 2009.

Pahl HL. Activators and target genes of rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 18:6853-6866, 1999.

Pereira SG, Oakley F. Nuclear factor- κ B1: regulation and function. *Int J Biochem cell boil.* 40:1524-1430, 2008.

Perkins ND. NF-kappaB: tumor promoter or suppressor. *Trends Cell Biol.* 14:64–69, 2004.

Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor κ B: an oxidative stress responsive transcriptional factor of eukaryotic cells. *Free Rad Res Commun.* 17:221–237, 1992.

Sen CK, Khanna S, Reznick AZ, Roy S, Packer L. Glutathione regulation of tumor necrosis factor- α -induced NF- κ B activation in skeletal muscle-derived L6 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 237:645–649, 1997.

Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 10:709–720, 1996.

Sen CK. Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutritional supplements. *Mol Cell Biochem.* 196:31–42, 1999.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 46:705-716, 1986.

Vider J, Laaksonen DE, Kilk A, Atalay M, Lehtmaa J, Zilmer M, et al. Physical exercise induces activation of NF- κ B in human peripheral blood lymphocytes. *Antiox Redox Signal.* 3:1131-1137, 2001.

Whiteside ST, Israël A. I κ B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol.* 8:75–82, 1997.

7. CAPÍTULO 4

7.1. VALIDITY AND RELIABILITY OF INCREMENTAL TEST TO ESTIMATES MAXIMUM AEROBIC CAPACITY IN SWIMMING RATS

Wladimir Rafael Beck, Yuri Sonsim Campesan, Claudio Alexandre Gobatto

ABSTRACT

Physical exercise leads to many molecular and biochemical consequences on overall organism, mainly depending on exercise volume and intensity. Despite existence of some procedures to identify individual outcomes for physical exercise intensity for rats, protocols are complex and unadvisable for some experimental designs. The aims of this study were to individually determine anaerobic threshold (AnT) and estimates maximal lactate steady state (MLSS, gold standard procedure) intensities employing single incremental test to swimming rats, verifying validity and reliability of such procedure. Eleven male Wistar rats were submitted twice to an incremental test with overloads corresponding to 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6 and 6.5% of body mass (%bm), respecting 48 hours of interval. AnT was determined through two slopes according to blood lactate concentration kinetics. Then, all animals performed MLSS procedure employing AnT intensity as reference. Comparing incremental test vs re-test we found significant intraclass ($r = 0.67$; $p = 0.01$) correlation, no significant difference ($p = 0.91$), coefficient of variation of 4.04% and effect size of 0.02, beyond good agreement, precision and accuracy attested by Bland-Altman plots (bias of 0.010). Furthermore, incremental test intensity was not different from MLSS intensity. According to such results, we identified maximum aerobic capacity intensity through a single incremental test, offering a high applicable, valid and reliable tool that can be useful for all experimental designs involving exercise for animal model.

Keywords: *Anaerobic threshold; exercise intensity; lactataemia; maximal lactate steady state.*

INTRODUCTION

The kinetics of blood lactate concentration (BLC) during exercise has been investigated by sports scientists since many years ago due to its direct participation in metabolic pathways. It is well documented that when the subjects perform proportional incremental loads in time, disproportional BLC increases is found generally near from 4 mmol.L⁻¹ for humans (Mader et al., 1976; Kindermann et al., 1979). The exercise intensity during this moment is the anaerobic threshold (AnT) (Kindermann et al., 1979), also called maximum aerobic capacity intensity (iMAC). The anaerobic pathway is gradually involved on substrate production when exercise is performed above such intensity, while exercising until iMAC provides BLC stabilization and elicits long-duration efforts. Based on such background, Heck et al. (1985) suggested the maximal lactate steady state (MLSS) test for determines the highest intensity (iMLSS) where BLC remains stable during prolonged constant workload or velocity (30 minutes), establishing the gold standard procedure (Gobatto et al., 2009) to determines the iMAC. If the exercise is performed using intensities above iMAC, the BLC production exceeds its removal, leading to the exercise discontinuation due to a multifactorial cellular and molecular reasons. So, estimative of iMAC have been considered a critical parameter to training prescription for performance or health purposes, as well as to the scientific required control for exercise intensity.

The BLC modulation both for humans and rats is exercise intensity and time-dependent. Such statement was confirmed during 1990s, when rat's blood lactate kinetics during incremental exercise was firstly studied to swimming exercise (Gobatto et al., 1991). Despite the BLC shows modulations of intensity-time manner, the iMAC was not precisely identified, probably due to the employed overloads. Since there was no previous knowledge about the

overloads amplitude for swimming rats testing, Gobatto et al. (1991) performed an incremental test with 4 stages and intensities corresponding to 0, 5, 8 and 12% of body mass (%bm). Nevertheless, the large increments resulted in a few stages, impairing successful iMAC determination.

Apart of this, Gobatto et al. (2001) standardized MLSS protocol for swimming rats, also finding that the MLSS test was sensible to training improvements. Nevertheless, to obtain MLSS intensity it is necessary at least four days, inciting researchers to avoid such procedure due to its poor applicability. To use a single and applicable procedure, de Araujo et al. (2007) based on human experiments (Tegtbur et al., 1993), proposed an alternative test to estimate iMAC in swimming rats. The lactate minimum test is an incremental exercise after high intensity efforts to induce hyperlactataemia. The lactate kinetics for rats submitted to such test resembles human behavior, leading these authors to postulate that lactate minimum test could be employed to estimate iMAC and MLSS intensity (de Araujo et al., 2007). However, the rat needs to attain exhaustion during high intensity efforts (13%bm) during lactate minimum test, which could be inapplicable or unfeasible to some experiments design, especially for diseased or nutritionally impaired animals.

In fact, various studies focused on MLSS or iMAC determination of swimming (Beck et al., 2012; Cunha et al., 2009; Gobatto et al., 2013; Lima et al., 2013) or treadmill (Almeida et al., 2014; Almeida et al., 2012; Manchado-Gobatto et al., 2011) exercise for rats and other animals (Gondim et al., 2007). With the advent of such procedures, a large number of studies involving exercise at iMAC were published in specialized literature (Almeida et al., 2013; Beck et al., 2014a; Beck et al., 2014b; Botezelli et al., 2010; Cambri et al., 2010; Carvalho et al., 2005; Da Silva et al., 2010; de Araujo et al., 2013b; de Araujo et al., 2013a). Nevertheless, important

methodological modification has been recently noted and the BLC kinetics during a single incremental test remains undocumented for swimming rats. Therefore, the aims of this study were to estimate MLSS test intensity employing a single incremental test in swimming rats and verify reliability and validity of such procedure.

METHODS

Animals

Eleven male Wistar rats were obtained from institutional facility and were maintained in five animals per polypropylene cage at $22\pm 1^\circ\text{C}$ and 45-55% relative air humidity. The animals were fed with standard rat chow and kept at 12/12h light/dark cycle. The experiment was conducted according current Brazilian legislation and standards of the Brazilian College of Animal Experimentation - COBEA (Law nr. 6638, May 8th, 1979 decree nr 24,645, July 10th, 1934), being approved by Ethics Committee on the Use of Animals (protocol 2502-1) and followed the European Commission Directive 86/609/EEC for animal experiments.

Aquatic environmental adaptation

All of the swimming procedures were conducted in individual tanks with 30 cm diameter and 80 cm of deep, containing clean water at $31 \pm 1^\circ\text{C}$. All the animals were exposed to a liquid environmental and thermal stress adaptation before swimming testing. These routines were conducted aiming avoid high stress levels and were employed only for this purpose, preventing training features. Then, the animals were submitted to ten sections of liquid environmental adaptation among 75 and 89 days-old, respecting the followed characteristics: four sections of 10

min in 80 cm deep of water with no overload and at uninterrupted days; two sections of 10 min in 80 cm deep with 2%bm, followed by another four sections of swimming adaptation among 0 and 4%bm and time among 20 sec and 10 min. The last swimming adaptation section was applied 24 hours before the incremental test.

Incremental test

The incremental test is usually employed in order to estimate MAC and was originally proposed for humans by Mader et al. (1976). According to these authors, iMAC is found when disproportional increase of blood lactate concentration is found in relation to proportional intensity increase. In order to apply the incremental test in rats, were used five minutes per stage and overloads of 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6 and 6.5%bm.

Blood samples were collected to BLC determination. The BLC and the intensity were graphically plotted in order to constructing two linear regressions. The intersection of these straights were interpolated to X-line to estimates iMAC), while the Y-line corresponded to the BLC of iMAC. Thus, iMAC was individually determined as illustrated at figure 1. In order to attest the reproducibility of the incremental test, the rats were submitted to incremental re-test 48 hours later.

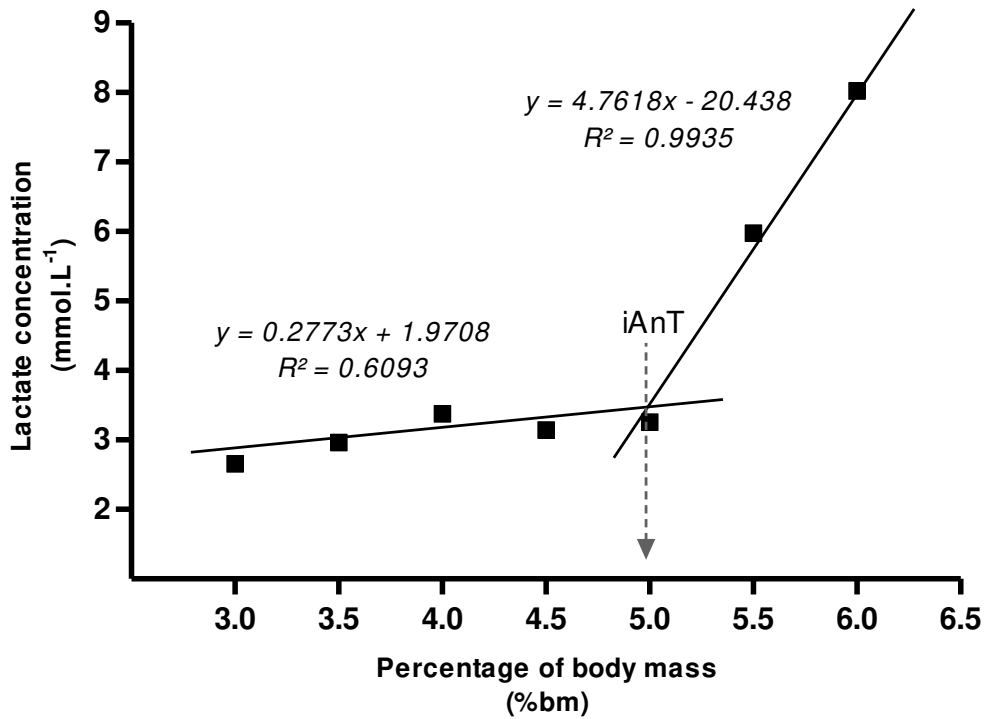


Figure 1. Illustration of lactataemia and intensity data obtained from incremental swimming test plotted with two linear regressions. This data is regard re-test of rat 4, which does not completed the stage with 6.5% of body mass.

The validity of the incremental test was evaluated through MLSS. At 94 days-old, all animals were submitted to 30-min constant intensity exercise at the iMAC determined during the re-test. Blood samples were collected in order to determine the BLC at 10th and 30th min. Respecting 24 hour of interval between those efforts, the animals were submitted to similar exercise at 105% of iMAC, randomly. Beyond the validity, these experimental design elicited the analysis of the incremental test reliability.

Analytical procedures

Blood samples of 25 mL were collected from distal tail of rats using micro heparinized glass capillaries. These samples were immediately transferred to plastic tubes of 1.5 milliliters containing trichloroacetic acid [4%]. Processed samples were analyzed by spectrophotometric method at 340 nm and compared to a curve calibration.

Statistical methods

The results are presented as the mean \pm standard deviation. The Kolmogorov-Smirnov and Liliefors tests confirmed the normality of variables. To attest validity and reliability were used the intraclass correlation test (two-way fixed model, 2,1 for absolute agreement), student's *t*-test for dependent samples, coefficient of variation, effect size and the Bland-Altman plots. The criterion for significance was $P < 0.05$.

RESULTS

Mean and standard deviation of intensities determined by incremental test and re-test were 5.06 ± 0.34 and 5.05 ± 0.35 , respectively. No significant difference was found between test and re-test ($p = 0.91$), resulting in a coefficient of variation of 4.04% and effect size of 0.02 for such comparisons.

The mean differences from both incremental tests were observed in Bland-Altman plots, being the data found near from zero (figure 2). Moreover, from these data we found significant

intraclass correlation ($r = 0.67$; $p = 0.01$). The BLC for incremental test was corresponding to $2.94 \pm 1.50 \text{ mmol.L}^{-1}$ and re-test was $2.89 \pm 0.71 \text{ mmol.L}^{-1}$.

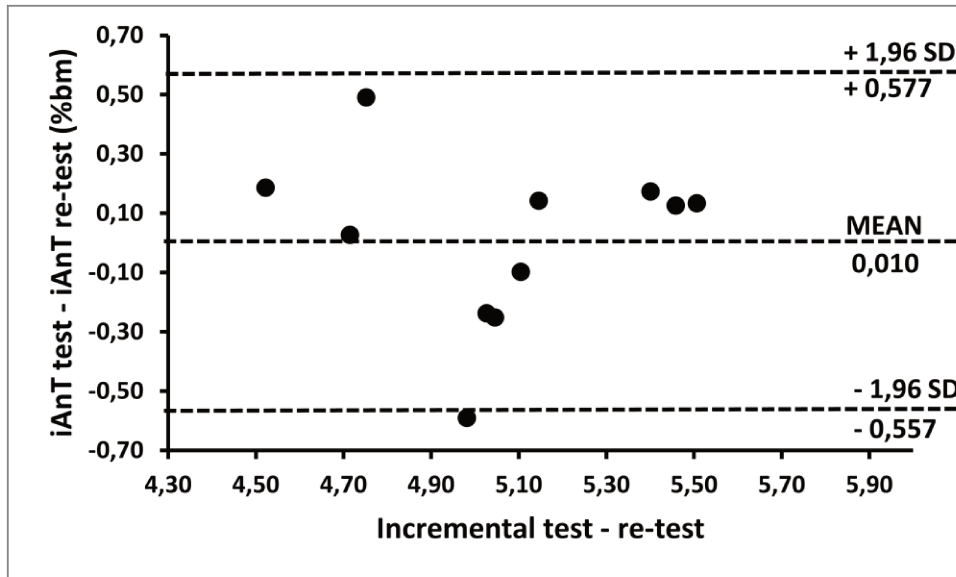


Figure 2. Bland-Altman plot for reliability analysis of incremental test and re-test.

Data from maximal lactate steady state is showed in table 1. All the animals submitted to constant 30 minutes at 100% of incremental re-test intensity showed difference lower than 1 mmol.L^{-1} for BLC when compared 30th and 10th minutes of exercise. When exercised at 105% of the incremental re-test intensity, were found differences higher than 1 mmol.L^{-1} .

Table 1. Blood lactate concentration for 10th minute (BLC10'), 30th minute (BLC30') and difference between then (BLC10' - BLC30') during maximal lactate steady state test applied with intensities corresponding to 100 and 105% of incremental test, showed in mean \pm standard deviation.

Intensity in relation to incremental Re-test	BLC10' (mmol.L ⁻¹)	BLC 30' (mmol.L ⁻¹)	BLC 10' - BLC 30' (mmol.L ⁻¹)
100%	2.63 \pm 0.52	2.36 \pm 0.51	-0.27 \pm 0.27
105%	2.46 \pm 0.50	3.85 \pm 0.75	1.39 \pm 0.55

DISCUSSION

The main contribution of this study was that the single incremental swimming test was successfully standardized and estimated the iMAC at a reliable, valid and reproducible fashion.

Regarding the maximal aerobic capacity intensity, similar results are reported at literature for other studies when compared the outcomes of the incremental test found with our experiment (Almeida et al., 2014; Beck et al., 2014a; Beck et al., 2014b; Beck et al., 2012; Botezelli et al., 2010; Cambri et al., 2010; Carvalho et al., 2005; Da Silva et al., 2010; de Araujo et al., 2013a; de Araujo et al., 2013b). While we found iMAC slightly above 5%bm, Gobatto et al. (2001) reported the iMLSS corresponding to 5%bm, Voltarelli et al. (2002) described the lactate minimum intensity of 4.95 \pm 0.10%bm, de Araujo et al. (2007) found 5.5%bm for MLSS and lactate minimum intensity between 5.05 \pm 0.50 and 5.36 \pm 0.50%bm. Important to note that such studies employed rats of the same species and approximately same age of our study.

Despite the similar intensities reported among protocols, the lactate concentration for MLSS intensity found in our study was apparently lower than those cited investigations. We associated such outcomes with slight differences on protocol design. We employed intervals at 10th and 30th minutes to blood withdrawn, while other studies performed this procedure at 10th, 15th, 20th, 25th and 30th minutes. It is possible that as happens for humans (Beneke, 2003) and apparently in running rats (Manchado et al., 2005), MLSS results for blood lactate concentration in swimming rats is protocol-dependent.

Despite exercise intensity outcomes from the incremental test are quite similar to those found at literature for iMAC, the validity of the incremental test needs to be attested. In this sense, we firstly attested the data reproducibility within animal, through test and re-test correlation. Intraclass correlation analysis resulted significant. Nevertheless, to attest the reproducibility, it is mandatory that no significant difference between the test and re-test are found, as we also reported. Secondly, the validity of the incremental test to estimates iMAC and iMLSS was analyzed through comparison between such intensities. As illustrated in the table 1, when the animals were submitted to continuous exercise of 30 minutes at 100% of the incremental test, the BLC between 10 and 30 minutes remained unaltered. Such result was interpreted as metabolic stabilization, which was not surprising. Nevertheless, increase of 5% of the incremental re-test intensity leads the BLC variation higher than 1 mmol.L⁻¹ between the same exercised period, denoting a critical anaerobic participation that only occurs above maximal aerobic capacity intensities (Beneke, 2003; Billat et al., 2003). So, the intensity determined through the incremental test was reproducible, estimated iMAC and was the highest overload for blood lactate stabilization, comprising enough data to attest such validity.

The precision of the iMAC estimation through the incremental test involves validity and reliability (Hopkins, 2000). Despite the associations recently discussed, those data do not directly mean good agreement. Then, we used Bland-Altman plot, which denoted in good agreement between the incremental test and re-test. The mean differences regarding the test and re-test data were very near from zero (0.010). The limits of agreement were approximately 0.55%bm, meaning very low error on iMAC estimative through the incremental test. Apart of this, the coefficient of variation showed low variation and was found low effect size, eliciting us to robustly conclude that the single incremental swimming test was definitively reliable.

