

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

VINÍCIUS SILVA FARIA

ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE MELATONINA NA  
PERFORMANCE E RECUPERAÇÃO METABÓLICA  
APÓS ESFORÇO EXAUSTIVO: UMA INVESTIGAÇÃO  
SOBRE O METABOLISMO INTERMEDIÁRIO.

São Carlos – SP  
2021

VINÍCIUS SILVA FARIA

ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE MELATONINA NA PERFORMANCE E RECUPERAÇÃO  
METABÓLICA APÓS ESFORÇO EXAUSTIVO: UMA INVESTIGAÇÃO SOBRE O  
METABOLISMO INTERMEDIÁRIO.

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Vinicius Silva Faria, realizada em 10/09/2021.

#### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck (UFSCar)

Prof. Dr. Pedro Paulo Menezes Scariot (UNICAMP)

Prof. Dr. Gustavo Gomes de Araujo (UFAL)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCar)  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)  
Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF)  
Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico (LAFEEEx)  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF)

## APOIO FINANCEIRO



Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 2019/08148-3) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; 88882.426921/2019-01).

Dedico este trabalho a toda minha família, por sempre apoiarem minhas escolhas  
e se fazerem presentes em minha trajetória, me concedendo  
amor, carinho e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus, por sempre me abençoar e guiar em minhas tomadas de decisões. Se não fosse Deus, nada disso seria possível

Ao Professor Doutor Wladimir Rafael Beck devo minha eterna gratidão. Gostaria de agradecê-lo especialmente pela oportunidade, dedicação e paciência em me ensinar os caminhos necessários para iniciar minha jornada frente a carreira acadêmica. Poderia escrever páginas e páginas de agradecimento, no entanto, não seria suficiente para expressar tamanha gratidão, admiração e respeito. Deixo aqui meus agradecimentos pela admirável orientação, educação e amizade. Inestimável gratidão estará sempre presente pela confiança a mim depositada e pelos ensinamentos relacionados a pesquisa científica e a vida.

Ao Professor Doutor Gleuber Henrique Marques de Oliveira por despertar meu interesse na pesquisa científica, pela confiança dispendida e conhecimento compartilhado, tornando possível meu acesso ao LAFEEEx. Agradeço também pelo auxílio em momentos de dificuldade durante a graduação e principalmente ao longo do mestrado, no qual, mesmo à distância, não hesitou em momento algum em fornecer ajuda e novamente compartilhar seu conhecimento comigo.

Aos Professores Doutores Gustavo Gomes de Araújo e Pedro Paulo Menezes Scariot pelas consideráveis observações por ocasião da comissão avaliadora no processo de defesa desta dissertação de mestrado. Agradeço também pelas consideráveis contribuições como coautores dos artigos inseridos nesta dissertação. Tenho plena certeza que o conhecimento de vocês compartilhado comigo, foram e serão determinantes para minhas conquistas.

Ao Professor Cláudio Alexandre Gobatto por conceder os tanques para realização do exercício de natação com os ratos. A Professora Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo por disponibilizar suas instalações para a realização de grande parte dos procedimentos analíticos sobre as amostras biológicas desta dissertação. A Professora Anabelle Silva Cornachione pelo apoio e orientação prestada na técnica de imunofluorescência. Ao Professor Thiago Luiz de Russo por permitir acesso ao seu laboratório e consequentemente darmos sequência na técnica de imunofluorescência.

A todos meus professores, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas do LAFEEEx pela convivência sempre saudável e pelo apoio durante as coletas de dados dos experimentos desta dissertação. Lembranças valiosas ficarão guardadas sobre as noites privadas de sono devido aos experimentos durante o período noturno,

transcorrendo toda a madrugada. Sem vocês não seria possível a realização de todo este experimento.

Em especial, gostaria de agradecer a colega de laboratório e amiga Taciane Maria Melges Pejon, pelas incansáveis conversas relacionadas aos experimentos, auxílio durante as coletas e incentivo. Agradeço também por todo o carinho, amizade e companheirismo ao longo deste período e aos seus pais (Carlos e Sílvia) pelo acolhimento e cuidado sempre que preciso.

Aos meus pais, José Orlando de Faria e Mônica Cristina Silva Faria que sempre me apoiaram na busca pelos meus sonhos. Amo muito vocês e obrigado por me ajudar, aconselhar e conversar em todos os momentos de alegria, conquistas e tristezas. Obrigado por me prepararem para o mundo e me concederem oportunidades de vivenciar novas experiências. Agradeço também aos meus irmãos, João Paulo Silva Faria e João Vitor Silva Faria por sempre me incentivar a estudar e me tornar uma pessoa cada vez melhor.

Aos meus amigos e minha namorada que sempre me apoiaram, me escutaram em momentos difíceis e me permitiram momentos de lazer e divertimento, tornando minha trajetória mais leve e menos estressante. Minha sincera gratidão a cada um de vocês.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento da presente dissertação. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro em formato de bolsa de estudos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelos auxílios financeiros para participação de congressos e publicações.

## RESUMO

A melatonina é uma indolamina anfifílica, sintetizada principalmente pela glândula pineal. Evidências demonstram seu papel ergogênico em exercício aeróbio de longa duração, assim como seu papel modulador sobre o metabolismo energético. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da melatonina sobre a tolerância ao esforço, proteínas envolvidas ao metabolismo intermediário e seus substratos energéticos em ratos submetidos ao exercício exaustivo de natação em intensidade correspondente a máxima capacidade aeróbia. Foram avaliados 68 ratos *Wistar* divididos em 7 grupos: controle (Ct: n = 10), tratado com melatonina e eutanasiado 1 h (M1: n = 9) ou 3 h após os últimos procedimentos (M3: n = 9), grupo exercitado e eutanasiado 1 h (Ex1: n=10) ou 3 h após o teste de tempo limite (*t*lim) (Ex3: n = 10), tratado com melatonina, exercitado e eutanasiado 1 h (ME1: n = 10) ou 3 h após o *t*lim (ME3: n = 10). Após a adaptação ao meio líquido, foi realizado o teste incremental para determinação da intensidade de esforço correspondente a máxima capacidade aeróbia individual. Após 48 horas, os animais receberam solução veículo ou melatonina (10 mg.kg<sup>-1</sup>) e 30 minutos após foram submetidos ao *t*lim. Foi coletado sangue para análise da concentração de glicose e triglicerídeos; tecido muscular esquelético (glúteo máximo, gastrocnêmio vermelho e branco) para quantificação do conteúdo de glicogênio e triglicerídeos e sóleo para quantificação de GLUT4, FAT CD36 PGC-1 $\alpha$  e NRF-1; fígado para quantificação do conteúdo de glicogênio. Os dados foram apresentados em média  $\pm$  erro padrão, submetidos ao teste *t* student independente (*t*lim); teste de análise de variância (ANOVA) One-way (lactacidemia e % massa corporal); ANOVA Two-way (restante das análises) e post hoc de Newman-Keuls. Foi estabelecido um nível de significância de 5%. Os resultados foram divididos em capítulos 1 e 2. No capítulo 1, os animais tratados com melatonina apresentaram maior conteúdo de glicogênio muscular e GLUT4 quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ). Além disso, os animais tratados com melatonina demonstraram aumento na performance em relação aos animais tratados com solução veículo ( $p = 0,01$ ). Na presença de melatonina houve aumento do conteúdo de glicogênio 3 h após o esforço (ME3;  $p < 0,05$ ), enquanto que, na ausência de melatonina nenhuma diferença foi demonstrada (Ex3;  $p > 0,05$ ), possivelmente devido ao aumento de GLUT4 demonstrado pelos grupos ME1 e ME3 ( $p < 0,05$ ). Quanto ao conteúdo de triglicerídeos, houve aumento 1 h após o exercício na presença de melatonina (ME1;  $p < 0,05$ ), enquanto que na ausência do hormônio administrado este aumento ocorreu somente 3 h após o esforço (Ex3;  $p < 0,05$ ). No capítulo 2, os animais tratados com melatonina e exercitados apresentaram aumento na expressão de PGC-1 $\alpha$  e NRF-1 comparado com o controle ( $p < 0,05$ ). Em relação ao perfil lipídico, houve uma redução nos animais tratados com melatonina em comparação com os animais tratados com veículo ( $p < 0,05$ ). Enquanto que, para o conteúdo de glicogênio, houve aumento nos animais que receberam melatonina. Sendo assim, o presente estudo demonstrou que a administração de melatonina aumentou a disponibilidade de substratos glicídicos e GLUT4 no tecido muscular esquelético e promoveu maior tolerância ao exercício físico. Além disso, a melatonina acelerou a reposição dos substratos energéticos e aumentou GLUT4, FAT CD36 e PGC-1 $\alpha$  em músculo esquelético exercitado, melhorando o ambiente celular para futuros esforços, ao menos do ponto de vista bioenergético.

**Palavras chave:** Recurso Ergogênico. N-Acetil-5-Metoxitriptamina. GLUT4. FAT CD36. PGC-1 $\alpha$ . NRF-1.



## ABSTRACT

Melatonin is an amphiphilic indoleamine, mainly synthesized by the pineal gland. Evidences demonstrates its ergogenic role in long-term aerobic exercise, as well as its modulating role in energy metabolism. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of melatonin on exercise tolerance, proteins involved in intermediary metabolism and their energy substrates in rats submitted to exhaustive swimming exercise at an intensity corresponding to maximum aerobic capacity. Sixty-eight Wistar rats were evaluated, divided into 7 groups: control (Ct: n = 10), treated with melatonin and euthanized 1 h (M1: n = 9) or 3 h after the last procedures (M3: n = 9), exercised group and euthanized 1 h (Ex1: n = 10) or 3 h after the time to exhaustion test ( $t_{lim}$ ) (Ex3: n = 10), treated with melatonin, exercised and euthanized 1 h (ME1: n = 10) or 3 h after the  $t_{lim}$  (ME3: n = 10). After adaptation to the liquid environment, the incremental test was performed to determine the intensity of effort corresponding to the maximal individual aerobic capacity. After 48 hours, the animals received vehicle solution or melatonin ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and 30 minutes later they were submitted to  $t_{lim}$ . Blood was collected to analyze the concentration of glucose and triglyceride; skeletal muscle tissue (gluteus maximus, gastrocnemius red and white) to quantify the content of glycogen and triglyceride and soleus to quantify GLUT4, FAT CD36 PGC-1 $\alpha$ , and NRF-1; liver was collected for quantification of glycogen content. Data were presented as mean  $\pm$  standard error, submitted to the independent student  $t$  test ( $t_{lim}$ ); One-way analysis of variance (ANOVA) test (lactacidemia and % body mass); Two-way ANOVA (all other analyses) and Newman-Keuls post hoc. A significance level of 5% was established. The results were divided into chapters 1 and 2. In chapter 1, the animals treated with melatonin had higher content of muscle glycogen and GLUT4 when compared to the control ( $p < 0.05$ ). Furthermore, animals treated with melatonin showed an increase in performance compared to animals treated with vehicle solution ( $p = 0.01$ ). In the presence of melatonin, there was a significant increase in the glycogen content 3 h after exercise (ME3;  $p < 0.05$ ), while in the absence of melatonin no difference was demonstrated (Ex3;  $p > 0.05$ ), possibly due to GLUT4 increase demonstrated by ME1 and ME3 groups ( $p < 0.05$ ). Regarding the triglyceride content, there was an increase 1 h after exercise in the presence of melatonin (ME1;  $p < 0.05$ ), while in the absence of administered hormone, this increase occurred only 3 h after exercise (Ex3;  $p < 0, 05$ ). In chapter 2, the animals treated with melatonin and exercised showed increased expression of PGC-1 $\alpha$  and NRF-1 compared to the control ( $p < 0.05$ ). Regarding the lipid profile, there was a reduction in animals treated with melatonin compared to animals treated with vehicle ( $p < 0.05$ ). While, for the glycogen content, there was an increase in animals that received melatonin. Thus, the present study demonstrated that the administration of melatonin increased the availability of glycidic substrates and GLUT4 in skeletal muscle tissue and promoted greater tolerance to physical exercise. Furthermore, melatonin accelerated the replacement of energy substrates and increased GLUT4, FAT CD36 and PGC-1 $\alpha$  in exercised skeletal muscle, improving the cellular environment for future efforts, at least from a bioenergetic point of view.