We associated the success of incremental swimming test with the overloads selection. An initial intensity of 3%bm and increments of 0.5%bm for rats with 90 days-old leads us to obtain enough stages to perform the mathematical procedures. Data collected and analyzed lead us to provide an easiest procedure for the purpose of identify the maximal aerobic capacity intensity through a single incremental swimming test for rats, offering a high applicable, valid and reliable tool that can be useful for all experimental designs involving exercise and animal model.

Acknowledgements. This experiment was supported by FAPESP [Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo] under grants [Proc. 2009/08535-5, 2010/13377-7, 2011/13226-1 and 2012/20501-1]; and CNPQ [Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico] under Grants [Proc. 305650/2009-2 and 484174/2011-8]. Authors report any financial interest or benefit, beyond conflict of interest about this research. Part of the data showed in this article was published as an abstract form on 61st Annual Meeting, 5th World

Congress on Exercise is Medicine® and World Congress on the Role of Inflammation in Exercise, Health and Disease.

REFERENCES

- Almeida, J.A., B A.P., Gomes C.P., Araujo R.C., Pereira R.W., Franco O.L. (2014) Exercise training at MLSS decreases weight gain and increases aerobic capacity in obese Zucker rats. *Int J Sports Med.* **35**, 199-202.
- Almeida, J.A., Petriz B.A., Gomes C.P., Rocha L.A., Pereira R.W., Franco O.L. (2013) Determination of the maximal lactate steady state in obese Zucker rats. *Int J Sports Med.* **34**, 214-7.
- Almeida, J.A., Petriz Bde A., da Costa Gomes C.P., Pereira R.W., Franco O.L. (2012) Assessment of maximal lactate steady state during treadmill exercise in SHR. *BMC Res Notes.* **5**, 661.
- Beck, W.R., Araujo G.G., Gobatto C.A. (2012) Methods of exercise intensity and lactataemia determination of lactate minimum test in rats. *Comp Exerc Physiol.* **8**, 113-116.
- Beck, W.R., de Araujo G.G., Scariot P.P.M., dos Reis I.G.M., Gobatto C.A. (2014a) Time to exhaustion at anaerobic threshold in swimming rats: metabolic investigation. *Bratisl Med J.* **115**, 5.
- Beck, W.R., Ribeiro L.F.P., Scariot P.P.M., dos Reis I.G.M., Gobatto C.A. (2014b) Time of day effects on aerobic capacity, muscle glycogen content and performance assessment in swimming rats. *Sci Sports.* **29**, 5.
- Beneke, R. (2003) Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. *Eur J Appl Physiol.* **89**, 95-99.
- Billat, V.L., Sirvent P., Py G., Koralsztein J.P., Mercier J. (2003) The concept of maximal lactate steady state - A bridge between biochemistry, physiology and sport science. *Sports Med.* **33**, 407-426.
- Botezelli, J.D., Mora R.F., Dalia R.A., Moura L.P., Cambri L.T., Ghezzi A.C., Voltarelli F.A., Mello M.A. (2010) Exercise counteracts fatty liver disease in rats fed on fructose-rich diet. *Lipids Health Dis.* **9**, 116.
- Cambri, L.T., Dalia R.A., Ribeiro C., Rostom de Mello M.A. (2010) Aerobic capacity of rats recovered from fetal malnutrition with a fructose-rich diet. *Appl Physiol Nutr Metab.* **35**, 490-7.
- Carvalho, J.F., Masuda M.O., Pompeu F.A. (2005) Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **140**, 409-13.
- Cunha, R.R., Cunha V.N., Segundo P.R., Moreira S.R., Kokubun E., Campbell C.S., de Oliveira R.J., Simoes H.G. (2009) Determination of the lactate threshold and maximal blood lactate steady state intensity in aged rats. *Cell Biochem Funct.* **27**, 351-7.

- Da Silva, A.S., Pauli J.R., Ropelle E.R., Oliveira A.G., Cintra D.E., De Souza C.T., Velloso L.A., Carneiro J.B., Saad M.J. (2010) Exercise intensity, inflammatory signaling, and insulin resistance in obese rats. *Med Sci Sports Exerc.* **42**, 2180-8.
- de Araujo, G.G., Papoti M., B. M.F., de Mello M.A., Gobatto C.A. (2007) Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **148**, 888-92.
- de Araujo, G.G., Papoti M., Delbin M.A., Zanesco A., Gobatto C.A. (2013a) Physiological adaptations during endurance training below anaerobic threshold in rats. *Eur J Appl Physiol.* **113**, 1859-1870.
- de Araujo, G.G., Papoti M., Machado-Gobatto F.D., de Mello M.A.R., Gobatto C.A. (2013b) Monitoring chronic physical stress using biomarkers, performance protocols and mathematical functions to identify physiological adaptations in rats. *Lab Anim.* **47**, 36-42.
- Gobatto, C.A., de Mello M.A., Sibuya C.Y., de Azevedo J.R., dos Santos L.A., Kokubun E. (2001) Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **130**, 21-7.
- Gobatto, C.A., Kokubun E., Sibuya C.Y., Mello M.A.R. (1991) Efeitos da desnutrição proteico-calórica e do treinamento físico na produção de ácido láctico em ratos machos adultos após o teste de cargas progressivas: resultados preliminares. *Ciência e Cultura.* **43**, 725-726.
- Gobatto, C.A., Machado-Gobatto F.B., Carneiro L.G., de Araujo G.G., dos Reis I.G.M. (2009) Maximal lactate steady state for aerobic evaluation of swimming mice. *Comp Exerc Physiol.* **6**, 99-103.
- Gobatto, C.A., Scariot P.P.M., Ribeiro L.F.P., Machado-Gobatto F.B. (2013) Critical load estimation in Young swimming rats using hyperbolic and linear models. *Comp Exerc Physiol.* **9**, 85-91.
- Gondim, F.J., Zoppi C.C., Pereira-da-Silva L., de Macedo D.V. (2007) Determination of the anaerobic threshold and maximal lactate steady state speed in equines using the lactate minimum speed protocol. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **146**, 375-80.
- Heck, H., Mader A., Hess G., Mucke S., Muller R., Hollmann W. (1985) Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. *Int J Sports Med.* **6**, 117-30.
- Hopkins, W.G. (2000) Measures of reliability in sports medicine and science. *Sports Med.* **30**, 1-15.
- Kindermann, W., Simon G., Keul J. (1979) The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* **42**, 25-34.
- Lima, F.D., Stamm D.N., Della-Pace I.D., Dobrachinski F., de Carvalho N.R., Royes L.F., Soares F.A., Rocha J.B., Gonzalez-Gallego J., Bresciani G. (2013) Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts. *PLoS One.* **8**, e55668.
- Mader, A., Liesen H., Heck H. (1976) Zur beurteilung der sportartspezifischen ausdauerleistungsfähigkeit im labor. *Sportarzt Sportmed.* **27**, 109-112.
- Machado-Gobatto, F.B., Gobatto C.A., Contarteze R.V., Mello M.A. (2011) Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in running rats. *Indian J Exp Biol.* **49**, 781-5.
- Machado, F.B., Gobatto C.A., Contarteze R.V.L., Papoti M., Mello M.A.R. (2005) Maximal lactate steady state in running rats. *J Exerc Physiol-on line.* **8**, e-29 - e35.

- Tegtbur, U., Busse M.W., Braumann K.M. (1993) Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Med Sci Sports Exerc.* **25**, 620-7.
- Voltarelli, F.A., Gobatto C.A., de Mello M.A.R. (2002) Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res.* **35**, 1389-1394.

8. CAPÍTULO 5

8.1. MELATONIN IS AN ERGOGENIC AID FOR EXHAUSTIVE AEROBIC EXERCISE DURING HIGH DAILY SPONTANEOUS PHYSICAL ACTIVITY PERIOD, BUT NOT AT LOW

Wladimir Rafael Beck, Pedro Paulo Menezes Scariot, Claudio Alexandre Gobatto.

Has been reported many melatonin's properties that supposedly have direct and indirect positive effects on physical exercise; nevertheless, melatonin's ergogenic capacity remains controversial and under investigation. This study tested the ergogenic effects of acute administration of melatonin on exhaustive exercise (t_{lim}) at maximal aerobic capacity intensity (iMAC) during periods of lower (L) and higher (H) spontaneous physical activity in swimming rats. Additionally, we tested the time of day effect on aerobic exercise tolerance. L and H were determined gravimetrically and at above times of day, all animals were submitted to an incremental test to estimate iMAC. At 92 days-old, the animals received the melatonin (10 mg.kg^{-1} , I.P.) and after 30 minutes were submitted to t_{lim} during L (LM; $n = 15$) or H (HM; $n = 15$). Were included the control groups for melatonin effect for both times of day (LC, $n = 15$; HC, $n = 15$). The criterion of significance was 5%. Melatonin enhanced t_{lim} in 169% during H (HC = 72 min vs HM = 194 min; $p < 0.01$) and 90% during L (LC = 31 min vs LM = 59 min; $p = 0.39$), leading to significant effect of melatonin on t_{lim} ($F = 10,35$; $p < 0.01$). Additionally, the aerobic exercise tolerance was

higher when rats were evaluated during H ($F = 14,24$; $p < 0.01$). Melatonin is a reasonable ergogenic aid, especially during the wakefulness period, and the exercise tolerance is time-of-day-dependent for swimming rats.

Keywords: exercise physiology, nutrition, exercise performance, aerobic.

INTRODUCTION

Secretion of melatonin, an indoleamine pineal hormone, is inhibited by environmental light exposure (Menaker, 2003; Gimenez et al., 2014). As a result, blood melatonin concentrations are higher at night than during daylight in entrained mammals (Touitou, 2001; Detanico et al., 2010). Because of its daily cycles, melatonin is classically associated with the circadian rhythms synchronization of many physiological functions. Similar to the cycles of melatonin (Detanico et al., 2010), the spontaneous physical activity (SA) of nocturnal rats is high at night (wakefulness) and low during the day (resting/sleep) (Verwey et al., 2013; Ikeda et al., 2000). Core body temperature follows a similar cycle (Ikeda et al., 2000; Tanaka et al., 1990).

Anti-inflammatory (Caballero et al., 2008) and antioxidant (Phillipson, 2014) properties are also ascribed to melatonin. Its intracellular actions include inhibiting lipid peroxidation (Bonfont-Rousselot et al., 2011), increasing the levels of mitochondrial electron transport chain and Krebs cycle enzymes and maintaining liver and brain microsomal membrane stability (Acuna-Castroviejo et al., 2001). As a result, melatonin is thought to have therapeutic potential for

diseases such as insulin resistance (Teodoro et al., 2014) and obesity (Cipolla-Neto et al., 2014). It also shows pro-apoptotic actions in cancer cells (Carbajo-Pescador et al., 2013).

Apart from melatonin effects on circadian rhythm which supposedly improve the exercise tolerance (i.e., core body temperature and spontaneous activity), some of the functions of melatonin possible have direct and positive effects on performance. Exercise-induced inflammation (Caballero et al., 2008) and oxidative stress (Phillipson, 2014) are inhibited when melatonin is administered in both humans (Maldonado et al., 2012) and rats (Alonso et al., 2006). Melatonin also preserves glycogen content, stimulating fatty acid oxidation during exercise (Mazepa et al., 2000) and protecting muscle from exercise-induced damage (Hara et al., 1996). Nevertheless, the direct role of melatonin as an ergogenic aid for exercise performances is not clear for humans (Atkinson et al., 2003; Escames et al., 2012; Ozdemir et al., 2013; Waterhouse & Atkinson, 2009) and has not been directly investigated for rats, despite the fact that this rodent model allows the researchers to control the environment, drug administration and exercise conditions. Furthermore, it is not clear whether melatonin improves the swimming performances of nocturnal rats across the circadian periods. This is a critical issue because previous studies have demonstrated higher swimming performance during the natural wakefulness period for swimming nocturnal rats (Beck et al., 2014a). So, the use of exogenous melatonin as an ergogenic aid to physical exercise remains unclear, especially when administered at different times in the day and based on objective exercise parameters. The aim of this study was to investigate the ergogenic effects of acute administration of melatonin on exhaustive exercise (t_{lim}) at maximal aerobic capacity intensity (iMAC) during periods of lower and higher spontaneous physical activity in swimming rats. Additionally, we aimed to confirm the data described at literature which postulate that the time of day have significant effect on aerobic exercise tolerance.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Sixty Male Wistar rats were obtained from an institutional facility and maintained under a 12 h light/dark cycle, with the lights switched on at 06:00 h (zeitgeber time 0). We used a 100 W lamp during the light period (Phillips® soft white light; 2700 K; 565-590 nm; 60 lux). Rodents were housed in polyethylene cages with free access to water and rodent chow. Relative humidity was kept at 45–55 %, temperature at 22 ± 2 °C and noise levels below 85 decibels. We conducted the experiment according to the policies established by the U.S. Department of Health, Education, and Welfare and the American Physiological Society. The study was approved by the institutional Ethics Committee on the Use of Animals under process 2502-1.

Experimental design

At 45 days-old, rats were evaluated for spontaneous physical activity (SA) using gravimetry. The means of hourly activity across the 24 hours period was used to identify the lowest and highest SA and to randomly split the 60 rats into two groups: to be assessed at higher (H, n=30) and lower (L, n=30) SA. After that, all procedures were performed at a specific group time of day. Special environmental illumination was employed for animals assessed during the dark period (> 600 nm; < 15 lux), as described elsewhere (Beck et al., 2014b).

From 76 to 89 days-old, all the rats were submitted to a water environment and swimming adaptation to avoid stress from novelty during the exercise tests. The individual swimming

ergometer consisted of a cylindrical PVC tank with a 30 cm diameter and 100 cm depth of clean water at 31 ± 1 °C. At 90 days-old, all the animals were submitted to an incremental test (IT) in order to estimate iMAC. At 92 days-old, the animals that received the melatonin and after 30 minutes were submitted to an exhaustive exercise at iMAC (t_{lim}) during L were called LM (n = 15) and during H were called HM (n = 15). Were included the control groups for melatonin effect for both times of day (LC, n = 15; HC, n = 15).

Melatonin (SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, MO, USA; Reference M5250, $\geq 98\%$, Lot # SLBC7539V) was dissolved in ethanol (< 0.1 %) and diluted in saline solution (NaCl 0.9 %) to be administered I.P. at $10\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Control animals received an equal volume of vehicle alone.

Blood samples were collected before and after t_{lim} to determine lactate levels. Time of exhaustion at iMAC (t_{lim}) was recorded as the performance parameter. The experimental design is shown in figure 1.

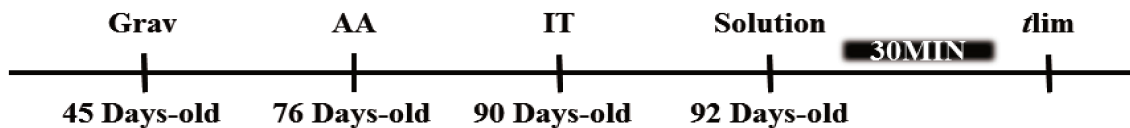


Figure 1. Experimental design of the study. Grav: gravimetric measurement; AA: aquatic adaptation; IT: incremental test; Solution: Melatonin or transport solution; t_{lim} : exhaustive exercise at maximal aerobic capacity intensity.

Gravimetric apparatus

The signal acquisition system consisted of a primary sensor element (load cell - PLA30Kg, Líder Balanças ®) involving in two hard iron platforms located under the animals cage. Due to the sensitive nature of the apparatus, minimal movements were noted. After amplification

(MKTC5-10®, *MK control and instrumentation*TM) and processing (USB-6008® signal-conditioning module, *National Instruments*), the collected data were transmitted to a software program (LabView Signal Express® 2009, *National Instruments*TM) and continuously recorded at 30 Hz during 24 hours. The apparatus was previously calibrated using fourteen known loads from 17.12 to 6,395.98 g. Such a procedure provided a linear relationship regression ($R^2 = 0.99$), employing a unit conversion from millivolts (mv) to kilograms (Kg). Then, digital signals were treated as described elsewhere (Biesiadecki et al., 1999), using MatLab® 7.0 (MathWorksTM). SA scores were adjusted by the rats body mass (Kg.g^{-1}) and statistically processed. The apparatus is illustrated in figure 2.

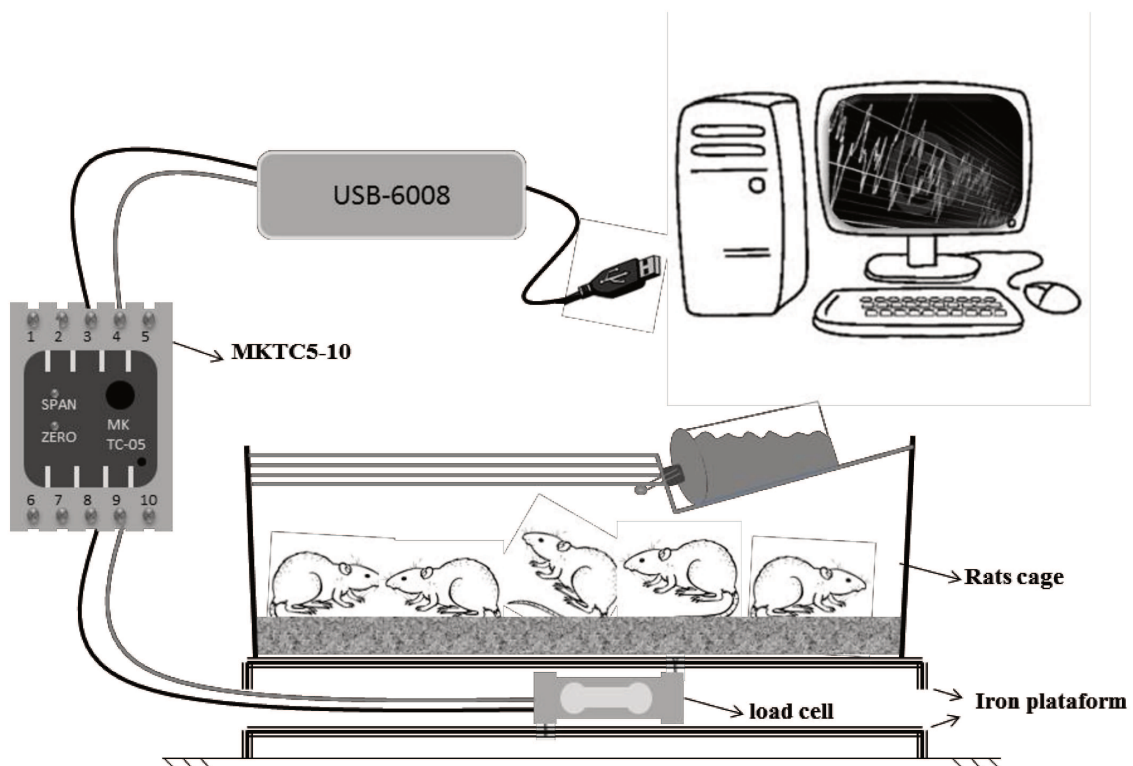


Figure 2. Illustration of the apparatus and data acquisition system to spontaneous physical activity measurement.