**Keywords:** Ergogenic Aid. N-Acetyl-5-Methoxytryptamine. GLUT4. FAT CD36. PGC-1 $\alpha$ . NRF-1.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Mecanismo fótico de produção/inibição da melatonina.....	26
<b>Figura 2</b> – Via da biossíntese da melatonina.....	28
<b>Figura 3</b> – Mecanismos de ação da melatonina.....	30
<b>Figura 4</b> – Desenho experimental.....	38
<b>Figura 4</b> – Protocolo de adaptação ao meio líquido.....	39
<b>Figura 6</b> – Ilustração da lactacidemia e porcentagem da massa corporal (% MC) durante o teste incremental.....	40
<b>Figura 7</b> – Espectrofotômetro SpectraMax® i3.....	42
<b>Figura 8</b> – Sistema automatizado de microscopia epi fluorescente de alta resolução (ImageXpress® Micro).....	44
<b>Figura 9</b> – Chronological sequence of events that occurred during the experiments. Control group (Ct); rats treated with melatonin and euthanized 1 hour (M1) or 3 hours after the last procedures (M3); rats that exercised and were euthanized 1 hour (Ex1) or 3 hours after $t_{lim}$ (Ex3); rats that were treated with melatonin, exercised, and were euthanized 1 hour (ME1) or 3 hours after $t_{lim}$ (ME3). d: days; min: minutes.....	49
<b>Figura 10</b> – GLUT4 and FAT CD36 in skeletal muscles. Representative samples of laminin (green) with FAT CD36 (red) in the soleus skeletal muscle with immunofluorescence (A). Representative samples of laminin (red) with GLUT4 (green) in the soleus skeletal muscle with immunofluorescence (A) in the control group (Ct) and rats treated with melatonin and euthanized 1 hour (M1) or 3 hours after the last procedures group (M3). The white arrows indicate FAT CD36 and GLUT4 in the soleus skeletal muscle. The figures represent the means and standard errors of the FAT CD36 (B) and of the GLUT4 (C). <sup>a</sup> $p < 0.05$ with respect to Ct; <sup>b</sup> $p < 0.05$ with respect to M1 for the same parameter. For the illustration, an objective lens = 20x was used; bars = 20 $\mu$ m; zoom = 300 height and 300 width.....	54
<b>Figura 11</b> – GLUT4 and FAT CD36 in the skeletal muscle. Representative samples of laminin (green) with FAT CD36 (red) in the soleus skeletal muscle with immunofluorescence (A). Representative samples of laminin (red) with GLUT4 (green) in the soleus skeletal muscle with	

immunofluorescence (A) in rats that exercised and were euthanized 1 hour (Ex1) or 3 hours after *tlim* (Ex3) and rats that were treated with melatonin, exercised, and were euthanized 1 hour (ME1) or 3 hours after *tlim* (ME3). The white arrows indicate FAT CD36 and GLUT4 in the soleus skeletal muscle. The figures show the means and standard errors of FAT CD36 (B) and of GLUT4 (C). <sup>a</sup>p < 0.05 with respect to Ex1; <sup>b</sup>p < 0.05 with respect to Ex3; <sup>c</sup>p < 0.05 with respect to ME1 for the same parameter. For the illustration, objective lens = 20x was used; bars = 20 μm; zoom = 300 height and 300 width.....57

**Figura 12** – Chronological sequence of events occurred from 90 to 92 days old of the animals. At 90 days old, all animals were subjected to the incremental test (IT) to determine the intensity of effort corresponding to the individual maximal aerobic capacity (iMAC). During the IT, the stages were separated by 30 seconds intervals in which blood samples (25 μL) were collected. Afterward, the animals were submitted to the swimming exercise with increments of 0.5% of body mass (% BM) until exhaustion. 48 h later (rest period), the animals received melatonin (Mel and MEx groups: 10 mg.kg<sup>-1</sup>) or vehicle (NaCl 0.09%) and after 30 minutes they were submitted to the time to exhaustion test (*tlim*) at 100% of iMAC. The time to exhaustion was recorded and after 3 hours the animals were euthanized. min: minutes; i.p.: intraperitoneal.....68

**Figura 13** – Time to exhaustion, glycogen content in skeletal muscle and liver, and triglyceride content in skeletal muscle. The graphs represent the means and standard errors of the time to exhaustion (A) triglyceride content in gluteus maximus (B), red (C) and white (D) gastrocnemius, and glycogen content in the liver (E), gluteus maximus (F), red (G) and white (H) gastrocnemius in control rats (Ct), rats treated with melatonin (Mel), rats that were exercised (Ex), and rats that were treated with melatonin and exercised (MEx). <sup>a</sup>p < 0.05 with respect to Ct; <sup>b</sup>p < 0.05 with respect to Ex; <sup>c</sup>p < 0.05 with respect to Mel for the same parameter. mg: milligrams; g: grams; min: minutes.....73

**Figura 14** – NRF-1 and PGC-1α in skeletal muscles. Representative samples of laminin (green) with PGC-1α (red) in the soleus skeletal muscle with immunofluorescence (A). Representative samples of laminin (red) with NRF-1 (green) in the soleus skeletal muscle (A) with immunofluorescence in the control (Ct), rats treated with melatonin (Mel), rats that were exercised (Ex), and rats that were treated with melatonin and exercised (MEx). The white arrows indicate NRF-1 and PGC-1α in the soleus skeletal muscle. The figures represent the means and standard errors of the NRF-1 (B) and of the PGC-1α (C). <sup>a</sup>p < 0.05 with respect to Ct; <sup>b</sup>p < 0.05 with respect to Ex; <sup>c</sup>p < 0.05 with respect to Mel for the same parameter. For the

illustration, an objective lens = 20x was used; bars = 20  $\mu\text{m}$ ; zoom = 350 height and 350 width.....74

**Figura 15** – Efeito da melatonina sobre tecido muscular esquelético exercitado.....86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Administração exógena de melatonina em ratos, considerando dosagem, diluição e via de administração.....	33
<b>Tabela 2</b> - Data on the muscular glycogen and triglyceride content and blood glucose and triglyceride concentrations in the groups that were treated with the vehicle (Ct) or melatonin (M1 and M3) and euthanized 1 (M1) or 3 (M3) hours after the last procedures.....	53
<b>Tabela 3</b> - Data on the muscular glycogen and triglyceride content, as well as the blood glucose and triglyceride concentrations, in the exercised groups (Ex1, Ex3, ME1, and ME3), those treated with the vehicle (Ex1 and Ex3) or melatonin (ME1 and ME3), and those euthanized 1 (Ex1 and ME1) or 3 (Ex3 and ME3) hours after <i>t</i> <sub>lim</sub> .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E ABREVIACÕES

% MC: porcentagem da massa corporal  
μg: micrograma  
μL: microlitros  
3° V: terceiro ventrículo  
5HT: 5-hidroxitriptomina  
5-HTryp: 5-hidroxitriptofano  
a.C: antes de Cristo  
a.m.: ante meridiem  
AADC: descarboxilase aromática de aminoácido  
AANAT: arilalquilamina N-acetiltransferase  
AFMK: N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina  
AGL: ácidos graxos livres  
AMK : N1-acetil-5-metoxiquinuramina  
AMPc: adenosina monofosfato cíclico  
ASMT: N-acetilserotonina metiltransferase  
cm: centímetros  
CREB: proteína de ligação ao elemento responsivo a cAMP  
Ct: grupo controle  
d: dias  
DAG: diacilglicerol  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
EDTA: ácido nitrilotriacético  
Ex: grupo exercitado  
Ex1: grupo exercitado e eutanasiado 1 hora após o *tlim*  
Ex3: grupo exercitado e eutanasiado 3 horas após o *tlim*  
FAT CD36: transportador de ácido graxo CD36  
g: gramas  
GABA: ácido gama-aminobutírico  
GCS: gânglio cervical superior  
G<sub>ia2</sub>: receptor de membrana acoplado a proteína G<sub>ia2</sub>  
G<sub>ia3</sub>: receptor de membrana acoplado a proteína G<sub>ia3</sub>  
GLUT4: transportador de glicose tipo 4

GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina

GPCR: receptor acoplado a proteína G

G<sub>α16</sub>: receptor de membrana acoplado a proteína G<sub>α16</sub>

G<sub>αq/11</sub>: receptor de membrana acoplado a proteína G<sub>αq/11</sub>

G<sub>αs</sub>: receptor de membrana acoplado a proteína G<sub>αs</sub>

G<sub>αz</sub>: receptor de membrana acoplado a proteína G<sub>αz</sub>

h: hora

HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferase

i.p.: intraperitoneal

ILCC: células da coluna intermediolateral

IRS-1 / PI3K: substrato do receptor de insulina 1 / fosfatidil inositol 3 kinase

kg: quilograma

km: quilômetros

L: litro

LCR: líquido cefalorraquidiano

LDH: L-lactic dehydrogenase bovine heart

M1: grupo tratado com melatonina e eutanasiado 1 hora após os últimos procedimentos

M3: grupo tratado com melatonina e eutanasiado 3 horas após os últimos procedimentos

ME1: grupo tratado com melatonina, exercitado e eutanasiado 1 hora após o *flim*

ME3: grupo tratado com melatonina e exercitado e eutanasiado 3 horas após o *flim*

Mel: grupo tratado com melatonina

MEx: grupo tratado com melatonina e exercitado

mg/dL: miligrama/decilitro

mg: miligrama

min: minuto

mL: mililitro

ML1: classe de receptores de melatonina do tipo 1

ML2: classe de receptores de melatonina do tipo 2

mmol: milimol

MT1: receptor de melatonina do tipo 1

MT2: receptor de melatonina do tipo 2

MT3: receptor de melatonina do tipo 3 ou tipo quinona redutase

MTNR1A: receptor de melatonina do tipo 1 em humanos

MTNR1B: receptor de melatonina do tipo 2 em humanos

mV: milivolts

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: sulfato de sódio

NaCl: Cloreto de sódio ou solução salina

NAD: Beta-nicotinamide dinucleotide

NAS: N-acetilserotonina

nm: nanômetros

NPV: núcleo paraventricular

NRF-1: fator nuclear respiratório 1

NSQ: núcleos supraquiasmáticos

°C: Graus Celsius

p. m.: pós meridiano

PACAP: polipeptídeo ativador da adenilato ciclase hipofisária

PGC-1 $\alpha$ : Coativador  $\gamma$  do receptor ativado proliferador de peroxissomo

PI3: inositol trifosfato

PKA: protein kinase A

PLC: fosfolipase C

RHT: trato retino-hipotalâmico

ROR/RZR: receptor órfão relacionado ao ácido retinóico/receptor Z retinóide

ROR $\alpha$ : receptor órfão relacionado ao ácido retinóico  $\alpha$

ROR $\beta$ : receptor órfão relacionado ao ácido retinóico  $\beta$

ROR $\gamma$ : receptor órfão relacionado ao ácido retinóico  $\gamma$

RPM: rotações por minuto

RZR $\alpha$ : receptor Z retinóide  $\alpha$

RZR $\beta$ : receptor Z retinóide  $\beta$

TCA: ácido tricloroacético

TE: tamanho do efeito

TI: teste incremental

$t_{lim}$ : teste de tempo limite

TPH: triptofano 5-hidroxilase

Tryp: triptofano

VO<sub>2maX</sub>: VO<sub>2</sub> máximo

W: watts



## **LISTA DE SIGLAS**

AVMA - American Veterinary Medical Association

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

PIPGCF – Programa Interinstitucional em Ciências Fisiológicas Associação Ampla

UFSCar/UNESP

LAFEEEx – Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico

DCF – Departamento de Ciências Fisiológicas

CCBS – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>24</b>
4.1	GLÂNDULA PINEAL E HORMÔNIO DA NOITE.....	24
<b>4.1.1</b>	<b>Histórico e Visão Geral</b> .....	<b>24</b>
4.2	MELATONINA .....	25
<b>4.2.1</b>	<b>Visão Geral</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Estimulação da Pineal</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Biossíntese</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Ações Mediadas Por Receptores e Não Receptores</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Melatonina e Músculo Esquelético</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Melatonina Exógena</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2.7</b>	<b>Melatonina, Metabolismo e Exercício Físico Aeróbio</b> .....	<b>34</b>
<b>4.2.8</b>	<b>Catabolismo e excreção</b> .....	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>37</b>
5.1	AMOSTRA E CONDIÇÕES AMBIENTAIS.....	37
5.2	DESENHO EXPERIMENTAL.....	38
5.3	ADAPTAÇÃO AO MEIO LÍQUIDO.....	39
5.4	TESTE INCREMENTAL DE NATAÇÃO.....	40
5.5	TESTE DE TEMPO LIMITE.....	41
5.6	ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA.....	42
5.7	EUTANÁSIA, COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL BIOLÓGICO .....	42
<b>5.7.1</b>	<b>Sangue</b> .....	<b>42</b>
<b>5.7.2</b>	<b>Tecido Muscular Esquelético</b> .....	<b>43</b>
5.7.2.1	Glicogênio .....	43
5.7.2.2	Triglicerídeo muscular.....	43
5.7.2.3	Expressão de proteínas musculares .....	44
5.8	ANÁLISE E PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS .....	46
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
6.1	CAPÍTULO 1 .....	46
6.2	CAPÍTULO 2 .....	66