Incremental swimming test

Exposing animals to proportional incremental loads in time leads, at a given moment, to disproportional increases in blood lactate levels. The IT employed in this experiment consisted of 5-min stages with overloads corresponding to 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6 and 6.5 % of body mass (%bm), where tail vein blood samples were collected after each stage from rats distal part of the tail to determine lactate levels. The blood lactate concentration against exercise intensity were graphically plotted. Using such data, the disruption in the proportional blood lactate concentration increases was defined using a visual inspection as described, by two experienced researchers. Then, two linear regressions were constructed following the described break point, being the intersection of those linear regressions interpolated to the x-axis. The intensity corresponded to such interpolation was defined as the iMAC (figure 3). The validity and reproducibility of IT for rats was previously confirmed (Beck et al., 2014c). This procedure is important for individually and objectively assessing swimming exercise intensity.

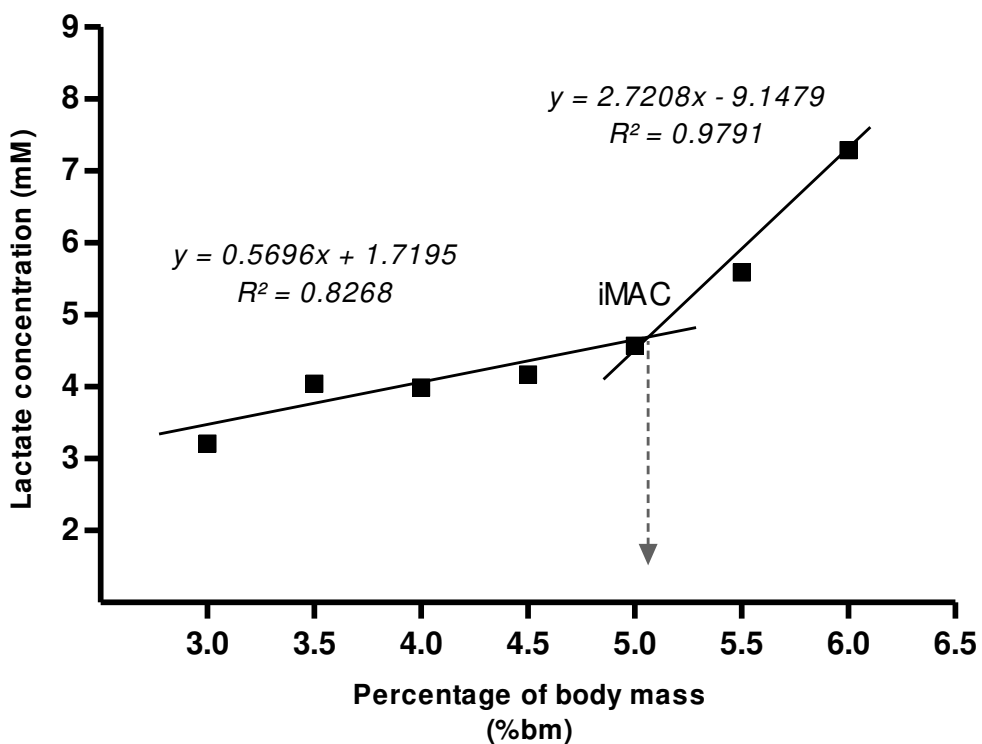


Figure 3. Incremental swimming test of the rat 1. The intercept of the two regression lines extrapolated to the X axis represents the maximal aerobic capacity intensity (iMAC), which in this test corresponded to 5.05 %bm and a lactate value of 4.59 mM.

Analytical procedures of biological material

Blood samples (25 μ L) were collected using micro heparinized glass capillaries, and immediately transferred to 1.5 mL plastic tubes containing 400 μ L of trichloroacetic acid [4 %]. The blood lactate concentration were determined by enzymatic method and processed samples were analyzed by spectrophotometry at 340 nm compared to a calibration curve.

Statistical methods

The results are presented as the mean \pm standard deviation (SD). The Kolmogorov-Smirnov and Liliefors tests confirmed the normality of all the variables, therefore we used parametrical statistics. SA data were expressed in 60-min means during 24 hours to determine the moments of higher and lower spontaneous activity. Percentage analysis and *t*-tests for dependent samples were employed to analyze differences between total daylight versus total dark period for SA. The *t*-test for independent samples was used to analyze the differences between iMAC and blood lactate levels with iMAC determined at H versus L. *Two-way* analysis of variance was used for the *t*lim variables (*t*lim and blood lactate levels before and after *t*lim) to test for a i) main effect of the drug [2, melatonin and placebo] and ii) a main effect of SA [2, higher and lower] and a possible interaction. Newmann-Keuls post hoc was used when appropriated. The criterion for significance was $P < 0.05$. All statistical procedures were performed using MatLab® 7.0 (MathWorks™).

RESULTS

Spontaneous activity during all daylight periods was significantly lower when compared to the total dark period ($P < 0.01$). This is not surprising, given that 75.24 % of the entire rat's daily activity is performed at night. We found the lowest SA values at 12:00 h (mean values of activity from zeitgeber time 6 to 7) and the highest at 20:00 h (zeitgeber time 14 to 15), as illustrated in figure 4. These results determined the time of day to start all assessments for L and H groups, respectively.

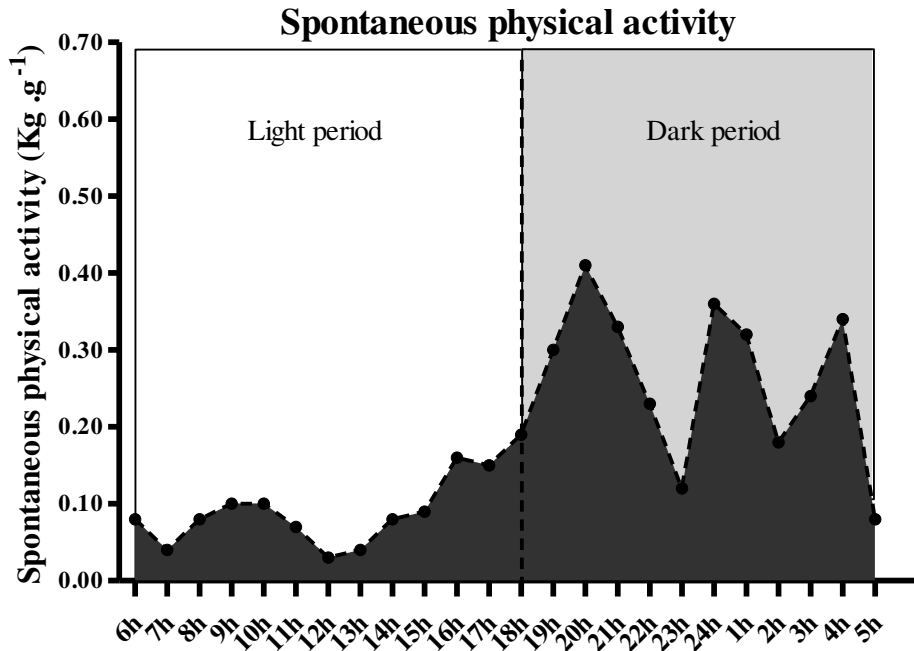


Figure 4. Spontaneous physical activity results continuously recorded during 24 hours.

The iMAC data corresponded to 5.86 ± 0.43 %bm for LC, 4.74 ± 0.35 %bm for LM, 5.49 ± 0.41 %bm for HC and 5.19 ± 0.43 %bm for HM, leading to significant differences between the groups. The iMAC of HC was lower than LC ($P < 0.01$) and HM was higher than LM ($p < 0.01$). Blood lactate levels at iMAC were 4.60 ± 1.22 mM for LC, 3.76 ± 1.09 mM for LM, 3.57 ± 1.41 mM for HC and 4.34 ± 1.29 mM for HM, resulting in no significant differences among groups ($P = 0.47$). Was found no significant effect of melatonin ($F = 3,58$; $p = 0.07$) on iMAC, however, time of day significantly influenced iMAC ($F = 23,77$; $p < 0.01$), resulting in no interaction between effects ($F = 0,61$; $p = 0.44$). Both the time of day ($F = 0,43$; $p = 0.51$) and melatonin ($F = 0,01$; $p = 0.90$) did not influenced the blood lactate concentration at iMAC.

Descriptive results from exhaustive exercise at maximal aerobic capacity intensity (*tlim*) were showed in figure 5. For *tlim*, were found significant effects of melatonin ($F = 10,35$; $p < 0.01$; Melatonin > Vehicle) and time of day ($F = 14,24$; $p < 0.01$; higher spontaneous activity > lower spontaneous activity), resulting in significant interaction between effects ($F = 4,05$; $p = 0.04$).

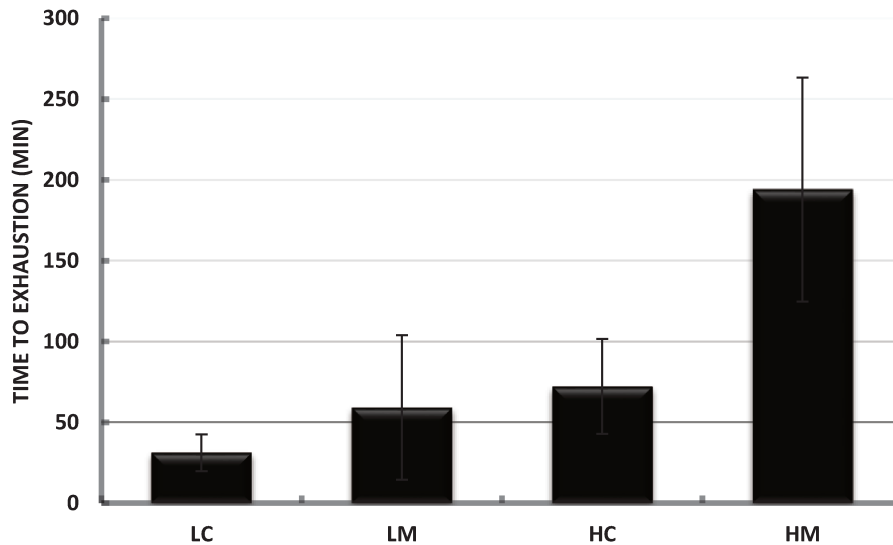


Figure 5. Descriptive data of the time to exhaustion at maximal aerobic capacity intensity of groups assessed during lower (L) and higher (H) spontaneous physical activity and that received melatonin (M) or vehicle (C), expressed in means and standard deviation. * $p < 0.05$ in relation to all other groups.

The blood lactate concentration before *tlim* were correspondent to 0.92 ± 0.06 mM to LC, 1.29 ± 0.08 mM to LM, 1.47 ± 0.03 mM to HC and 2.02 ± 0.18 mM to HM. The melatonin ($F = 17,31$; $p < 0.01$) and the assessment during higher spontaneous activity ($F = 33,28$; $p < 0.01$) significantly increases such variable, resulting in no interaction between effects ($F = 0,72$; $p = 0.39$). Regarding the blood lactate concentration after exercise, were found 7.01 ± 0.48 mM to LC, 6.75 ± 0.31 mM to LM, 6.93 ± 0.46 mM to HC and 6.28 ± 0.60 mM to HM. These results led to no significant effects

of melatonin ($F = 0,80$; $p = 0.37$) or time of day ($F = 0,29$; $p = 0.59$) and resulted in no interaction between effects ($F = 0,14$; $p = 0.70$).

DISCUSSION

The main finding of the present study was the significant and massive performance-enhancing effect of melatonin on proposed exercise. The time to exhaustion at maximal aerobic capacity intensity was higher with melatonin than in control animals. This is a novel and important result. However, it is important and interesting to note that the melatonin was significantly effective only when administered during the period of higher spontaneous activity (H). Additionally, performances were significantly better at H in relation to L, which corroborates a previous study (Beck et al., 2014a).

Spontaneous physical activity

The SA data objectively determine the periods of higher and lower activity across the day, as initially proposed. Confirming the nocturnal activity of albino Wistar rats that is reported in the literature (Refinetti, 2006), we measured 75.24 % of total daily spontaneous physical activity during the dark period, with a peak at 20:00h (zeitgeber time 14). Our data are consistent with the recording from Ikeda et al. (2000), who showed approximately 70 % of daily activity during the dark period.

SA was recorded using a device that was undetectable to the rats and under exactly the same environmental conditions, thus avoiding potential handling interferences during SA

assessments. These measurements estimate natural resting (or sleep period) and wakefulness periods, at times when physiological (Ikeda et al., 2000; Konczol et al., 2012; Lanfumey et al., 2013; Tanaka et al., 1990) and behavioral (Castelhano-Carlos & Baumans, 2009; Kelliher et al., 2000) modifications are systematically observed under laboratory conditions in entrained animals.

Swimming exhaustive bout at iMAC (*t*_{lim}): SA effect

The effects of circadian rhythm on sports performance remains currently under investigation and there is considerable controversy due to variability in environmental factors and differences among the types of exercise (Drust et al., 2005; Erren et al., 2014; Pullinger et al., 2014; Reilly & Waterhouse, 2009; Youngstedt & O'Connor, 1999). According to Drust et al. (2005), both field and laboratory studies are necessary to appropriately understand the effects of biological rhythms on exercise, and the control of environmental factors is crucial for study validity. Our experiment showed that the aerobic exercise tolerance was improved when rats were evaluated during the period of high spontaneous physical activity. Other experiments compared exercise during both circadian periods and systematically also found better performances at night for rats (Beck & Gobatto, 2013; Beck et al., 2014a). Apart from time of day effect, it is important to note that the environmental light employed for the exercise testing during the dark period (higher spontaneous physical activity, wakefulness period of nocturnal rats) are also capable to influence the performance (Beck et al., 2014b) . Because the focus of this experiment was to investigate the effects of melatonin on performance, we will briefly refer the reader to published work discussing the time-of-day effect on *t*_{lim} (Beck et al., 2014a).

Swimming exhaustive bout at iMAC (tlim): melatonin effect

According to data showed in figure 5, the animals that received melatonin and were evaluated during the wakefulness period (HM) presented the highest exercise tolerance ($p < 0.01$). The time to exhaustion of HM was 169% higher than HC ($p < 0.01$). The tlim of LM, despite non statistical difference, was 90% higher than LC ($p = 0.39$). These results showed that the ergogenic effect of melatonin was time-of-day-dependent, at least for swimming rats submitted to the proposed exercise and tested periods described for this experiment. This is an interesting result that asserts a summative effect of SA and drug effects to enhance performance. Apart of that, the importance of melatonin and time of day effect on such result was confirmed by the interaction between the effects ($F = 4,05$; $p = 0.04$).

Despite some availability of human data, the literature on melatonin effects in exercised rats is very scarce and no experiments have directly investigated melatonin as an ergogenic intervention for these animals. Mazepa et al. (2000) elegantly analyzed the metabolic effects of melatonin on energy substrates and postulated that melatonin preserves glycogen by increasing the use of lipids as energy substrates in exercise. Nevertheless, exercise parameters were not individualized and exercise outcomes were not shown. Other studies investigated the effects of melatonin on rats energy metabolism involving exercise using different assays (Bicer et al., 2011; Kaya et al., 2010; Ozdemir et al., 2013). However, no one has directly investigated the ergogenic effects of melatonin, and some studies did not control the exercise intensity or submitted the animals to swim individually. According to the American Physiological Society, these are important limitations in studies measuring exercise swimming in rats (APS, 2006).

Regarding the drug concentration, other studies have been employed melatonin dosages of 10 mg.kg⁻¹ for rats (Bharti et al., 2012; Tasdemir et al., 2012; Zurowski et al., 2012) and intraperitoneal administration due to fast bioavailability (Yeleswaram et al., 1997). When available, there are many possible mechanisms that could explain the ergogenic effects of melatonin (Escames et al., 2012; Reiter et al., 2003; Waterhouse & Atkinson, 2009). This hormone acts reducing exercise-induced inflammation and oxidative stress (Alonso et al., 2006; Maldonado et al., 2012), and alters energy availability during exercise (Bicer et al., 2011; Kaya et al., 2010; Mazepa et al., 2000). Therefore, it is plausible to believe that melatonin will have the most robust ergogenic effects in situation where inflammation, oxidative stress and unavailable energy are important limitations. Due to circadian cycling of physiological, cognitive and behavioral parameters, it seems also plausible that exercise tolerance might be better during the normal wakefulness period, compared to the resting or sleep period, for humans and rats. Nevertheless, endogenous melatonin is commonly increased during wakefulness only for entrained nocturnal rats, not for humans. It is possible that the combination of endogenous and exogenous melatonin is required for an ergogenic effect in our experiment. These effects may differ for humans, who commonly possess low endogenous melatonin concentrations during the wakefulness period.

It is important to note that despite our methodological attempts to objectively determine SA, drug administration and exercise parameters, our study has few limitations. Because this is the first study to show melatonin ergogenic effects on exercise tolerance in rats, new experiment designs are needed to confirm the consistency of this phenomenon and to understand the role of melatonin on acute exercise tolerance (i.e., anti-inflammatory effects, antioxidant effects, modulation of energy substrates, alertness, core body core temperature and circadian rhythms). These new studies should use different dosages of melatonin and exercise intensity/duration.

Finally, this experiment strongly suggested that melatonin is a reasonable ergogenic aid for swimming rats, especially during the wakefulness period. The work also supports the assertion that exercise tolerance is time-of-day-dependent for swimming rats assessed under individualized exercise intensity regiments using strict control of the laboratory environmental conditions.

DECLARATION OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest regarding this article. This work was supported by FAPESP [Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo] by a grant [Proc. 2009/08535-5, 2010/13377-7, 2011/13226-1 and 2012/20501-1]; and CNPQ [Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico] by a grant [Proc. 305650/2009-2 and 484174/2011-8]. The study was designed by WRB and CAG; data were collected and analyzed by WRB and PPMS; data interpretation and manuscript preparation were undertaken by WRB, PPMS and CAG. All authors approved the final version of the paper.

REFERENCES

- Acuna-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res.* 30:65-74, 2001.
- Alonso M, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. *J Pineal Res.* 41:8-14, 2006.

Atkinson G, Drust B, Reilly T, Waterhouse J. The relevance of melatonin to sports medicine and science. *Sports Medicine*. 33:809-831, 2003.

APS. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. *American Physiological Society*. 137, 2006.

Beck W, Gobatto CA. Effects of maximum intensity aerobic swimming exercise until exhaustion at different times of day on the hematological parameters in rats. *Acta Physiol Hung*. 100:427-34, 2013.

Beck WR, Araujo GG, Gobatto CA. Methods of exercise intensity and lactataemia determination of lactate minimum test in rats. *Comp Exerc Physiol*. 8:113-116, 2012.