<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>87</b>
	<b>ANEXO – Certificado CEUA .....</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina, peso molecular 232,28), uma indolamina com característica anfifílica (Amaral et al., 2019) é produzida principalmente pela glândula pineal e diretamente liberada no sangue ou líquido cefalorraquidiano. Além disso, ela também é encontrada em vários órgãos extra pineais, incluindo cérebro, retina, fígado, trato gastrointestinal, coração, músculo esquelético, entre outros (Acuña-Castroviejo et al., 2014). Uma vez liberada na corrente sanguínea, a melatonina pode ser transportada livremente ou ligado à albumina até o cumprimento de sua função. Sendo assim, dentre as funções da melatonina, o papel regulador sobre os ritmos circadianos e sazonais está bem estabelecido (Reiter et al., 2010). Além disso, esta indolamina possui uma ampla gama de funções, incluindo propriedades antioxidantes (Reiter et al., 2016; Manchester et al., 2015; Galano et al., 2011, Rodriguez et al, 2004), melhorias ao sistema imunológico (Gunata et al., 2019), efeito anti-inflamatório (Mauriz et al., 2013), alterações do metabolismo energético (Cipolla-Neto et al., 2014), prevenção e/ou inibição do desenvolvimento do câncer (Zare et al., 2019; Li et al., 2017), tratamento de doenças neurológicas (esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doença de Huntington, Parkinson, enxaqueca, epilepsia, entre outras) (Gunata et al., 2019), diabetes (Sharma et al., 2015), distúrbios do sono (Xie et al., 2017), obesidade (Xu et al., 2016; Cipolla-Neto et al., 2014), entre outras.

Além dos benefícios mencionados acima, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado efeito ergogênico da melatonina ao exercício aeróbio exaustivo em animais noturnos (Beck et al., 2015, 2016). Apesar da consistência do efeito ergogênico da melatonina, as razões para a ocorrência desse fenômeno permanecem obscuras. Sendo assim, cabe estudar se a melatonina seria capaz de modular proteínas que possam estar relacionadas à tolerância ao exercício aeróbio e possivelmente acelerar a recuperação após esforço exaustivo. Mais especificamente, pouca atenção tem sido dada ao papel de algumas proteínas envolvidas com a homeostase metabólica, como por exemplo o Coativador  $\gamma$  do receptor ativado proliferador de peroxissomo (PGC-1 $\alpha$ ), proteína envolvida com o metabolismo lipídico, controle da homeostase metabólica, biogênese e função mitocondrial e regulação do substrato energético para o músculo esquelético (Bonen, 2009), assim como o fator nuclear respiratório 1 (NRF-1), responsável pela estimulação da atividade respiratória (beta oxidação, ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons), altamente envolvida na otimização e utilização de substratos energéticos (Kang et al., 2009). O PGC-1 $\alpha$  ainda induz a expressão de genes estimuladores da produção de proteínas transportadoras de substrato, como o GLUT4 e FAT CD36, respectivamente transportadores de

glicose (isoforma muscular) e ácidos graxos através da membrana (Benton et al., 2008), responsáveis por manter aporte energético ao tecido muscular esquelético durante o repouso e esforço físico.

O exercício físico depende diretamente de um intermediário metabólico, o trifosfato de adenosina (ATP) gerado a partir da transformação química de alguns substratos, principalmente carboidratos e lipídeos. No entanto, os estoques de ATP intramuscular são relativamente limitados (~5 mmol por kg de músculo úmido) sendo incapazes de sustentar a atividade contrátil por longos períodos (Hargreaves e Spriet, 2020). Provas de endurance de alto rendimento (triátlon, maratona, entre outras) dependem principalmente da oxidação de carboidratos como forma de energia, devido à alta intensidade (80 – 100% do  $VO_{2máx}$ ) e período prolongado (2 – 2:30 h) de esforço (Hargreaves e Spriet, 2020). No entanto, as reservas deste substrato são limitadas e ao reduzirem criticamente podem prejudicar a performance (Kenney et al., 2011). Com base nessas informações, além de ser importante estudar tais proteínas, é relevante avaliar o envolvimento destas com os substratos energéticos a fim de entender melhor como a melatonina seria capaz de aumentar a tolerância ao esforço físico e possivelmente acelerar o processo adaptativo e a recomposição dos substratos energéticos após o esforço.

Sendo assim, considerando o efeito ergogênico da melatonina em exercício aeróbio exaustivo (Beck et al., 2015, 2016) e seu papel modulador sobre o metabolismo energético (Mendes et al., 2013; Bicer et al., 2011; Kaya et al., 2010; Sánchez-Campos et al., 2001; Mazepa et al., 2000), torna-se relevante estudar a influência da administração aguda de melatonina sobre o metabolismo intermediário e seu papel sobre a tolerância ao esforço e na recuperação metabólica após exercício exaustivo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da melatonina sobre o metabolismo intermediário de ratos submetidos ao exercício exaustivo de natação em intensidade correspondente a máxima capacidade aeróbia.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da administração aguda de melatonina em ratos não exercitados e exercitados submetidos ao exercício exaustivo de natação em intensidade correspondente a máxima capacidade aeróbia sobre:

- a) performance física ( $t_{lim}$ ; teste de tempo limite);
- b) parâmetros séricos relacionados ao metabolismo energético (glicose e triglicerídeo);
- c) expressão de GLUT4, FAT CD36, PGC-1 $\alpha$  e NRF-1 em músculo esquelético oxidativo (sóleo);
- d) conteúdo de glicogênio em músculo esquelético (glúteo máximo, gastrocnêmio vermelho e branco) e fígado;
- e) conteúdo de triglicerídeos em músculo esquelético (glúteo máximo, gastrocnêmio vermelho e branco).

### **3 HIPÓTESES**

A administração aguda de melatonina aumentará a expressão de GLUT4, FAT CD36, PGC-1 $\alpha$  e NRF-1 em tecido muscular esquelético exercitado, reduzirá o conteúdo de triglicerídeos musculares e aumentará o conteúdo de glicogênio muscular e hepático. Também adicionamos a hipótese de que a melatonina permitirá maior tolerância ao exercício e melhor reposição de substratos energéticos após esforço exaustivo, propiciando um melhor ambiente celular para futuros esforços, ao menos do ponto de vista bioenergético.

## **4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 GLÂNDULA PINEAL E HORMÔNIO DA NOITE**

#### **4.1.1 Histórico e Visão Geral**

A glândula pineal ou epífise é uma glândula endócrina em formato ovoide e possui cerca de 0,8 cm de comprimento, pesando aproximadamente 0,1 g em indivíduos adultos. Por meio de uma secção coronal, observamos superiormente o corpo caloso, inferiormente os colículos inferiores e superiores, e supero lateralmente o plexo coroide do terceiro ventrículo (Ilahi e Ilahi, 2018). O líquido cefalorraquidiano banha a glândula através do recesso pineal. Além disso, sua vascularização é mediada por uma rede capilar que percorre pelas paredes da cápsula posterior e lateral, na qual apresenta fenestrações e ausência de barreira heme encefálica, facilitando assim a troca de substâncias entre o sistema circulatório e a glândula. Sua irrigação é realizada pela artéria pineal, ramo da coroidea posterior mediana e sua drenagem venosa principal é efetuada pela veia pineal, também chamada de veia talâmica póstero-mediana, veia epitalâmica ou veia látero epifisária, sendo tributária da veia de Galeno (Filgueiras, 2006).

Os primeiros estudos sobre a glândula pineal ocorreram cerca de 300 anos a.C. pelo anatomista Herophilus. No entanto, a primeira representação pictórica consistente da glândula pineal foi creditada a Andreas Vesalius (1512 - 1564) (Laios, 2017). Ainda, neste período a glândula pineal era associada mais a uma conjuntura filosófica do que a uma fundamentação científica. Sendo assim, mais tarde o filósofo Descartes (1594 - 1650) passava a creditar a glândula pineal como o ponto de contato entre a alma, o corpo e o local onde nossos pensamentos são formados (Shoja et al., 2015). Em 1850, partindo de um ponto de vista mais científico, Kolliker observou a presença de fibras nervosas na glândula pineal de mamíferos e, em 1904, Cajal encontrou muitas fibras nervosas ramificadas na glândula pineal de camundongo e sugeriu que eram de origem simpática (Erlich e Apuzzo, 1985). É bem conhecido pela literatura atual que, tais fibras simpáticas pós-ganglionares, advindas do gânglio cervical superior, são capazes de liberar neurotransmissores (principalmente a noradrenalina) nos espaços perivasculares atingindo em seguida a superfície dos pinealócitos, atuando sobre a regulação na síntese de um hormônio (Filgueiras, 2006), que mais tarde foi chamado de melatonina por Lerner et al. (1958).

Lerner et al. (1958) isolou pela primeira vez, na Universidade de Yale, 100 microgramas do hormônio melatonina através da preparação de extratos da glândula pineal de bovinos, onde foi aplicado sobre a pele de anfíbios, causando o clareamento da mesma. Devido à agregação da melanina aos melanócitos e a serotonina ser o precursor do hormônio, este por sua vez



recebeu o nome de melatonina (mela = melanina; tonina = serotonina: melatonina) (Reiter et al., 2010).

## 4.2 MELATONINA

### 4.2.1 Visão Geral

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (peso molecular: 232 kDa), é uma indolamina presente em qualquer compartimento do organismo devido suas características anfifílicas de difusão (hidrofílica e lipofílica) (Amaral e Cipolla-Neto, 2018). Em mamíferos, sua síntese ocorre em diversas células e tecidos, como: retina, cerebelo, pele, ovário, fígado, pâncreas, rins, entre outras (Mauriz et al., 2013; Galano et al., 2011), principalmente para utilização local, conferindo a ela ação intrácrina, parácrina e autócrina. Além disso, este hormônio é fornecido pela glândula pineal e diretamente liberada para o sangue e para o líquido cefalorraquidiano, podendo circular de forma livre ou ligada a albumina, atribuindo a ela ação endócrina (Cipolla-Neto, 2014).

Devido à presença deste hormônio em diversos compartimentos, assim como, uma variedade de funções elencadas pelo mesmo, o interesse de cientistas tem crescido consideravelmente alcançando o pico de publicações científicas no ano de 2020 (1808 publicações), encontradas na base de dados da maior ferramenta de busca do gênero, o *PubMed*. Quando completamente considerada a palavra “melatonina” (não apenas no título) obtivemos 28.360 publicações durante um período de 63 anos (1958 - 2021). Com base nestes resultados, espera-se que a melatonina possua uma grande variedade de funções descritas na literatura.

Neste cenário, o papel regulador da melatonina nos ritmos circadianos e sazonais está bem estabelecido (Reiter et al., 2010). Além do mais, existem evidências crescentes mostrando seu envolvimento em muitas outras finalidades. Atuando sobre uma ampla gama de funções, incluindo: propriedades antioxidantes (Reiter et al., 2016; Manchester et al., 2015; Galano et al., 2011, Rodriguez et al, 2004), melhorias ao sistema imunológico (Gunata et al., 2019), efeito anti-inflamatório (Mauriz et al., 2013), alterações do metabolismo energético (Cipolla-Neto et al., 2014), prevenção e/ou inibição do desenvolvimento do câncer (Zare et al., 2019; Li et al., 2017), tratamento de doenças neurológicas (esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doença de Huntington, Parkinson, enxaqueca, epilepsia, entre outras) (Gunata et al., 2019), diabetes (Sharma et al., 2015), distúrbios do sono (Xie et al., 2017), obesidade (Xu et al., 2016; Cipolla-Neto et al., 2014) e performance aeróbia em animais noturnos submetidos a exercício em seu período de vigília (Beck et al., 2015, 2016).

#### 4.2.2 Estimulação da Pineal

Na ausência de iluminação artificial, a síntese de melatonina é controlada conforme o ciclo geofísico claro escuro. Durante o período noturno observamos aumento na síntese e consequentemente liberação deste hormônio no líquido cefalorraquidiano e tecido sanguíneo. Enquanto que, em uma situação onde se apresenta alta incidência de luz, essa informação é captada pelo sistema ocular e em seguida é transmitida aos núcleos supraquiasmáticos (NSQ), inibindo a síntese de melatonina.