Beck WR, Ribeiro LFP, Scariot PPM, dos Reis IGM, Gobatto CA. Time of day effects on aerobic capacity, muscle glycogen content and performance assessment in swimming rats. *Sci Sports*. 29:5, 2014a.

Beck WR, Scariot PPM, Gobatto CA. Primary and secondary thrombocytosis induced by exercise and environmental luminosity. *Bratisl Med J*. 115:5, 2014b.

Bharti VK, Srivastava RS, Malik JK, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Brown GM. Evaluation of blood antioxidant defense and apoptosis in peripheral lymphocytes on exogenous administration of pineal proteins and melatonin in rats. *J Physiol Biochem*. 68:237-45, 2012.

Bicer M, Akil M, Avunduk MC, Kilic M, Mogulkoc R, Baltaci AK. Interactive effects of melatonin, exercise and diabetes on liver glycogen levels. *Endokrynol Pol*. 62:252-6, 2011.

Biesiadecki BJ, Brand PH, Koch LG, Britton SL. A gravimetric method for the measurement of total spontaneous activity in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 222:65-9, 1999.

Bonnefont-Rousselot D, Collin F, Jore D, Gardes-Albert M. Reaction mechanism of melatonin oxidation by reactive oxygen species in vitro. *J Pineal Res*. 50:328-35, 2011.

Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernandez C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Gutierrez-Cuesta J, Pallas M, Camins A, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res.* 45:302-11, 2008.

Carbajo-Pescador S, Steinmetz C, Kashyap A, Lorenz S, Mauriz JL, Heise M, Galle PR, Gonzalez-Gallego J, Strand S. Melatonin induces transcriptional regulation of Bim by FoxO3a in HepG2 cells. *Br J Cancer.* 108:442-9, 2013.

Castelhano-Carlos MJ, Baumans V. The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats. *Lab Anim.* 43:311-27, 2009.

Clark JH, Conlee RK. Muscle and liver glycogen content: diurnal variation and endurance. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 47:425-8, 1979.

Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *J Pineal Res.* 56:371-81, 2014.

Detanico BC, de Souza A, Medeiros LF, Rozisky JR, Caumo W, Hidalgo MP, Battastini AM, Torres IL. 24-hour temporal pattern of NTPDase and 5'-nucleotidase enzymes in rat blood serum. *Chronobiol Int.* 27:1751-61, 2010.

Drust B, Waterhouse J, Atkinson G, Edwards B, Reilly T. Circadian rhythms in sports performance - An update. *Chronobiol Int.* 22:21-44, 2005.

Erren TC, Gross JV, Kantermann T, Kuffer L. Chronobiology and competitive sports: Recent studies and future perspectives. *Chronobiol Int.* 31:746-747, 2014.

Escames G, Ozturk G, Bano-Otalora B, Pozo MJ, Madrid JA, Reiter RJ, Serrano E, Concepcion M, Acuna-Castroviejo D. Exercise and melatonin in humans: reciprocal benefits. *J Pineal Res.* 52:1-11, 2012.

Gimenez MC, Beersma DG, Bollen P, van der Linden ML, Gordijn MC. Effects of a chronic reduction of short-wavelength light input on melatonin and sleep patterns in humans: evidence for adaptation. *Chronobiol Int.* 31:690-7, 2014.

Hara M, Abe M, Suzuki T, Reiter RJ. Tissue changes in glutathione metabolism and lipid peroxidation induced by swimming are partially prevented by melatonin. *Pharmacol Toxicol.* 78:308-12, 1996.

Ikeda M, Sagara M, Inoue S. Continuous exposure to dim illumination uncouples temporal patterns of sleep, body temperature, locomotion and drinking behavior in the rat. *Neurosci Lett.* 279:185-9, 2000.

Kaya O, Kilic M, Celik I, Baltaci AK, Mogulkoc R. Effect of melatonin supplementation on plasma glucose and liver glycogen levels in rats subjected to acute swimming exercise. *Pak J Pharm Sci.* 23:241-4, 2010.

Kelliher P, Connor TJ, Harkin A, Sanchez C, Kelly JP, Leonard BE. Varying responses to the rat forced-swim test under diurnal and nocturnal conditions. *Physiol Behav.* 69:531-9, 2000.

Kindermann W, Simon G, Keul J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 42:25-34, 1979.

Konczol K, Pinter O, Ferenczi S, Varga J, Kovacs K, Palkovits M, Zelena D, Toth ZE. Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *Int J Obes (Lond).* 36:1514-21, 2012.

Lanfumeu L, Mongeau R, Hamon M. Biological rhythms and melatonin in mood disorders and their treatments. *Pharmacol Ther.* 138:176-84, 2013.

Maldonado MD, Manfredi M, Ribas-Serna J, Garcia-Moreno H, Calvo JR. Melatonin administrated immediately before an intense exercise reverses oxidative stress, improves

immunological defenses and lipid metabolism in football players. *Physiol Behav.* 105:1099-1103, 2012.

Mazepa RC, Cuevas MJ, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Sci.* 66:153-60, 2000.

Menaker M. Circadian rhythms. Circadian photoreception. *Science.* 299:213-4, 2003.

Ozdemir O, Ozdem S, Ozkaya YG. Melatonin administration does not alter muscle glycogen concentration during recovery from exhaustive exercise in rats. *Eur J Sport Sci.* 13:174-182, 2013.

Phillipson OT. Management of the aging risk factor for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 35:847-57, 2014.

Portaluppi F, Smolensky MH, Touitou Y. Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. *Chronobiol Int.* 27:1911-29, 2010.

Pullinger SA, Brocklehurst EL, Iveson RP, Burniston JG, Doran DA, Waterhouse JM, Edwards BJ. Is there a diurnal variation in repeated sprint ability on a non-motorised treadmill? *Chronobiol Int.* 31:421-432, 2014.

Refinetti R. Variability of diurnality in laboratory rodents. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 192:701-14, 2006.

Reilly T, Waterhouse J. Circadian aspects of body temperature regulation in exercise. *J Thermal Biol.* 34:Cp1-170, 2009.

Tanaka H, Yanase M, Kanosue K, Nakayama T. Circadian variation of thermoregulatory responses during exercise in rats. *Am J Physiol.* 258:R836-41, 1990.

Tasdemir S, Samdanci E, Parlakpınar H, Polat A, Tasdemir C, Cengiz N, Sapmaz H, Acet A. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on the brains, testes, duodena and stomachs of rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 16:860-6, 2012.

Teodoro BG, Baraldi FG, Sampaio IH, Bomfim LH, Queiroz AL, Passos MA, Carneiro EM, Alberici LC, Gomis R, Amaral FG, Cipolla-Neto J, Araujo MB, Lima T, Akira Uyemura S, Silveira LR, Vieira E. Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. *J Pineal Res.* 2014.

Touitou Y. Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Exp Gerontol.* 36:1083-100, 2001.

Verwey M, Robinson B, Amir S. Recording and analysis of circadian rhythms in running-wheel activity in rodents. *J Vis Exp.* 71:50186, 2013.

Waterhouse J, Atkinson G. Melatonin as an ergogenic aid. *Biological Rhythm Research.* 40:71-79, 2009.

Yeleswaram K, McLaughlin LG, Knipe JO, Schabdach D. Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. *J Pineal Res.* 22:45-51, 1997.

Youngstedt SD, O'Connor PJ. The influence of air travel on athletic performance. *Sports Medicine.* 28:197-207, 1999.

Zurowski D, Nowak L, Machowska A, Wordliczek J, Thor PJ. Exogenous melatonin abolishes mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia in neuropathic pain. The role of the opioid system and benzodiazepine-gabaergic mechanism. *J Physiol Pharmacol.* 63:641-7, 2012.

9. CAPÍTULO 6

9.1. MELATONIN ACTS AS ERGOGENIC BUT DO NOT PREVENTS MUSCLE INFLAMMATION AND DAMAGE FROM SWIMMING EXHAUSTIVE EXERCISE AT MAXIMAL AEROBIC CAPACITY IN RATS

Wladimir Rafael Beck, José Rodrigo Pauli, José Diego Botezelli, Claudio Alexandre Gobatto.

ABSTRACT

Well documented is that exercise promotes inflammation and tissue damage, which seems to be prevented by acute melatonin administration just before exercise. Nevertheless, there is no evidence that protective effects of melatonin remains after long duration exercise performed at individualized maximal aerobic capacity intensity (iMAC) during both circadian periods. We tested the melatonin effects on swimming rat's performance, inflammation, and cardiac and skeletal muscle tissue damage after exhaustive exercise at iMAC performed during light and dark circadian periods. Rats were submitted to an incremental test to individually estimate the iMAC under specific time of day. At 92-days old, animals were submitted to an exhaustive exercise at iMAC (r_{lim}) 30 minutes after melatonin administration (10mg.kg⁻¹, I.P.). Were analyzed skeletal muscle inflammatory proteins, skeletal and cardiac tissue damage and hematological and metabolic parameters. In the absence of exercise, muscle inflammatory proteins remained unaltered by time of day and melatonin effects, however, general physiological status was improved by melatonin administration. In the presence and absence of melatonin administration were found muscle inflammation and tissue damage, but melatonin promotes massive ergogenic

effect, which increased the time of muscle contractions and possibly leading to the lack of its protector effect found at literature.

INTRODUCTION

It is well documented that local and systemic inflammation, muscle damage and oxidative stress are induced by long duration or high intensity exercise, impairing skeletal muscle parenchyma function (Davis et al., 2007). Some authors have been postulated that it could partially explain deficits in exercise performance (Baldwin Lanier, 2003; Robson-Ansley et al., 2004; Warren et al., 2001), encouraging the use of anti-inflammatory compounds. Melatonin is known to inhibits inflammation through a variety of stimulus, like *i*) impairing NK- κ B-DNA binding (Chuang et al., 1996), *ii*) inhibiting NF- κ B activation (Gilad et al., 1998) by blocking phosphorylation of IKK and JNK and it consecutive pathways (Liang et al., 2009), *iii*) reducing cytokines expression (Sasaki et al., 2002; Szczepanik et al., 2007) and *iv*) acting as antioxidant and consequently preventing muscle damage (Veneroso et al., 2009), which are important pro-inflammatory feedback.

Melatonin is a pineal gland hormone classically related to entrain biological rhythms of mammals. However, since Alberti (1958) isolates melatonin from bovine pineal gland, the spectrum of functions is growing. Diseases treatment and health issues comprises critical scientist's interest about melatonin (Carbajo-Pescador et al., 2013; Cipolla-Neto et al., 2014; Teodoro et al., 2014; Phillipson, 2014), moreover, considerable number of studies has investigated it neurohormone effects on physical exercise (Ho et al., 2005; Veneroso et al., 2009; Teodoro et al., 2014; Maldonado et al., 2012; Ozdemir et al., 2013; Caballero et al., 2008; Alonso et al., 2006;

Mazepa et al., 2000). Has been postulated that even a single dose of exogenous melatonin just before exercise aids preventing inflammation, oxidative stress and muscle tissue damage from skeletal muscle contraction (Veneroso et al., 2009; Alonso et al., 2006; Maldonado et al., 2012).

Melatonin effects on exercise has been showed in a variety of models (Mazepa et al., 2000; Kaya et al., 2010; Ozdemir et al., 2013; Bicer et al., 2011), nevertheless, there is no evidence that protective effects of melatonin remains after long duration exercise performed at individualized maximal aerobic capacity intensity (iMAC) during both circadian periods. Animal model of swimming performance mimics those physiological modulations found in sports competitions with long duration cyclic exercise, however, most laboratory animals are nocturnal. So, the aim of this study was to investigate the melatonin effects on swimming rat's performance, inflammation, and cardiac and skeletal muscle tissue damage after exhaustive exercise at iMAC (*tlim*) performed during light and dark circadian periods. Based on literature, the hypothesis of this study was that melatonin aids as ergogenic and exerts protective effect regarding inflammation and tissue damage after the proposed exercise during both circadian periods.

METHODS

Animals

Male Wistar rats were housed in polyethylene cages with free access to water and rodent chow, under 12 h light/dark cycle (lights on at 06:00 h), temperature of 22 ± 2 °C, relative humidity kept at 45–55 % and noise below 85 decibels. Was used a 100 W lamp during light period (Phillips® soft white light; 2700 K; 565-590 nm; 60 lux). We conducted the experiment according

to the current National laws. The study was approved by institutional Ethics Committee on the Use of Animals under process 2502-1.

Experimental design

Highlighting that the lowest and highest spontaneous physical activity of nocturnal entrained rats are corresponding to approximately 12:00 and 20:00 h, rats were firstly splitted at 45 days-old to diurnal (D) or nocturnal (N) assessments in order to test the time of day effect. After two weeks of water environment and swimming adaptation performed in individual swimming ergometer (cylindrical PVC tank with 30 cm diameter and 100 cm depth of clean water at 31 ± 1 °C), at 90 days-old all animals were submitted to an incremental test (IT) to estimate the intensity corresponding to maximal aerobic capacity (iMAC), at each group hour (D or N). IT were performed in this adult rats following (Beck et al., 2014) where validity and reliability were confirmed. Animals were submitted to overloads corresponding to 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6 and 6.5% of body mass (%bm). Blood samples were collected to determine lactate concentration each 5-min stages, being lactate concentration versus exercise intensity plotted to construct two linear regressions where the intersection interpolated to X-line was corresponding to iMAC and Y-line to blood lactate concentration at iMAC ([lac]iMAC).

To investigate the melatonin effect, D and N rats were randomly splitted in Melatonin (M) or Placebo (Pl) animals. Melatonin (Sigma Aldrich ©, $C_{13}H_{16}N_2O_2$, >98%) was dissolved in ethanol (< 0.1 %) and diluted in saline solution (NaCl 0.9 %) to be administered I.P. at $10\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ for M group. Placebo corresponded to equal transport solution with no melatonin content.

Regarding the exercise effect, half of animals were submitted to an exhaustive exercise at iMAC (t_{lim} ; Exercised animals: Ex), while other animals remained at rest (Control animals: Ct).

Thirty minutes before such intervention, the solution corresponding to each group was administered (M or PI). Blood samples were collected before and after t_{lim} to determine lactate levels. Time to exhaustion (t_{lim}) was recorded as the exercise performance parameter.

In summary, the animals were splitted in eight groups with 15 animals each group: DCt (daily handling and assessments, transport solution, no exercised); DEx (transport solution, exercised); DM (melatonin, no exercised) and DMEx (melatonin, exercised). Nocturnal animals were divided at same fashion, but with N instead of D in initial acronyms (NCt, NEx, NM and NMEx). Experimental design is illustrated at figure 1.

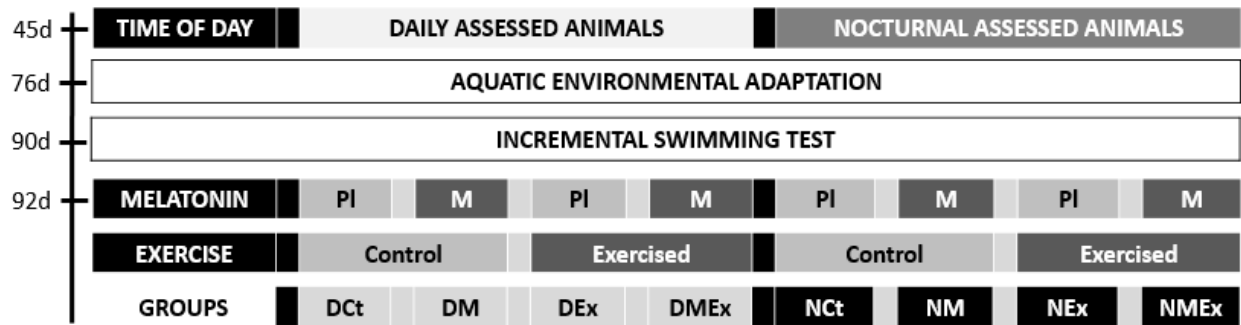


Figure 1. Schematic summary of study design. At 45 days-old (45d) animals were splitted in diurnal or nocturnal assessments, determining the time of day effect. At 76 days-old (76d) begun the aquatic environmental and swimming adaptation, being incremental swimming test performed at 90 days-old (90d) at specific group's time of day. At 92 days-old (92d) *i*) animals were exposed to a placebo (PI) or melatonin (M) administration, comprising the melatonin effect and *ii*) were submitted to the exhaustive aerobic exercise (Exercised) or remained at rest (Control) to test the exercise effect. Group's acronyms are described in the text.

Respecting one hour of interval after t_{lim} , the animals were exposed to CO₂ before euthanized through thoracotomy, when blood withdraw was immediately performed through cardiac puncture. Sample was divided in two aliquots: *i*) immediately transferred to polyethylene

tubes containing k3EDTA (FL Medical, Torreglia, PD, Italy) and *ii*) transferred to empty glass tubes, resting for 15 minutes and then centrifuged 20 minutes at 3000 rpm to serum withdraw, stored at -80°C. k3EDTA samples were gently mixed by inversion and no evidence of hemolysis and coagulation were observed within. The skeletal muscle soleus was extracted and immediately transferred to liquid nitrogen to posterior Western Blot analysis (described ahead). Collection and storage of all biological material were performed in less than 10 minutes for each animal.

Analytical procedures of biological material

Hematological parameters

Hematological parameters were analyzed by hemochromocytometric tests performed on the XS-1000 system to White Blood Count (Leukocytes; WBC), Lymphocytes (LYMP) and Neutrophils (NEUTR).

Plasma and Serum parameters

To determine blood lactate concentration during IT and before and after *flim*, blood samples (25 µL) were collected from distal tail of the rats using micro heparinized glass capillaries, being immediately transferred to plastic tubes of 1.5 milliliters containing 400 µL of trichloroacetic acid [4 %]. Processed plasma samples were analyzed by spectrophotometric method at 340 nm against calibration using five know lactate concentrations from 1 to 15mM.

Serum were stored in several aliquots to avoid undesired thaws and were used to determine uric acid (UA), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), total glutathione (GSH), glucose (GLUC), total protein (TP), globulin (GLOB), total cholesterol (CHOL), urea, creatinine (CREAT), albumin (ALB), lactate dehydrogenase (LDH), skeletal muscle creatine-kinase (CK-MM) and cardiac muscle creatine-kinase (CK-MB) isoforms, following manufacture's guidelines.