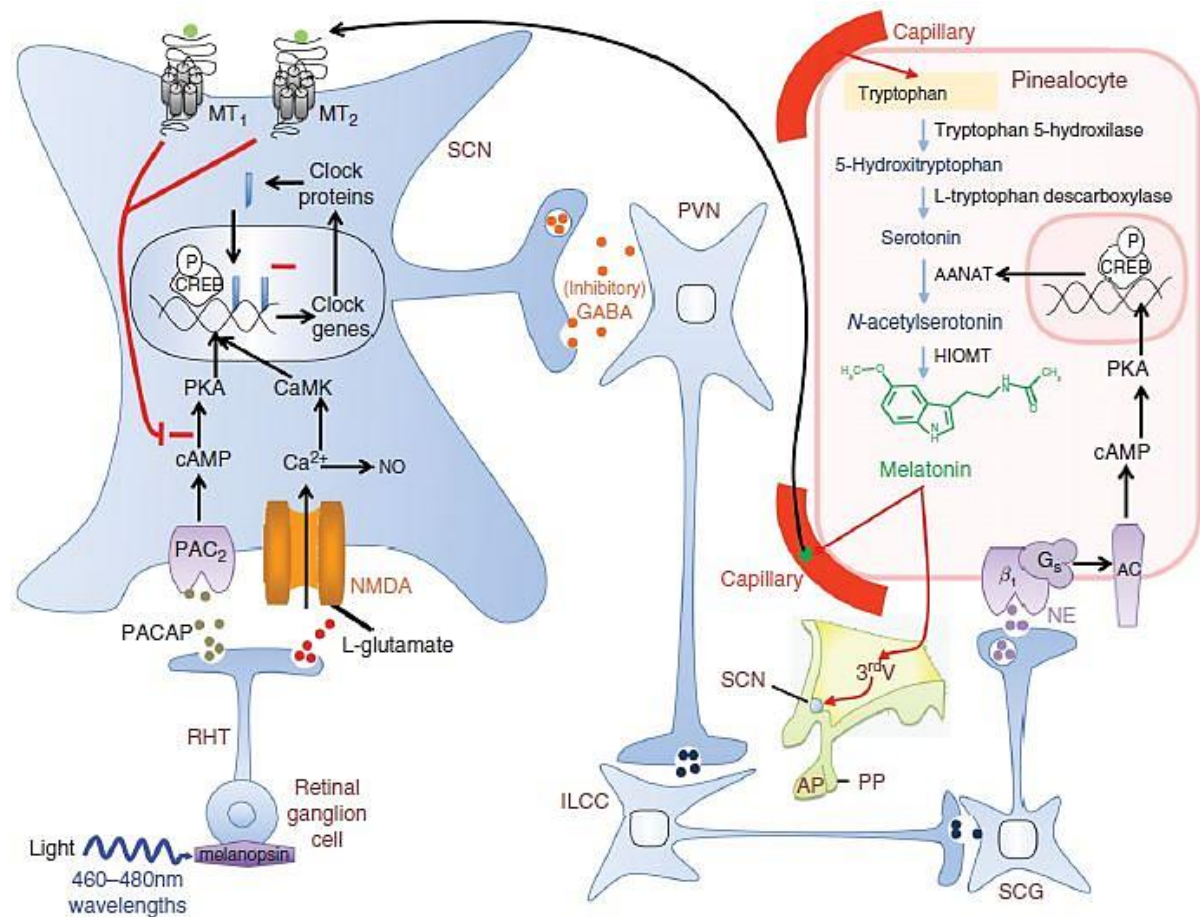
Inicialmente acreditava-se que cones e bastonetes seriam responsáveis pela captação da luminosidade e que finalmente estimulariam eletricamente os axônios dos NSQ. Contudo, indivíduos profundamente cegos devido à degeneração da camada externa da retina (bastonetes e cones) ainda possuíam visão endócrina capaz de regular os NSQ e o ciclo de melatonina diurna. Por outro lado, a remoção cirúrgica dos globos orbitais era capaz de eliminar a visão visual (sistema responsável pela formação de imagens) e endócrina (sistema responsável pelo controle do relógio biológico) (Freedman et al., 1999).

A visão endócrina moduladora do ritmo circadiano é principalmente influenciada por um grupo altamente especializado de células ganglionares presentes na retina e constituem 1 - 2% do número total de neurônios na camada celular ganglionar, sendo responsável por detectar e transduzir os comprimentos de onda críticos da luz que resultam na inibição da síntese da melatonina pineal (Beck, W. R., 2015). A capacidade de detecção da presença ou ausência de luz é realizada através de um foto pigmento presente nas células ganglionares fotorreceptoras da retina, chamada de melanopsina, no qual apresenta cinco tipos: melanopsina do tipo 1 a 5, sendo a do tipo 1 responsável por projetar seus prolongamentos para os NSQ (Ecker et al., 2010).

Consequentemente, comprimentos de onda específicos da luz azul (aproximadamente 460 - 480 nm) são detectados pelo foto pigmento e causam sua despolarização. Os axônios das células ganglionares contendo melanopsina projetam-se para os NSQ através do trato retino-hipotalâmico (RHT) no nervo óptico. Esses neurônios liberam glutamato e polipeptídeo ativador da adenilato ciclase hipofisária (PACAP) que controlam o ritmo biológico dos NSQ. Para modular a produção de melatonina pineal, os axônios dos neurônios dos NSQ se projetam para o núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo, onde liberam ácido gama-aminobutírico (GABA) (isso faz com que a produção de melatonina seja inibida, devido a estimulação GABAérgica – no entanto, na ausência de luz, as células fotorreceptoras permanecem em um estado de hiperpolarização, inibindo o estímulo GABAérgico e consequentemente estimulando

a produção de melatonina). Sendo assim, quando inibidos os neurônios dos NSQ, os corpos das células nervosas no NPV são ativados e estes possuem axônios que descem através do tronco cerebral e eventualmente se comunicam (sinapse) com neurônios na coluna intermediolateral (ILCC), que são neurônios simpáticos pré-ganglionares. Os axônios desses neurônios terminam nos pinealócitos após uma sinapse adicional no gânglio cervical superior (GCS) (Reiter et al., 2010). A ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos nos pinealócitos causada pela noradrenalina resulta em aumento da concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que promove a biossíntese da melatonina (Klein et al., 1971). Em seguida, a melatonina é descarregada no sistema vascular sanguíneo e também no líquido cefalorraquidiano (LCR) do terceiro ventrículo (3° V). A seguir a figura 1 ilustra o mecanismo fótico sobre a atividade da glândula pineal.