Western blotting procedures

Soleus samples were homogenized in ice-cold RIPA Buffer (AMRESCO, OH, USA) and protein inhibitors (100 mmol/L sodium fluoride, 10 mmol/L sodium vanadate, 2 mmol/L phenyl methylsulphonyl fluoride and 0.01 mg aprotinin) employing a polytron PTA 20S generator operated at maximum speed for 30 s and clarified by centrifugation. Protein concentrations were analyzed by BCA kit (Thermo, NY, USA). A 100 µg aliquot was used to perform Western Blotting analysis as described (Pauli et al., 2008). The antibodies against pIKK (Ser176; rabbit anti-pIKK β ; 1:1000) and I κ B α (C-21; rabbit anti- I κ B α ; 1:1000) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) and α -tubulin (mouse anti α -tubulin; 1:1000) from Novus Biological (NOVUS, CO, USA). Quantitative analysis of the blots was done using Photoshop software (ADOBE, USA).

Statistical procedures

Data were presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Since no intervention but time of day were performed until iMAC assessment (D vs N), iMAC and [lac]iMAC were analyzed through *t*-test for independent samples using pooled data of all animals assessed during daily (DCt, DM, DEx and DMEx) versus night period (NCt, NM, NEx and NMEx). Other data were analyzed as three distinct experiments to time of day [2, day (D) and night (N)], exercise [2, exercised (Ex) and control (C)] and/or melatonin [2, melatonin (M) and placebo (Pl)] as main

effects. To experiment 1, data from western blotting, blood and serum parameters of DCt, DM, NCt and NM were processed through analysis of variance to test melatonin and time of day effects. Groups DCt, DEx, NCt and NEx were employed to test exercise and time of day effects in experiment 2, while experiment 3 used groups DM, DMEx, NM and NMEx to test exercise and time of day in animals under melatonin effect. t_{lim} to experiments 2 and 3 were compared using t -test for independent samples (DEx vs NEx and DMEx vs NMEx, respectively). Additional analysis of t_{lim} , resting ([lac]rest) and immediately after t_{lim} blood lactate concentration performed after experiment 3 were conducted through analysis of variance on i) main effect for melatonin [2, melatonin (M) and placebo (Pl)] and ii) main effect for time of day [2, day (D) and night (N) to all exercised groups (DEx, NEx, DMEx and NMEx). Newmann-Keuls post hoc was used when appropriated. Criterion for significance was 5%. All statistical procedures were performed using MatLab® 7.0 (MathWorks™).

RESULTS

iMAC was higher to N animals while [lac]iMAC was not influenced by time of day effect

Animals assessed at daily hours showed iMAC and [lac]iMAC correspondent to 4.78 ± 0.06 %bm and 4.14 ± 0.15 mM, respectively, while nocturnal rats had 5.32 ± 0.06 %bm and 4.11 ± 0.16 mM to the same parameters. iMAC at such condition was higher to N ($P < 0.01$), while [lac]iMAC was statistically equal ($P = 0.86$) between groups.

Experiment 1

In the absence of exercise, muscle inflammatory proteins remains unaltered by time of day and melatonin effects, however, general physiological status was improved by melatonin administration

Figure 2 shows time of day and melatonin effect on animals that were not submitted to exercise. Were not found significant melatonin ($F = 0.01$; $P = 0.91$) or time of day ($F = 4.71$; $P = 0.06$) effects on skeletal muscle pIKK β , as occurs to I κ B α (melatonin: $F = 0.24$; $P = 0.64$; time of day: $F = 2.25$, $P = 0.16$, figure 2a). Regarding tissue damage markers (Figure 2b) and blood inflammatory parameters (Figure 2c), were found that melatonin reduced CK-MM ($F = 7.42$; $P = 0.01$) but increased neutrophils count ($F = 5.27$; $P = 0.03$), while WBC ($F = 9.29$; $P < 0.01$) and lymphocytes ($F = 10.79$; $P < 0.01$) were found higher during daily hours and LDH higher at dark period ($F = 5.37$; $P = 0.02$).

	<u>DCt</u>	<u>DM</u>	<u>NCt</u>	<u>NM</u>
TIME OF DAY	D	D	N	N
DRUG	-	+	-	+

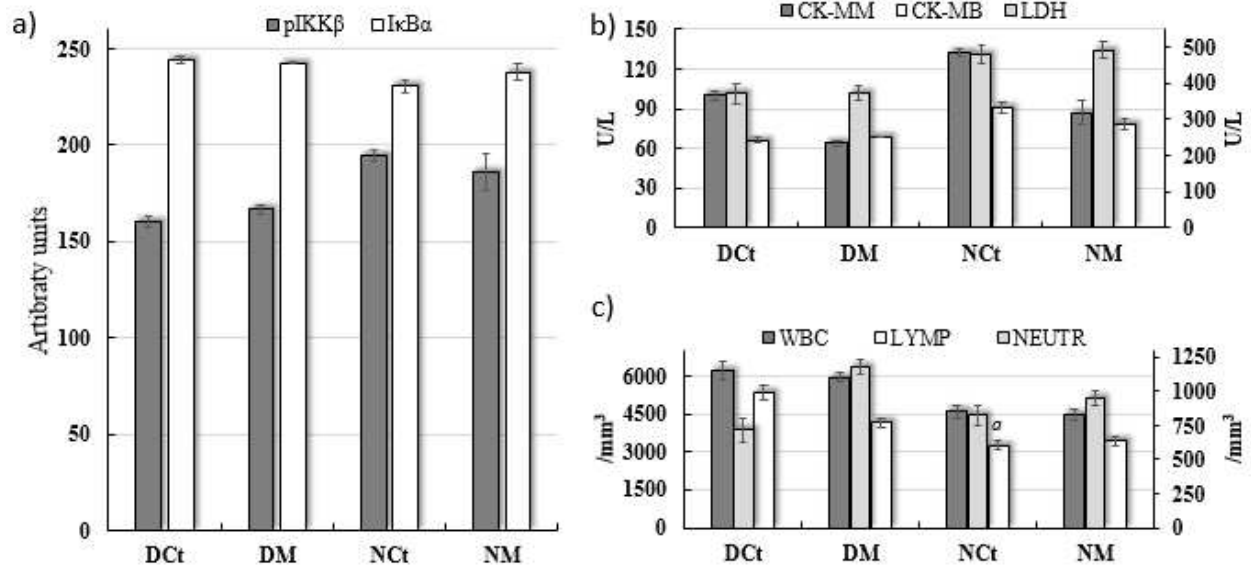
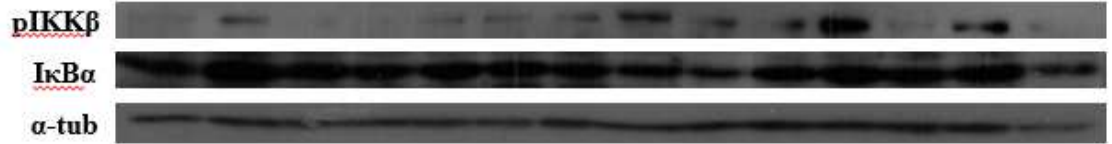


Figure 2. Data from experiment 1 expressed as mean±SEM and significant post hoc results to animals assessed at daily (DCt and DM) or night (NCt and NM) period and submitted (DM and NM) or no (DCt and NCt) to melatonin administration. Figure 2a shows pIKKβ and IκBα skeletal muscle content. Skeletal (CK-MM, left Y-axis) and cardiac (CK-MB, left Y-axis) isoforms of creatine kinase and lactate dehydrogenase (LDH, right Y-axis) data are illustrated in figure 2b. Figure 2c shows white blood cells (WBC, left Y-axis), lymphocytes (LYMP, left Y-axis) and neutrophils (NEUTR, right Y-axis) results from melatonin and time of day effects. *a*: $P < 0.05$ in relation to DCt for same variable; $n=3$ or 4 for Western blotting analysis and 15 for other variables.

The influence of melatonin and time of day effects on oxidative stress, metabolic and physiological status markers are illustrated at table 1. Changes were observed in specific parameters, highlighting that melatonin decreased creatinine and urea while SOD and CAT were found higher at rats wakefulness period.

Experiment 2

In the absence of melatonin, exercise promotes acute muscle and systemic inflammation and tissue damage

Experiment 2 contemplates the results to time of day and exercise effects on animals not exposed to exogenous melatonin. Inflammatory muscle proteins were significantly modulated by exercise (figure 3a). Daily assessed animals showed higher I κ B α skeletal muscle content in relation to nocturnal assessed animals ($F = 10.24$, $p < 0.01$), possibly due to longer exercise duration at night (figure 3c) and leading exercise to decreases I κ B α ($F = 8.47$, $p = 0.01$). Exercise decreased pIKK β muscle content ($F = 5.60$, $p = 0.04$), nevertheless, was not found time of day effect on such inflammatory parameter ($F = 0.96$, $p = 0.35$), as well as no differences among groups. All tissue damage markers (figure 3b) were found significantly increased during night in relation to daily assessed animals (CK-MM: $F = 4.47$, $P = 0.04$; CK-MB: $F = 8.2$, $P < 0.01$ and LDH: $F = 10.27$, $P < 0.01$) and after exercise in relation to control rats (CK-MM: $F = 4.77$, $P = 0.03$; CK-MB: $F = 9.30$, $P < 0.01$ and LDH: $F = 4.58$, $P = 0.04$). The systemic inflammatory parameters (figure 3d) showed no time of day ($F = 2.40$; $P = 0.12$) or exercise ($F = 0.02$; $P = 0.86$) effects on WBC count, nevertheless, exercise decreased lymphocytes ($F = 8.67$; $P < 0.01$) and increased neutrophils count ($F = 25.16$; $P < 0.01$) and only lymphocytes were influenced by time of day ($F = 8.02$; $P < 0.01$; $D > N$).

	<u>DCt</u>	<u>DEx</u>	<u>NCt</u>	<u>NEx</u>
TIME OF DAY	D	D	N	N
EXERCISE	-	+	-	+

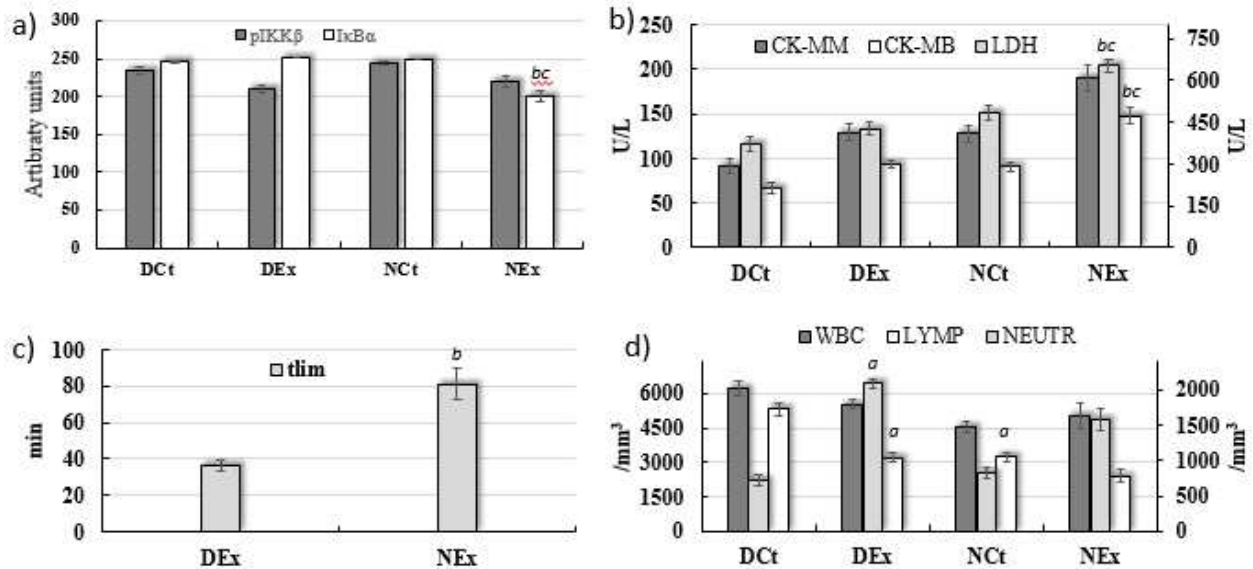
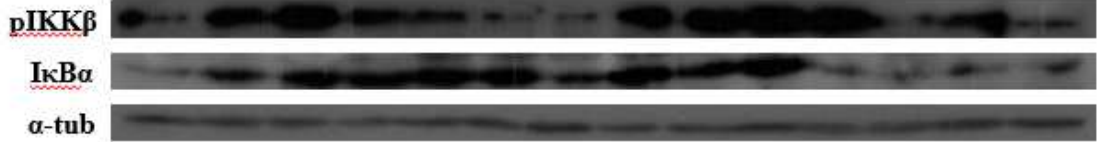


Figure 3. Mean±SEM and post hoc results to animals assessed at daily (DCt and DEx) or night (NCt and NEx) period and submitted (DEx and NEx) or no (DCt and NCt) to exhaustive exercise at maximal aerobic capacity intensity. Figure 3a shows pIKKβ and IκBα skeletal muscle content. Skeletal (CK-MM, left Y-axis) and cardiac (CK-MB, left Y-axis) isoforms of creatine kinase and lactate dehydrogenase (LDH, right Y-axis) data are illustrated in figure 3b. Figure 3c illustrate the time to exhaustion at maximal aerobic capacity intensity. Figure 3d shows white blood cells (WBC, left Y-axis), lymphocytes (LYMP, left Y-axis) and neutrophils (NEUTR, right Y-axis) results from exercise and time of day effects. *a*: $P < 0.05$ in relation to DCt for same variable; *b*: $P < 0.05$ in relation to DEx for same variable; *c*: $P < 0.05$ in relation to NCt for same variable; ; $n=3$ or 4 for Western blotting analysis and 15 for other variables.

Data about time of day and exercise effects on animals that did not received melatonin were showed in table 2. Generally, in the presence of exercise were found considerable and expected changes in many parameters. Longer exercise duration of NEx in relation do DEx (Figure 3c) certainly influenced the time of day effect.

Experiment 3

Melatonin did not prevented exercise-induced inflammation and tissue damage

This analysis included only animals exposed to exogenous melatonin and tested time of day and exercise effects. pIKK β content was significantly lower in daily assessments in relation to night (F = 6.02, p = 0.03) and control animals in relation to exercised (F = 6.78, p = 0.02), while I κ B α content was not influenced by time of day (F = 2.33, p = 0.16) or exercise (F = 1.46, p = 0.25) effects (Figure 4). Exercise (figure 4c) leads to significant increases on tissue damage markers when compared to control animals (CK-MM: F = 41.41, P < 0.01 ; CK-MB: F = 15.16, P < 0.01 and LDH: F = 24.41, P < 0.01), being also found higher outcomes to such parameters at night in relation to daily period (CK-MM: F = 24.48, P < 0.01 ; CK-MB: F = 12.95, P < 0.01 and LDH: F = 31.55, P < 0.01). WBC (figure 4d) was not influenced by time of day (F = 2.22; P = 0.14) or exercise (F = 2.88; P = 0.09) effects, but lymphocytes (figure 4d) were found higher at daily period (F = 9.44; P < 0.01) and neutrophils (figure 4d) were significantly increased by exercise effect (F = 40.87; P < 0.01).

	DM	DME_x	NM	NME_x
TIME OF DAY	D	D	N	N
EXERCISE	-	+	-	+

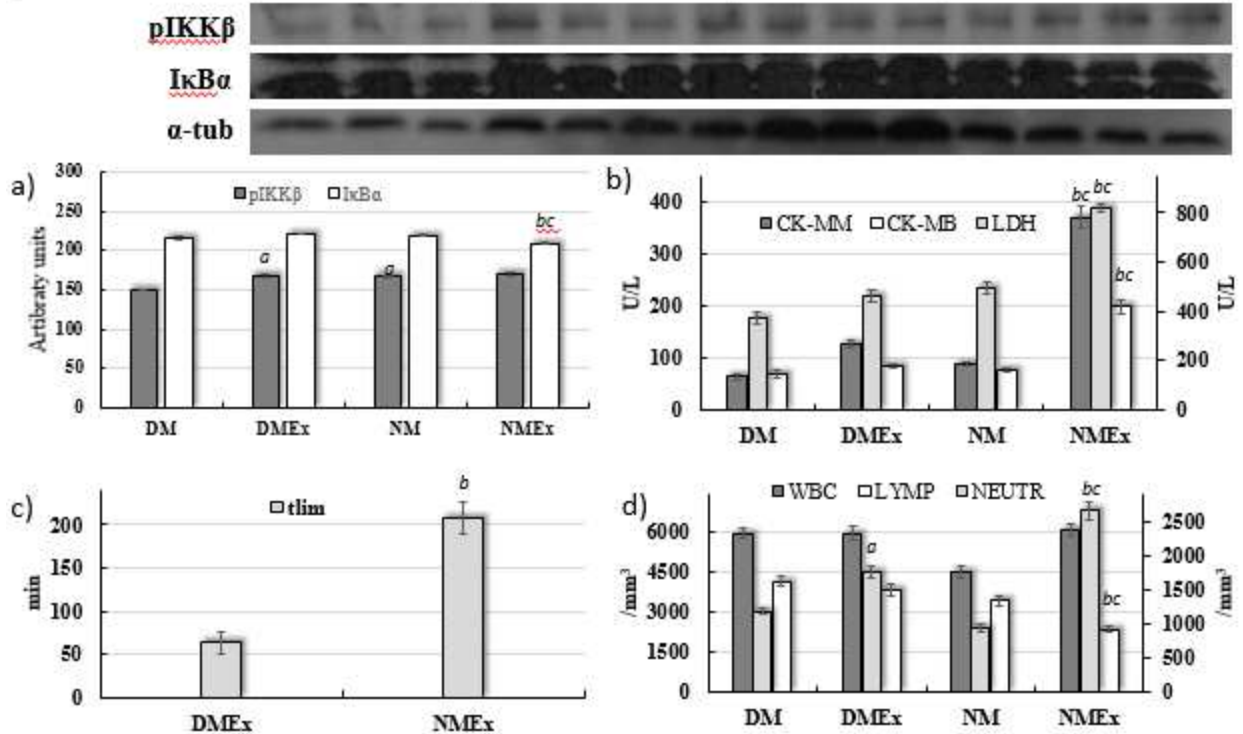


Figure 4. Mean±SEM and post hoc results to animals exposed to melatonin and assessed at daily (DM and DME_x) or night (NM and NME_x) period and submitted (DME_x and NME_x) or no (DM and NM) to exhaustive exercise. Figure 4a shows pIKKβ and IκBα skeletal muscle content. Skeletal (CK-MM, left Y-axis) and cardiac (CK-MB, left Y-axis) isoforms of creatine kinase and lactate dehydrogenase (LDH, right Y-axis) data are illustrated in figure 4b. Figure 4c illustrate the time to exhaustion at maximal aerobic capacity intensity. Figure 4d shows white blood cells (WBC, left Y-axis), lymphocytes (LYMP, left Y-axis) and neutrophils (NEUTR, right Y-axis) results from exercise and time of day effects. *a*: P < 0.05 in relation to DM for same variable; *b*: P < 0.05 in relation to DME_x for same variable; *c*: P < 0.05 in relation to NM for same variable; n=3 or 4 for Western blotting analysis and 15 for other variables.

Additional data about physiological, oxidative and metabolic variables on animals under melatonin, time of day and exercise effects were showed in table 3. Melatonin leads to makeable higher performance at night period, leading to expressive differences for NME_x group in relation to other all. Certainly the longer time to exhaustion also influenced the time of day effect in this experiment.

Table 1. Descriptive and parametrical statistics results to total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLOB), cholesterol (CHOL), glucose (GLUC), urea, creatinine (CREAT), uric acid (UA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and total glutathione (GSH) expressed in mean±SEM for rats submitted to the main effects on melatonin and time of day.

	PLACEBO GROUPS		MELATONIN GROUPS		MELATONIN EFFECT		TIME OF DAY EFFECT	
	DCt	NCt	DM	NM	F	P	F	P
TP (g/dL)	5.81±0.05	5.73±0.06	5.70±0.05	5.53±0.21	<0.01	0.97	0.18	0.67
ALB (g/dL)	2.64±0.11	2.85±0.14	2.17±0.21 _a	3.07±0.11 _b	0.65	0.42	13.54	<0.01
GLOB (g/dL)	3.33±0.08	3.27±0.27	3.37±0.22	2.74±0.19	1.21	0.30	2.37	0.13
CHOL (mg/dL)	81.82±2.30	93.81±3.40 _a	76.86±1.68	101.73±3.05 _{bc}	0.31	0.58	47.23	<0.01
GLUC (mg/dL)	123.68±5.51	124.39±7.85	118.45±7.37	134.53±7.18	0.11	0.74	1.27	0.27
UREA (mg/dL)	59.93±2.59	66.97±1.79	30.36±5.74 _a	63.45±2.18 _b	18.70	<0.01	27.51	<0.01
CREAT (mg/dL)	0.77±0.04	0.59±0.03 _a	0.41±0.05 _a	0.55±0.04 _b	21.34	<0.01	0.23	0.63
UA (g/dL)	5.26±0.23	5.33±0.28	4.43±0.14 _a	5.33±0.30 _b	3.02	0.09	3.98	0.05
SOD (U/mL)	28.88±3.29	32.65±3.46	23.46±3.22	34.10±1.37	0.49	0.49	6.48	0.01
CAT (nmol/min/mL)	15.75±1.25	19.99±1.69 _a	11.99±1.28 _a	22.17±1.01 _b	0.37	0.55	30.89	<0.01
GSH (µM)	25.87±5.31	20.51±2.61	18.96±2.20	25.36±1.89	0.09	0.76	0.02	0.87

a: P<0.05 in relation to DCt for the same variable; *b:* P<0.05 in relation to DM for the same variable; *c:* P<0.05 in relation to NCt for the same variable.

Table 2. Descriptive and parametrical statistics results to total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLOB), cholesterol (CHOL), glucose (GLUC), urea, creatinine (CREAT), uric acid (UA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and total glutathione (GSH) expressed in mean±SEM for rats submitted to the main effects on time of day and exercise.

	CONTROL GROUPS		EXERCISED GROUPS		EXERCISE EFFECT		TIME OF DAY EFFECT	
	DCt	NCt	DEx	NEx	F	P	F	P
TP (g/dL)	5.81±0.05	5.73±0.06	5.45±0.04 _a	5.69±0.05 _b	16.03	<0.01	2.27	0.14
ALB (g/dL)	2.64±0.11	2.85±0.14	2.78±0.12	3.02±0.13	1.41	0.24	2.90	0.95
GLOB (g/dL)	3.33±0.08	3.27±0.27	2.69±0.13	2.76±0.08	11.21	<0.01	<0.01	0.96
CHOL (mg/dL)	81.82±2.30	93.81±3.40 _a	77.17±1.60 _a	88.95±1.61 _b	4.42	0.04	27.61	<0.01
GLUC (mg/dL)	123.68±5.51	124.39±7.85	105.77±5.15	107.41±5.77	7.69	<0.01	0.03	0.85
UREA (mg/dL)	59.93±2.59	66.97±1.79 _a	68.41±2.17 _a	78.25±1.99 _{bc}	20.65	<0.01	15.04	<0.01
CREAT (mg/dL)	0.77±0.04	0.59±0.03 _a	0.99±0.10 _a	0.72±0.05 _b	8.90	<0.01	13.35	<0.01
UA (g/dL)	5.26±0.23	5.33±0.28	3.73±0.13 _a	4.69±0.22 _b	25.42	<0.01	5.67	0.02
SOD (U/mL)	28.88±3.29	32.65±3.46	38.83±2.72 _a	25.32±1.51 _b	0.23	0.64	3.14	0.08
CAT (nmol/min/mL)	15.75±1.25	19.99±1.69	14.16±1.11 _a	21.55±1.09 _b	<0.01	0.98	20.98	<0.01
GSH (µM)	25.87±5.31	20.51±2.61	18.18±4.59	14.69±0.71	3.11	0.88	1.34	0.26

a: P<0.05 in relation to DCt for the same variable; *b:* P<0.05 in relation to DEx for the same variable; *c:* P<0.05 in relation to NCt for the same variable.

Table 3. Descriptive and parametrical statistics results to total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLOB), cholesterol (CHOL), glucose (GLUC), urea, creatinine (CREAT), uric acid (UA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and total glutathione (GSH) expressed in mean±SEM for rats that received melatonin and were submitted to time of day and exercise effects.

	CONTROL GROUPS		EXERCISED GROUPS		EXERCISE EFFECT		TIME OF DAY EFFECT	
	DM	NM	DME _x	NME _x	F	P	F	P
TP (g/dL)	5.70±0.05	5.53±0.21	5.71±0.07	5.44±0.06 ^{bc}	6.34	0.01	0.75	0.39
ALB (g/dL)	2.17±0.21	3.07±0.11 ^a	2.61±0.11	3.97±0.30 ^{bc}	11.78	<0.01	34.23	<0.01
GLOB (g/dL)	3.37±0.22	2.74±0.19	3.06±0.14	2.79±0.51	0.19	0.66	2.40	0.13
CHOL (mg/dL)	76.86±1.68	101.73±3.05 ^a	77.39±1.86	91.15±1.44 ^{bc}	5.74	0.02	84.77	<0.01
GLUC (mg/dL)	118.45±7.37	134.53±7.18	105.05±6.73	98.67±6.37 ^c	11.88	<0.01	0.46	0.50
UREA (mg/dL)	30.36±5.74	63.45±2.18 ^a	70.33±1.97 ^a	86.29±3.11 ^{bc}	62.28	<0.01	37.98	<0.01
CREAT (mg/dL)	0.41±0.05	0.55±0.04 ^a	0.84±0.04 ^a	0.75±0.04 ^c	48.99	<0.01	0.37	0.54
UA (g/dL)	4.43±0.14	5.33±0.30 ^a	3.72±0.12 ^a	3.83±0.12 ^c	39.78	<0.01	8.21	<0.01
SOD (U/mL)	23.46±3.22	34.10±1.37 ^a	33.32±3.16	30.31±2.54	1.32	0.26	2.08	0.15
CAT (nmol/min/mL)	11.99±1.28	22.17±1.01 ^a	16.14±1.03 ^a	21.39±0.78 ^b	2.69	0.11	56.25	<0.01
GSH (μM)	18.96±2.20	25.36±1.89 ^a	18.81±2.17	7.35±0.84 ^{bc}	25.67	<0.01	1.99	0.17

a: P<0.05 in relation to DM for the same variable; *b*: P<0.05 in relation to DME_x for the same variable; *c*: P<0.05 in relation to NM for the same variable.

Comparing all exercised animals, melatonin increased tlim and tissue damage markers

Additionally, *tlim* analysis of variance to the four exercised groups (DEX, DMEx, NEx and NMEx) revealed time of day effect ($F = 14.07$; $p < 0.01$; $D < N$) and melatonin effect ($F = 9.25$; $p < 0.01$; $C < M$), being NMEx higher than all other groups ($P > 0.01$; figure 5d). Regarding tissue damage markers to such comparison, melatonin increased CK-MM ($F = 9.43$; $P < 0.01$; figure 5a) and LDH ($F = 5.26$; $P = 0.02$; figure 5b), with no melatonin influence on CK-MB ($F = 1.43$; $P = 0.23$). Animals assessed at night period (NEx and NMEx) showed higher CK-MM ($F = 27.26$; $P < 0.01$), CK-MB ($F = 25.46$; $P < 0.01$) and LDH ($F = 42.23$; $P < 0.01$) when compared to daily evaluated animals (DEX and DMEx). Post Hoc data are showed at figure 5.

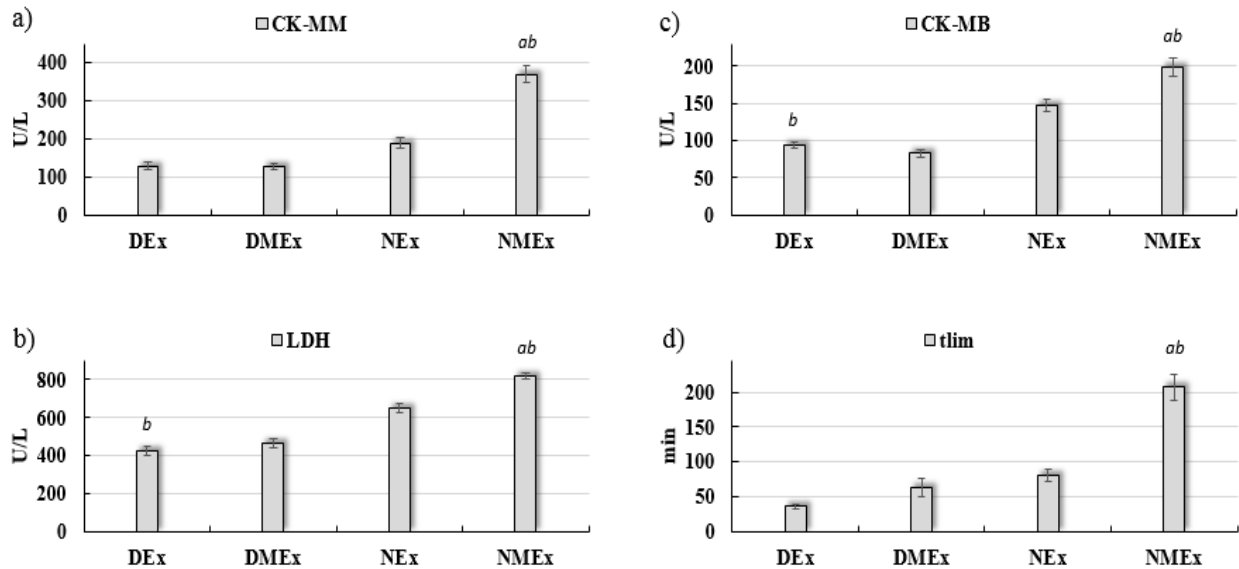


Figure 5. Mean \pm SEM and post hoc results of skeletal muscle creatine kinase (CK-MM; figure 5a), lactate dehydrogenase (LDH; figure 5b), cardiac muscle creatine kinase (CK-MB; figure 5c) and time to exhaustion at maximal aerobic capacity intensity (*tlim*; figure 5d) to exercised groups assessed during daily period (DEX with placebo and DMEx under melatonin effect) and night period (NEx with placebo and NMEx under melatonin effect). *a*: $P < 0.05$ in relation to DMEx for same variable; *b*: $P < 0.05$ in relation to NEx for same variable.

Resting blood lactate concentration was influenced by time of day and melatonin, but not after exercise

Resting blood lactate concentrations ([lac]rest) were correspondent to 0.93 ± 0.06 , 1.29 ± 0.09 , 1.47 ± 0.04 and 2.02 ± 0.18 mM to DEx, DMEx, NEx and NMEx, respectively, while blood lactate concentration immediately after exhaustive exercise ([lac]post) were correspondent to 7.01 ± 0.50 , 6.75 ± 0.34 , 6.93 ± 0.47 and 6.28 ± 0.61 mM to DEx, DMEx, NEx and NMEx, respectively. [lac]rest showed significant effect to time of day ($F = 33.28$; $p < 0.01$; $D < N$) and melatonin ($F = 17.32$; $P < 0.01$; $C < M$), being DEx $<$ all ($p < 0.05$) and NMEx $>$ all ($p < 0.05$). [lac]post outcomes leads to no time of day ($F = 0.29$; $p = 0.59$) and melatonin effects ($F = 0.80$; $p = 0.37$), resulting in no differences among groups ($p > 0.05$).

DISCUSSION

The main finds of this study were that melatonin aids as ergogenic to proposed exercise, however, did not prevented skeletal muscle and systemic inflammation and tissue damage promoted by the proposed exercise. Therefore, the initial hypothesis was only partially accepted, once the preventive effect of melatonin to exercised animals was not found, certainly due to its massive ergogenic effect and the proposed exercise features.

As cited in introduction section, well documented is that intensity and duration of exercise influence a considerable number of physiological variables. Such statement was enforced in our experiment once $\dot{V}_{O_{2max}}$ leads to modulations in almost all studied parameters and seems to be more expressive to higher times to exhaustion (Table 2 and 3). To investigate local inflammation from

exercise effect, we quantified proteins that comprehend the master controllers of inflammation (Kramer and Goodyear, 2007), the IKK and I κ B, responsible to the activity of the transcription factor κ B (NF κ B). NF- κ B is the key regulator of many biological systems and is related to link physiology to pathology when over activated, being its molecular pathway considered the main inflammatory feedback in the body (Hayden and Ghosh, 2012). Activation of NF- κ B depends on its translocation to cellular nucleus, where acts as pleiotropic, influencing a large number of genes (Hayden and Ghosh, 2012). During resting status, NF- κ B is sequestered in cytosolic ambient by κ B inhibitors (I κ B) (Baldwin, 1996), the main inflammatory protein detected in skeletal muscle of adult rats (Ji et al., 2004). So, high I κ B content is interpreted as an anti-inflammatory parameter (Schreck et al., 1992). Stimuli as high cytosolic calcium concentration (Altamirano et al., 2012) and cytokines (Hayden and Ghosh, 2012; Oeckinghaus and Ghosh, 2009) promotes I κ B kinases (pIKK) phosphorylation, which are responsible to disconnect I κ B α of NF- κ B, eliciting its nuclear translocation and consequently increasing inflammation (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). At this manner, disconnected I κ B α suffer ubiquitination and consequently decreased content of this protein is found. IKK and I κ B phosphorylation is exercise-increased in adult rat skeletal muscle, which invariably leads to local NF- κ B activity (Ji et al., 2004; Beck et al., 2014) and inflammatory feedback activation (Szczepanik, 2007).

To animals not submitted to exercise (experiment 1), melatonin did not modulate local or systemic inflammatory parameters (pIKK β , I κ B α , WBC and LYMP) but decrease skeletal muscle tissue damage marker (CK-MM, figure 2b), creatinine and urea (table 1), showing its protective features as found at literature (Veneroso et al., 2009; Alonso et al., 2006; Maldonado et al., 2012). However, the main contribution of our study was the interesting results regarding inflammatory

and tissue damage markers in animals exercised until exhaustion at light and dark periods under placebo compared to melatonin condition.

Despite the ergogenic effect of single melatonin dose before acute exercise remains controversial at literature (Mero et al., 2006; Maldonado et al., 2012), our study found significant enhanced performances to animals that received this hormone when comparing to placebo swimming adult rats (figure 3c and 3c). As described, melatonin presents anti-inflammatory function and anti-muscle damage effect (Alonso et al., 2006; Veneroso et al., 2009; Maldonado et al., 2012) and performance could be impaired by inflammation and tissue damage (Robson-Ansley et al., 2004; Baldwin Lanier, 2003; Warren et al., 2001). However, our results deny this statement to exhaustive aerobic exercise once systemic inflammation and tissue damage promoted in exercised animals of experiment 3 (all received melatonin) were virtually higher than animals from experiment 2 (no melatonin). CK-MM increased 151.6% in NEx animals when compared to NCt, but this outcome to NMEx was 324.05% higher than NM. Neutrophils, acute exercise-induced inflammation marker, increased 90.68% in NEx vs NCt, but was 180.29% higher in NMEx than NM. NMEx swam 126 minutes (155.84%) more than NEx to the same intensity due to massive melatonin ergogenic effect, then, it is clear that higher inflammation and tissue damage were found in animals that swam longer. So, we introduced this paradoxical melatonin effect on adults swimming rats exercised until exhaustion at maximal aerobic capacity intensity. Melatonin enhanced performance but over the inflammation and cardiac and skeletal muscle damaging. Despite partially denies our initial hypothesis, high inflammation and tissue damage are also found marathon and ultramarathon athletes and the relationship between performance and tissue damage and inflammation remains under investigation (Waskiewicz et al., 2012; Millet et al., 2012).

Generally interpreting all the physiological, metabolic, oxidative, inflammatory and tissue damage markers assessed in our study and presented in all figures and tables, the exercise duration enhanced by melatonin effect leads to the more expressive alterations found. Our results suggested that the ergogenic effect of melatonin was significantly stronger than its protective effect to proposed exercise, being the exercise duration responsible to mask the protective melatonin effect. Future studies should be addressed to better understand the mechanistic of melatonin ergogenic effect and its role as anti-inflammatory, antioxidant and tissue damage preventive function to long duration aerobic exercises.

REFERENCES

- Alberti C. [Melatonin: the first hormone isolated from the pineal body]. *Farmaco Sci.* 13:604-5, 1958.
- Alonso M, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. *J Pineal Res.* 41:8-14, 2006.
- Altamirano F, Lopez JR, Henriquez C, Molinski T, Allen PD, Jaimovich E. Increased resting intracellular calcium modulates NF-kappaB-dependent inducible nitric-oxide synthase gene expression in dystrophic mdx skeletal myotubes. *J Biol Chem.* 287:20876-87, 2012.
- Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 14:649-83, 1996.

Baldwin Lanier A. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs following exercise-induced muscle injury. *Sports Med.* 33:177-85, 2003.

Beck WR, Campesan YS, Gobatto CA. Validity And Reliability Of Swimming Incremental Test To Estimate Maximum Aerobic Capacity Of Rats. *Med Sci Sports Exerc.* 46:942-943, 2014.

Bicer M, Akil M, Avunduk MC, Kilic M, Mogulkoc R, Baltaci AK. Interactive effects of melatonin, exercise and diabetes on liver glycogen levels. *Endokrynol Pol.* 62:252-6, 2011.

Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernandez C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Gutierrez-Cuesta J, Pallas M, Camins A, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res.* 45:302-11, 2008.

Carbajo-Pescador S, Steinmetz C, Kashyap A, Lorenz S, Mauriz JL, Heise M, Galle PR, Gonzalez-Gallego J, Strand S. Melatonin induces transcriptional regulation of Bim by FoxO3a in HepG2 cells. *Br J Cancer.* 108:442-9, 2013.

Chuang JI, Mohan N, Meltz ML, Reiter RJ. Effect of melatonin on NF-kappa-B DNA-binding activity in the rat spleen. *Cell Biol Int.* 20:687-92, 1996.

Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *J Pineal Res.* 56:371-81, 2014.

Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Zielinski MR, Groschwitz CM, Brown AS, Gangemi JD, Ghaffar A, Mayer EP. Curcumin effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292:R2168-73, 2007.

Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virag L, O'Connor M, Salzman AL, Szabo C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NF-kappaB activation. *FASEB J.* 12:685-93, 1998.

Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 26:203-34, 2012.

Ho RC, Hirshman MF, Li Y, Cai D, Farmer JR, Aschenbach WG, Witezak CA, Shoelson SE, Goodyear LJ. Regulation of IkappaB kinase and NF-kappaB in contracting adult rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 289:C794-801, 2005.

Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Steinhafel N, Vina J. Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J.* 18:1499-506, 2004.

Kaya O, Kilic M, Celik I, Baltaci AK, Mogulkoc R. Effect of melatonin supplementation on plasma glucose and liver glycogen levels in rats subjected to acute swimming exercise. *Pak J Pharm Sci.* 23:241-4, 2010.

Kramer HF, Goodyear LJ. Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985).* 103:388-95, 2007.

Liang R, Nickkholgh A, Hoffmann K, Kern M, Schneider H, Sobirey M, Zorn M, Buchler MW, Schemmer P. Melatonin protects from hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and modification of cell proliferation. *J Pineal Res.* 46:8-14, 2009.

Maldonado MD, Manfredi M, Ribas-Serna J, Garcia-Moreno H, Calvo JR. Melatonin administrated immediately before an intense exercise reverses oxidative stress, improves immunological defenses and lipid metabolism in football players. *Physiol Behav.* 105:1099-1103, 2012.

Mazepa RC, Cuevas MJ, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Sci.* 66:153-60, 2000.

Mero AA, Vahalummukka M, Hulmi JJ, Kallio P, von Wright A. Effects of resistance exercise session after oral ingestion of melatonin on physiological and performance responses of adult men. *Eur J Appl Physiol.* 96:729-39, 2006.

Millet GY, Hoffman MD, Morin JB. Sacrificing economy to improve running performance--a reality in the ultramarathon? *J Appl Physiol (1985).* 113:507-9, 2012.

Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a000034, 2009.

Ozdemir O, Ozdem S, Ozkaya YG. Melatonin administration does not alter muscle glycogen concentration during recovery from exhaustive exercise in rats. *Eur J Sport Sci.* 13:174-182, 2013.

Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho-Filho MA, Moraes JC, De Souza CT, Velloso LA, Carvalheira JB, Saad MJ. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *J Physiol.* 586:659-71, 2008.

Phillipson OT. Management of the aging risk factor for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 35:847-57, 2014.

Robson-Ansley PJ, de Milander L, Collins M, Noakes TD. Acute interleukin-6 administration impairs athletic performance in healthy, trained male runners. *Can J Appl Physiol.* 29:411-8, 2004.

Sasaki M, Jordan P, Joh T, Itoh M, Jenkins M, Pavlick K, Minagar A, Alexander SJ. Melatonin reduces TNF-a induced expression of MAdCAM-1 via inhibition of NF-kappaB. *BMC Gastroenterol.* 2:9, 2002.

Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun.* 17:221-37, 1992.

Szczepanik M. Melatonin and its influence on immune system. *J Physiol Pharmacol.* 58 Suppl 6:115-24, 2007.

Teodoro BG, Baraldi FG, Sampaio IH, Bomfim LH, Queiroz AL, Passos MA, Carneiro EM, Alberici LC, Gomis R, Amaral FG, Cipolla-Neto J, Araujo MB, Lima T, Akira Uyemura S, Silveira LR, Vieira E. Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. *J Pineal Res.* 2014.

Veneroso C, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J, Collado PS. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *J Pineal Res.* 47:184-91, 2009.

Warren GL, Ingalls CP, Lowe DA, Armstrong RB. Excitation-contraction uncoupling: major role in contraction-induced muscle injury. *Exerc Sport Sci Rev.* 29:82-7, 2001.

Waskiewicz Z, Klapcinska B, Sadowska-Krepa E, Czuba M, Kempa K, Kimsa E, Gerasimuk D. Acute metabolic responses to a 24-h ultra-marathon race in male amateur runners. *Eur J Appl Physiol.* 112:1679-88, 2012.

9 . CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso na determinação do nadir e acrofase da atividade física espontânea dos animais e da intensidade de esforço correspondente a máxima capacidade aeróbia tornam robustas as conclusões desta tese, uma vez que os parâmetros para determinação do horário de aplicação das intervenções e da intensidade para exercício físico foram sistematizados e proveram parâmetros objetivos que tornam possível a replicação do experimento em sua plenitude.

O modelo de exercício físico proposto conduziu os animais a condições semelhantes aquelas encontradas em competições de longa duração, promovendo significativas manifestações fisiológicas relatadas ao longo dos capítulos 5 e 6. Para esta condição de esforço, a melatonina apresentou significativo efeito ergogênico após aplicação aguda de 10mg.Kg^{-1} 30 minutos antes do exercício físico iniciado na acrofase da atividade espontânea. Apesar de melhora representativa da performance quando a droga foi administrada no nadir da atividade espontânea, tal diferença não foi estatisticamente significativa, mostrando que o efeito ergogênico da melatonina foi horário-dependente para ratos adultos com hábitos noturnos.

Observando generalizadamente os parâmetros inflamatórios teciduais e sistêmicos, além dos marcadores de lesão tecidual muscular esquelética e cardíaca, de estresse oxidativo e metabólicos, os animais não submetidos ao exercício vivenciaram os efeitos positivos da melatonina, conforme se encontra na literatura. Conforme esperado, os animais exercitados apresentaram elevados índices de inflamação e lesão tecidual, contudo, este quadro foi amplificado nos animais que receberam melatonina. Apesar de ser um resultado inicialmente inesperado, torna-se plausível após associá-lo ao massivo efeito ergogênico da melatonina. A administração de melatonina promoveu maior tempo de contração muscular e conseqüentemente maior inflamação e dano tecidual. Este

cenário é apresentado na figura abaixo, que associa o exercício físico proposto nesta tese com a administração de melatonina sobre o processo de inflamação e dano tecidual.

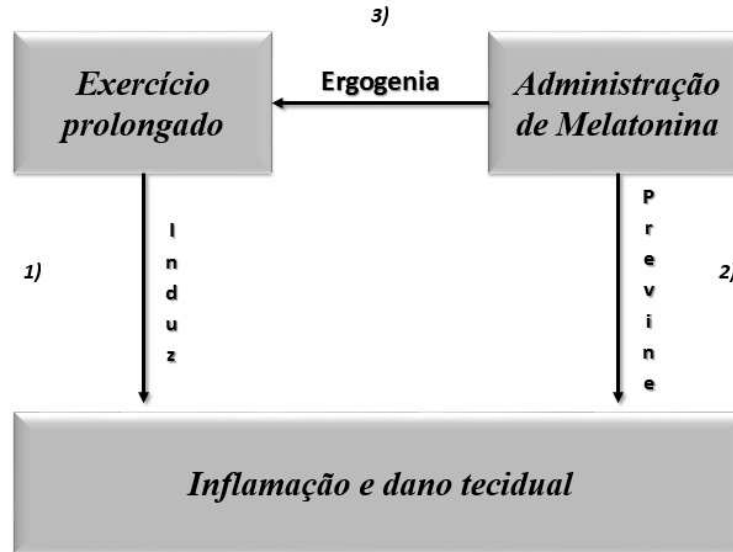


Figura 1. Esquema ilustrativo dos efeitos do exercício físico prolongado e da melatonina sobre o processo inflamatório e dano tecidual no músculo esquelético e cardíaco. 1) O exercício físico prolongado, como aplicado no experimento desta tese, induz a inflamação local e sistêmica e ao dano tecidual no músculo esquelético e cardíaco; 2) A literatura aponta que a melatonina possui ação preventiva sobre o processo inflamatório e dano tecidual e os resultados desta tese comprovaram em parte este cenário, uma vez que a melatonina promoveu melhores condições fisiológicas gerais, como apresentado no experimento 1 do capítulo 6; 3) A administração exógena da melatonina promoveu representativo efeito ergogênico, principalmente quando aplicado na acrofase da atividade física espontânea. Porém, este quadro promoveu maior tempo de contração muscular e conseqüentemente amplificou o processo inflamatório e dano tecidual.

Desta maneira, apesar de a hipótese 1 ter sido plenamente aceita, a segunda hipótese se limita a parcialidade uma vez que o efeito ergogênico da melatonina apenas foi estatisticamente significativo quando sua aplicação somada ao exercício físico se iniciou na acrofase da atividade

espontânea, momento de vigília dos animais. Já a terceira hipótese, baseada nas informações da literatura que apontavam efeito protetor da melatonina sobre o estresse oxidativo, inflamação e dano tecidual, foi plenamente rejeitada quando considerados apenas os animais exercitados. Este resultado pode ser explicado pelo modelo de exercício físico proposto nesta tese, que conduziu os animais à exaustão sob intensidade de máxima capacidade aeróbia individualmente determinada. A melatonina promoveu massiva ergogenia e conduziu os animais a um quadro extremo de esforço aeróbio que superou sua capacidade protetora sobre os parâmetros estudados.

10. REFERÊNCIAS

Alonso M, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. *J Pineal Res.* 41:8-14, 2006.

Andersen ML, D'almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, Tufik S. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. Universidade Federal de São Paulo, Gráfica Ave-Maria. 2004.

Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menéndez-Peláez A, Pablos MI, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res.* 16(2):100-112, 1994.

Alberti C. Melatonin: the first hormone isolated from the pineal body. *Farmaco Sci.* 13(8):604-605, 1958.

Antle MC, Sterniczuk R, Smith VM, Hagel K. Non-Photic Modulation of Phase Shifts to Long Light Pulses. *J Biol Rhythms.* 22(6):524-533, 2007.

Aschoff J. Adaptative cycles: their significance for defining environmental hazards. *Int J Biometeorol.* 11(3):225-278, 1967.

Aschoff J. *Endocrine Rhythms: Circadian rhythms: general features and endocrinological aspects.* Raven press, New York, 1-61, 1979.

Aschoff J. *Handbook of behavioral neurobiology, Vol. 4: Biological rhythms. Chapter 1: A survey on biological rhythms.* Plenum press, New York, 3-8, 1981.

Atkinson G, Holder A, Robertson C, Gant N, Drust B, Reilly T, Waterhouse J. Effects of melatonin on the thermoregulatory responses to intermittent exercise. *J Pineal Res.* 39(4):353-359, 2005.

Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science.* 131(1409):1312, 1960.

Axelrod J, Wurtman RJ, Snyder SH. Control of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the rat pineal gland by environmental light. *J Biol Chem.* 240(1):949-954, 1965.

Aygün D, Kaplan S, Odaci E, Onger ME, Altunkaynak ME. Toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review of melatonin and diclofenac sodium association. *Histol Histopathol.* 27(4):417-436, 2012.

Back FA, Fortes FS, Santos EHR, Tambelli R, Menna-Barreto LS, Louzada FM. Sincronização não-fótica: o efeito do exercício físico aeróbio. *Rev Bras Med Esporte.* 13(2)138-142, 2007.

Ballastela A, Pisano G, Iorio S, Pasquali D, Orio F, Venditto T, Sinisi AA. Endocrine secretions under abnormal light-dark cycles and in the blind. *Horm. Res.* 49:153-157, 1998.

Baldwin Lanier A. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs following exercise-induced muscle injury. *Sports Med.* 33:177-85, 2003.

Barchas J, DaCosta F, Spector S. Acute pharmacology of melatonin. *Nature.* 214(5091):919-920, 1967.

Baron B, Noakes TD, Dekerle J, Moullan F, Robin S, Matran R, Pelayo P. Why does exercise terminate at the maximal lactate steady state intensity? *Br J Sports Med.* 42:828-33, 2008.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso.* 3 Ed. Ed. Artmed, Porto Alegre- RS, 2008.

Beck WR, Araujo GG, Gobatto CA. Methods of exercise intensity and lactataemia determination of lactate minimum test in rats. *Comp Exerc Physiol.* 8:113-116, 2012.

Beck WR, Campesan YS, Gobatto CA. Validity And Reliability Of Swimming Incremental Test To Estimate Maximum Aerobic Capacity Of Rats. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 46:942-943, 2014.

Beneke R, von Duvillard SP. Determination of maximal lactate steady state response in selected sports events. *Med Sci Sports Exerc.* 28:241-6, 1996.

Beneke R, Hütler M, Leithäuser RM. Maximal lactate-steady-state independent of performance. *Med Sci Sports Exerc.* 32(6):1135-1139, 2000.

Berson DM, Dunn FA, Motoharu T. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science.* 295(5557):1070-1073, 2002.

Bharti VK, Srivastava RS, Malik JK, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Brown GM. Evaluation of blood antioxidant defense and apoptosis in peripheral lymphocytes on exogenous administration of pineal proteins and melatonin in rats. *J Physiol Biochem.* 68(2):237-245, 2012.

Bicer M, Akil M, Avunduk MC, Kilic M, Mogulkoc R, Baltaci AK. Interactive effects of melatonin, exercise and diabetes on liver glycogen levels. *Endokrynol Pol.* 62(3):252-256, 2011.

Biesiadecki BJ, Brand PH, Koch LG, Britton SL. A gravimetric method for the measurement of total spontaneous activity in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 222:65-69, 1999.

Bittman EL, Weaver DR. The distribution of melatonin binding sites in neuroendocrine tissues of the ewe. *Biol Reprod.* 43(6):986-993, 1990.

Bonnefont-Rousselot D, Collin F, Jore D, Gardès-Albert M. Reaction mechanism of melatonin oxidation by reactive oxygen species in vitro. *J Pineal Res.* 50(3):328-335, 2011.

Bosquet L, Leger L, Legros P. Methods to determine aerobic endurance. *Sports Medicine*. 32:675-700, 2002.

Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrangé P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci*. 26(8):412-419, 2005.

Brainard GC, Sliney D, Hanifin JP, Glickman C, Byrne B, Greenson JM, Jasser S, Gerner E, Rollag MD. Sensitivity of the human circadian system to short-wavelength (420 nm) light. *J Biol Rhythms*. 23(5):379–386, 2008.

Breslow ER, Phillips AJ, Huang JM, St Hilaire MA, Klerman EB. A mathematical model of the circadian phase-shifting effects of exogenous melatonin. *J Biol Rhythms*. 28(1):79-89, 2013.

Brzezinski, A. Melatonin in humans. *N Engl J Med*. 336(6):186-195, 1997.

Burgess HJ, Revell VL, Eastman CI. A three pulse phase response curve to three milligrams of melatonin in humans. *J Physiol*. 586(2):639-647, 2008.

Buxton OM, Frank SA, L'Hermite-Baleriaux M, Leproult R, Turek FW, Van Cauter E. Roles of intensity and duration of nocturnal exercise in causing phase delays of human circadian rhythms. *Am J Physiol*. 273(3 Pt 1):E536–E542, 1997.

Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernández C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Gutierrez-Cuesta J, Pallas M, Camins A, Rodríguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res*. 45(3):302–311, 2008.

Carbajo-Pescador S, Steinmetz C, Kashyap A, Lorenz S, Mauriz JL, Heise M, Galle PR, González-Gallego J, Strand S. Melatonin induces transcriptional regulation of Bim by FoxO3a in HepG2 cells. *Br J Cancer*. 108(2):442-449, 2013.

Card JP, Moore RY. Organization of lateral geniculate hypothalamic connections in the rat. *J Comp Neurol*. 284(1):135–147, 1989.

Carloni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini W. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxicischemic brain injury in rats. *J Pineal Res*. 44(2):157–164, 2008.

Carlson LL, Weaver DR, Reppert SM. Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinology*. 125(5):2670-2676, 1989.

Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *J Pineal Res*. 56:371-81, 2014.

Clough G. Environmental effects on animals used in biomedical research. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 57(Pt 3):487-523, 1982.

Daan S, Gwinner E. Jürgen Aschoff (1913-1998): obituary. *Nature*. 396:418, 1998.

Davis JM, Murphy EA, Carmichael M.D, Zielinski MR, Groschwitz CM, Brown AS, Gangemi JD, Ghaffar A, Mayer EP. Curcumin effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292:R2168-73, 2007.

Devavry S, Legros C, Brasseur C, Cohen W, Guenin SP, Delagrance P, Malpoux B, Ouvry C, Cogé F, Nosjean O, Boutin JA. Molecular pharmacology of the mouse melatonin receptors MT₁ and MT₂. *Eur J Pharmacol.* 29;677(1-3):15-21, 2012.

Di Bella G, Mascia F, Gualano L, Di Bella L. Melatonin anticancer effects: Review. *Int J Mol Sci.* 14:2410-2430, 2013.

Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, Deng MH. Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(5):1824–1828, 1994

Dubocovich ML, Masana MI, Jacob S, Sauri DM. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 355(3):365-375, 1997.

Dudley TE, DiNardo LA, Glass JD. Endogenous regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci.* 18(13):5045-5052, 1998.

Ecker JL, Dumitrescu ON, Wong KY, Alam NM, Chen SK, LeGates T, Renna JM, Prusky GT, Berson DM, Hattar S. Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision. *Neuron.* 67(1):49-60, 2010.

Edgar DM, Dement WC. Regularly scheduled voluntary exercise synchronizes the mouse circadian clock. *Am J Physiol.* 261(4 Pt 2):R928-R933, 1991.

Escames G, Ozturk G, Baño-Otálora B, Pozo MJ, Madrid JA, Reiter RJ, Serrano E, Concepción M, Acuña-Castroviejo D. Exercise and melatonin in humans: reciprocal benefits. *J Pineal Res.* 52(1):1-11, 2012.

Filgueiras MQ. Glândula Pineal: revisão da anatomia e correlações entre os marca-passos e fotoperíodos na sincronização dos ritmos circadianos. *HU revista, Juiz de Fora*, 32(2):47-50, 2006.

Fontana P, Boutellier U, Knopfli-Lenzin C. Time to exhaustion at maximal lactate steady state is similar for cycling and running in moderately trained subjects. *Eur J Appl Physiol*. 107:187-92, 2009.

Forbes-Robertson S, Dudley E, Vadgama P, Cook C, Drawer S, Kiduff L. Circadian disruptions and remedial interventions: effects and interventions for Jet Lag for athletic peak performance. *Sports Med*. 42(3):185-208, 2012.

Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz Muñoz M, David-Gray Z, Foster R. Regulation of mammalian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science*. 284(5413):502-504 1999.

Fuller PM, Lu J, Saper CB. Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms. *Science*. 320(5879):1074-1077, 2008.

Gander PH, Moore-Ede MC. Light-dark masking of circadian temperature and activity rhythms in squirrel monkeys. *Am J Physiol*. 245(6):R927-R934, 1983.

García-Mesa Y, Giménez-Llort L, López LC, Venegas C, Cristòfol R, Escames G, Acuña-Castroviejo D, Sanfeliu C. Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. *Neurobiol Aging*. 33(6):1124.e13-29, 2012.

Garland T Jr., Schutz H, Chappell MA, Keeney BK, Meek TH, Copes LE, Acosta W, Drenowatz C, Maciel RC, van Dijk G, Kotz CM, Eisemann JC. The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. *J Exp Biol* 214: 206-229, 2011.

Ghosh G, De K, Maity S, Bandyopadhyay D, Bhattacharya S, Reiter RJ, Bandyopadhyay A. Melatonin protects against oxidative damage and restores expression of GLUT4 gene in the hyperthyroid rat heart. *J Pineal Res.* 42(1):71–82, 2007.

Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 130:21-7, 2001.

Grossman GH, Mistlberger RE, Antle MC, Ehlen JC, Glass JD. Sleep deprivation stimulates serotonin release in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport.* 11(9):1929-1932, 2000.

Gurdjian ES. The diencephalon of the albino rat. Studies on the brain of the rat. *J Comp Neurol.* 43(1):1-114, 1927.

Halberg F, Engeli M, Hamburger C, Hillman D. Spectral resolution of low-frequency, small-amplitude rhythms in excreted 17-ketosteroids; probable androgen-induced circaseptan desynchronization. *Acta Endocrinol (Copenh).* 50(103):1-54, 1965.

Halberg F. Physiologic 24-hour periodicity; general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. *Int Z Vitaminforsch Beih.* 10:225-296, 1959.

Hara M, Abe M, Suzuki T, Reiter RJ. Tissue changes in glutathione metabolism and lipid peroxidation induced by swimming are partially prevented by melatonin. *Pharmacol Toxicol.* 78(5):308–312, 1996.

Hara M, Iigo M, Ohtani-Kaneko R, Nakamura N, Suzuki T, Reiter RJ, Hirata K. Administration of melatonin and related indoles prevents exercise-induced cellular oxidative changes in rats. *Biol Signals.* 6(2):90–100, 1997.

Harrington ME, Rahmani T, Lee CA. Effects of damage to SCN neurons and efferent pathways on circadian activity rhythms of hamsters. *Brain Res. Bull.* 5-6:655-669, 1993.

Hollander J, Fiebig R, Gore M, Ookawara T, Ohno H, Ji LL. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 442:426-34, 2001.

Huang H, Wang Z, Weng SJ, Sun XH, Yang XL. Neuromodulatory role of melatonin in retinal information processing. *Prog Retin Eye Res.* 32:64-87, 2013.

Ikeda M, Sagarab M, Inoué S. Continuous exposure to dim illumination uncouples temporal patterns of sleep, body temperature, locomotion and drinking behavior in the rat. *Neurosci. Lett.* 279:185-189, 2000.

Ikonomov OC, Stoynev AG, Shisheva AC. Integrative coordination of circadian mammalian diversity: neuronal networks and peripheral clocks. *Prog Neurobiol.* 54:87-97, 1998.

Janik D, Mikkelsen JD, Mrosovsky N. Cellular colocalization of Fos and neuropeptide Y in the intergeniculate leaflet after nonphotic phase-shifting events. *Brain Res.* 698(1-2):137-145, 1995.

Jasser SA, Blask DE, Brainard GC. Light during darkness and cancer: Relationships in circadian photoreception and tumor biology. *Cancer Causes Control.* 17(4):515-523, 2006.

Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrèze P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol.* 154(6):1182-95, 2008.

Johnson RF, Moore RY, Morin LP. Lateral geniculate lesions alter circadian activity rhythms in the hamster. *Brain Res Bull.* 22(2):411-422, 1989.

Johnson RF, Smale L, Moore RY, Morin LP. Lateral geniculate lesions block circadian phase-shift responses to benzodiazepine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83(14):5301–5304, 1988.

Kaya O, Kilic M, Celik I, Baltaci AK, Mogulkoc R. Effect of melatonin supplementation on plasma glucose and liver glycogen levels in rats subjected to acute swimming exercise. *Pak J Pharm Sci*. 23(3):241-244, 2010.

Kindermann W, Simon G, Keul J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 42:25-34, 1979.

Kireev RA, Tresguerres AC, Garcia C, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA. Melatonin is able to prevent the liver of old castrated female rats from oxidative and pro-inflammatory damage. *J Pineal Res*. 45(4):394–402, 2008.

Klein DC. Arylalkylamine-N-acetyltransferase, “time enzyme”. *J Biol Chem*. 282(7):4233-4237, 2007.

Kotz CM, Teske JA, Billington CJ. Neuroregulation of nonexercise activity thermogenesis and obesity resistance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 294:R699-710, 2008.

Lanfumeey L, Mongeau R, Hamon M. Biological rhythms and melatonin in mood disorders and their treatments. *Pharmacol Ther*. 138(2):176-84, 2013.

Lent R. Cem bilhões de neurônios – Conceitos fundamentais de neurociência, 2ª ed. Ed. Atheneu, Rio de Janeiro–RJ, 2010.

Lerner AB, Case JD, Heinzelmann RV. Structure of melatonin. *J Am Chem Soc*. 81(4):6084–6085, 1959.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee Y, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc.* 80(10):2587-2587, 1958.

Li J-H, Yu J-P, Yu H-G, Xu X-M, Yu L-L, Luo H-S. Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF κ B activation in rats with colitis. *Mediators Inflamm.* 31(4):185–193, 2005.

Maldonado MD, Manfredi M, Ribas-Serna J, Garcia-Moreno H, Calvo JR. Melatonin administered immediately before an intense exercise reverses oxidative stress, improves immunological defenses and lipid metabolism in football players. *Physiol Behav.* 105(5):1099-1103, 2012.

Masana MI, Benloucif S, Dubocovich ML. Circadian rhythm of mt1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus of the C3H/HeN mouse. *J Pineal Res.* 28(3):185-192, 2000.

Martin CK, Heilbronn LK, Jonge L, DeLany JP, Volaufova J, Anton SD, Redman LM, Smith SR, Ravussin E. Effect of calorie restriction on resting metabolic rate and spontaneous physical activity. *Obesity.* 15:2964-2973, 2007.

Mazepa RC, Cuevas MJ, Collado PS, González-Gallego J. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Sci.* 66(2):153-160, 2000.

Mazzucchelli C, Pannacci M, Nonno R, Lucini V, Fraschini F, Stankov BM. The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies. *Brain Res Mol Brain Res.* 39(1-2):117-126, 1996.

McGuire RA, Rand WM, Wurtman RJ. Entrainment of the body temperature rhythm in rats: Effect of color and intensity of environmental light. *Science,* 181(4103):956-957, 1973.

Mead S, Ebling FJ, Maywood ES, Humby T, Herbert J, Hastings MH. A nonphotic stimulus causes instantaneous phase advances of the light-entrainable circadian oscillator of the Syrian hamster

but does not induce the expression of c-fos in the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci.* 12(7):2516–2522, 1992.

Menaker M. Circadian rhythms. *Circadian Photoreception. Science.* 299(5604):213-214, 2003.

Mero AA, Vähälummukka M, Hulmi JJ, Kallio P, von Wright A. Effects of resistance exercise session after oral ingestion of melatonin on physiological and performance responses of adult men. *Eur J Appl Physiol.* 96(6):729-739, 2006.

Mistlberger RE, Landry GJ, Marchant EG. Sleep deprivation can attenuate light-induced phase shifts of circadian rhythms in hamsters. *Neurosci Lett.* 238(1-2):5-8, 1997.

Mistlberger RE, Skene DJ. Nonphotic entrainment in humans? *J Biol Rhythms.* 20(4):339-352, 2005.

Mistlberger RE. Circadian food anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 18(2):171-195, 1994.

Mistlberger RE. Scheduled daily exercise or feeding alters the phase of photic entrainment in Syrian hamsters. *Physiol Behav.* 50(6):1257-1260, 1991.

Mistlberger RE. Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol & Behav.* 104:535-545, 2011.

Mistlberger RE, Kent BA, Landry GJ. Phenotyping food entrainment: Motion sensors and telemetry are equivalent. *J Biol Rhythms,* 24:95-98, 2009.

Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42(1):201-206, 1972.

Moore RY, Heller A, Wurtman RJ. Visual pathway mediating pineal response to environmental light. *science.* 155(3739):220-223, 1967.

Mrosovsky N. A non-photoc gateway to the circadian clock of hamsters. *Ciba Found Symp.* 183:154-167, 1995.

Mrosovsky N. Locomotor activity and non-photoc influences on circadian clocks. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 71(3):343-372, 1996.

Nakamura Y, Tamura H, Takayama H, Kato H. Increased endogenous level of melatonin in human preovulatory follicles does not directly influence progesterone production. *Fertil Steril.* 80(4):1012–1016, 2003.

Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrange P, Canet E, Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* 275(40):31311-31317, 2000.

Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrange P, Canet E, Boutin JA. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol.* 61(11):1369-1379, 2001.

Ochoa JJ, Díaz-Castro J, Kajarabille N, García C, Guisado IM, De Teresa C, Guisado R. Melatonin supplementation ameliorates oxidative stress and inflammatory signaling induced by strenuous exercise in adult human males. *J Pineal Res.* 51(4):373-380, 2011.

Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a000034, 2009.

Özdemir Ö, Özdem S, Özkaya YG. Melatonin administration does not alter muscle glycogen concentration during recovery from exhaustive exercise in rats. *Eur J Sport Sci.* 13(2):174-182, 2013.

Paul P, Lahaye C, Delagrangre P, Nicolas JP, Canet E, Boutin JA. Characterization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Syrian hamster peripheral organs. *J Pharmacol Exp Ther.* 290(1):334-340, 1999.

Pereira SG, Oakley F. Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. *Int J Biochem Cell Biol.* 40:1425-30, 2008.

Phillipson OT. Management of the aging risk factor for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 35:847-57, 2014.

Powers SK, Nelson WB, Hudson MB. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radic Biol Med.* 51(5):942-950, 2011.

Provencio I, Cooper HM, Foster RG. Retinal projections in mice with inherited retinal degeneration: implications for circadian photoentrainment. *J Comp Neurol.* 395(4):417-439, 1998.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, White LE. *Neurociências.* 4 Ed. Ed. Artmed, Porto Alegre – RS, 2010.

Quay WB. Circadian rhythm of rat pineal serotonin and its modification by estrous cycle and photoperiod. *Gen Comp Endocrinol.* 3(5):473-479, 1963.

Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science.* (247):975-978, 1990.

Reebs SG, Mrosovsky N. Large phase-shifts of circadian rhythms caused by induced running in re-entrainment paradigm: the role of pulse duration and light. *J Comp Physiol A.* 165(6):819-825, 1989.

- Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res.* 181:127-151, 2010.
- Reiter RJ, Tan DX, Gitto E, Sainz RM, Mayo JC, Leon J, Manchester LC, Vijayalaxmi, Kilic E, Kilic U. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol J Pharmacol.* 56(2):159-170, 2004.
- Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 17(2):273–285, 2003.
- Refinetti R. Variability of diurnality in laboratory rodents. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 192:701-14, 2006.
- Reppert SM. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms.* 12(6):528–531, 1997.
- Richter CP. Sleep and activity: their relation to the 24-hour clock. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 45:8-29, 1967.
- Richter CPA. Behavioristic study of the activity of the rat. *Comp Psychol Monog.* 1(2):56, 1922.
- Roberts JE, Hu DH, Wishart JF. Pulse radiolysis studies of melatonin and chloromelatonin. *J Photochem Photobiol B.* 42(2):125–132, 1998.
- Robson-Ansley PJ, de Milander L, Collins M, Noakes TD. Acute interleukin-6 administration impairs athletic performance in healthy, trained male runners. *Can J Appl Physiol.* 29:411-418, 2004.
- Rusak B, Zucker I. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev.* 59(3):449-526, 1979.

Schibler U, Ripperger J, Brown SA. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms*. 18(3):250–260, 2003.

Schmidt TM, Do MT, Dacey D, Lucas R, Hattar S, Matynia A. Melanopsin-positive intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: from form to function. *J Neurosci*. 31(45):16094-16101, 2011.

Schomerus C, Korf HW. Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann NY Acad Sci*. 1057:372-383, 2005.

Schwartz WJ, Reppert SM, Eagan SM, Moore-Ede MC. In vivo metabolic activity of the suprachiasmatic nuclei: a comparative study. *Brain Res*. 274(1):184-187, 1983.

Shida CS, Castrucci AML, Lamy-Freund MT. High melatonin solubility in aqueous medium. *J Pineal Res*. 16(4):198–201, 1994.

Silva MMA, Albuquerque AM, Araujo JF. Light-dark cycle synchronization of circadian rhythm in blind primates. *J. Circ. Rhythms*. 6(3):10, 2005.

Skene DJ, Papagiannidou E, Hashemi E, Snelling J, Lewis DF, Fernandez M, Ioannides C. Contribution of CYP1A2 in the hepatic metabolism of melatonin: studies with isolated microsomal preparations and liver slices. *J Pineal Res*. 31(4):333-342, 2001.

Skinner DC, Malpoux B. High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not Due To galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology*. 140(10):4399–4405, 1999.

Solberg LC, Horton TH, Turek FW. Circadian rhythms and depression: effects of exercise in an animal model. *Am J Physiol*. 276:R152-61, 1999.

Srinivasan V, Lauterbach EC, Ho KY, Acuña-Castroviejo D, Zakaria R, Brzezinski A. Melatonin in Antinociception: Its Therapeutic Applications. *Curr Neuropharmacol.* 10(2):167-178, 2012.

Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 69(6):1583–1586, 1995.

Sugden D. Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoforms mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J Neurochem.* 86(5):1308–1311. 2003.

Sun JH, Yaga K, Reiter RJ, Garza M, Manchester LC, Tan DX, Poeggeler B. Reduction in pineal N-acetyltransferase activity and pineal and serum melatonin levels in rats after their exposure to red light at night. *Neurosci Lett.* 149(1):56-58, 1993.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Hanes MA, Farley NJ. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci.* 65(23):2523–2529, 1999.

Tan DX, Pöeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett.* 70(1-2):65-71, 1993.

Tanaka H, Yanase M, Kanosue K, Nakayama T. Circadian variation of thermoregulatory responses during exercise in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 258:836-841, 1990.

Tardito D, Molteni R, Popoli M, Racagni G. Synergistic mechanisms involved in the antidepressant effects of agomelatine. *Eur Neuropsychopharmacol.* 22(3):S482-S486, 2012.

Tasdemir S, Samdanci E, Parlakpınar H, Polat A, Tasdemir C, Cengiz N, Sapmaz H, Acet A. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on the brains, testes, duodena and stomachs of rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 16(7):860-866, 2012.

Tegtbur U, Busse MW, Braumann KM. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 25:620-7, 1993.

Teodoro BG, Baraldi FG, Sampaio IH, Bomfim LH, Queiroz AL, Passos MA, Carneiro EM, Alberici LC, Gomis R, Amaral FG, Cipolla-Neto J, Araujo MB, Lima T, Akira Uyemura S, Silveira LR, Vieira E. Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. *J Pineal Res.* 57(2):155-167, 2014.

Teske JA, Billington CJ, Kuskowski MA, Kotz CM. Spontaneous physical activity protects against fat mass gain. *Int J Obes (Lond)* 36: 603-613, 2012.

Touitou Y. Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Exp Gerontol.* 36(7):1083-1100, 2001.

Turek FW. Effects of stimulated physical activity on the circadian pacemaker of vertebrates. *J Biol Rhythms.* 4(2):135-158, 1989.

Van Reeth O, Sturis J, Byrne MM, Blackman JD, Hermite-Baleriaux ML, Leproult R, Oliner C, Refetoff S, Turek FW, Van Cauter E. Nocturnal exercise phase delays circadian rhythms of melatonin and thyrotropin secretion in normal men. *Am J Physiol.* 266:E964–E974, 1994.

Veneroso C, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J, Collado PS. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *J Pineal Res.* 47:184-91, 2009.

von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 309(1):151–162, 2002.

Waldhauser F, Waldhauser M, Lieberman HR, Deng MH, Lynch HJ, Wurtman RJ. Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinology.* 39(4):307-313, 1984.

Warren GL, Ingalls CP, Lowe DA, Armstrong RB. Excitation-contraction uncoupling: major role in contraction-induced muscle injury. *Exerc Sport Sci Rev.* 29:82-87, 2001.

Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol.* 72:551-577, 2010.

Wever RA. The circadian system of man: results of experiments under temporal isolation. *Topics in environmental physiology and medicine.* Springer-Verlag, New York, 1979.

Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S, Melan MA. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* 72(20):2183-2198, 2003.

Yamanaka Y, Honma K-I, Hashimoto S, Takasu N, Miyazaki T, Honma S. Effects of physical exercise on human circadian rhythms. *Sleep Biol Rhythms.* 4(3):199–206, 2006.

Yeleswaram K, McLaughlin LG, Knipe JO, Schabdach D. Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. *H Pineal Res.* 22(1):45-51, 1997.

Yu HS, Yee RW, Hawes KA, Reiter RJ. Diurnal rhythms of immunoreactive melatonin in the aqueous humor and serum of male pigmented rabbits. *Neurosci Lett.* 116(3):309–314, 1990.

Zawilska JB, Nowak JZ. Melatonin: from biochemistry to therapeutic applications. *Pol J Pharmacol.* 51:3–23, 1999.

Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, Ives JR, Dollins AB, Morabito C, Matheson JK, Schomer DL. Sleep-inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clin Pharmacol Ther.* 57(5):552-558, 1995.

Zhong M, Xue ZG, Cang J, Wu W, Huang JF, Zhu DM. Protective effect of melatonin on reexpansion pulmonary edema in rats model. *Chin Med J (Engl).* 126(3):500-504, 2013.

Zurowski D, Nowak L, Machowska A, Wordliczek J, Thor PJ. Exogenous melatonin abolishes mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia in neuropathic pain. The role of the opioid system and benzodiazepine-gabaergic mechanism. *J Physiol Pharmacol.* 63(6):641-647, 2012.

11. ANEXO

11.1. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICO NO USO DE ANIMAIS



UNICAMP



CEUA/Unicamp


Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "RESPOSTA ERGOGÊNICA DA MELATONINA E SUAS CONSEQUÊNCIAS NO RITMO CIRCADIANO E NA ATIVIDADE DA VIA IKK/NF-kB" (protocolo nº 2502-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto / Wladimir Rafael Beck, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 15 de agosto de 2011.

Campinas, 15 de agosto de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>