**Figura 1.** Mecanismo fótico de produção/inibição da melatonina.



**Figura 1.** Mecanismo fótico para produção ou inibição da melatonina pela glândula pineal. RHT: trato retino-hipotalâmico; PACAP polipeptídeo ativador de adenilato ciclase hipofisário; SCN: núcleo supraquiasmático; PVN: núcleo paraventricular; GABA: ácido gama aminobutírico; ILCC: coluna celular intermediolateral; SCG: gânglio cervical superior; LCR: líquido cefalorraquidiano; 3° V: terceiro ventrículo; AANAT = arilalquilamina N-acetiltransferase; AC = adenilato ciclase; AP = glândula pituitária anterior;  $\beta_1$  = receptor beta-adrenérgico; CaMK = calmodulina quinase; cAMP = monofosfato de adenosina cíclico; CREB = proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP; GS = proteína estimuladora G; HIOMT = hidroxindol-O-metiltransferase (também

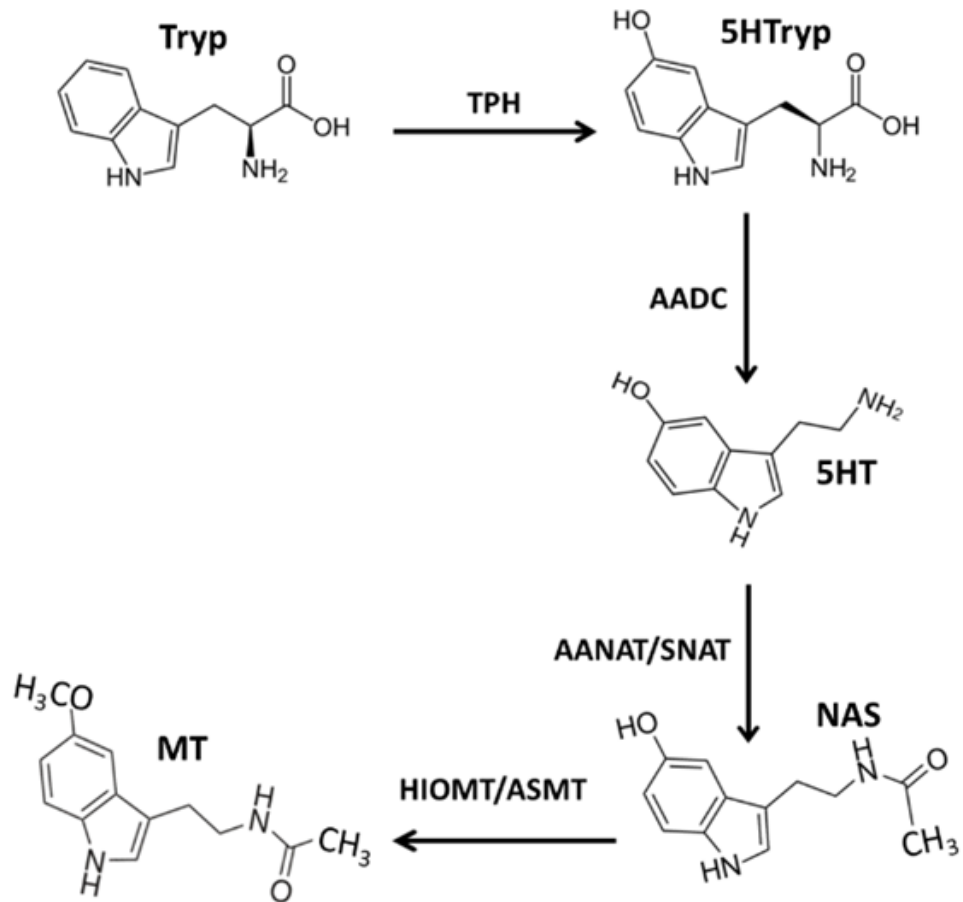
conhecido como acetil serotonina-O-metiltransferase); NO = óxido nítrico; PKA = proteína quinase A; PP = hipófise posterior (Reiter et al., 2010).

### 4.2.3 Biossíntese

Durante o período noturno e na ausência de luz, inicia-se a síntese de melatonina no pinealócito com a chegada do triptofano (Tryp), um aminoácido essencial presente em altas concentrações na corrente sanguínea (alimentos ricos em triptofano: peixes, leite e seus derivados, soja e banana) que, sob a ação da triptofano 5-hidroxilase (TPH) (doa um grupo hidroxil para a posição 5 do anel indol) é hidroxilado em 5-hidroxitriptofano (5-HTryp). Este, por sua vez é descarboxilado pela descarboxilase aromática de aminoácido (AADC) (remove um grupo carboxila da cadeia lateral) em 5-hidroxitriptomina (5HT; conhecida também como serotonina), que passa por um processo de acetilação logo em seguida pela arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) em N-acetilserotonina (NAS) que é convertido em melatonina pela N-acetilserotonina metiltransferase (ASMT), também denominada hidroxil-indol-O-metiltransferase (HIOMT) (Gheban et al., 2019; Tan e Reiter, 2018; Amaral e Cipolla-Neto., 2018; Sugden et al., 1989), como visto na figura 2.

Alguns substratos são importantes, influenciando a síntese de melatonina, tais como, o folato e as vitaminas B6. O folato é necessário durante a fase de metilação. As vitaminas B6 também desempenham um papel na descarboxilação do triptofano. Se eles não estiverem no ambiente, a síntese de melatonina não ocorrerá (Gunata et al., 2019).

**Figura 2.** Via da biossíntese da melatonina.



**Figura 2.** Etapas da via biossintética da melatonina em vertebrados. Tryp: triptofano; TPH: triptofano 5-hidroxilase; 5-HTryp: 5-hidroxitriptofano; AADC: descarboxilase aromática de aminoácido; 5HT: 5-hidroxitriptomina (comumente chamada de serotonina); SNAT (formalmente AANAT): arilalquilamina N-acetiltransferase; NAS: N-acetilserotonina; ASMT (formalmente HIOMT): N-acetilserotonina metiltransferase; MT: melatonina (Tan e Reiter, 2018).

#### 4.2.4 Ações Mediadas Por Receptores e Não Receptores

Devido a característica anfifílica de difusão da melatonina, após ser liberada no tecido sanguíneo e no líquido cefalorraquidiano em altas concentrações durante o período escuro, atinge diversas regiões com facilidade, tendo sua ação mediada por receptores ou não.

Primeiramente foram identificadas duas classes de receptores de melatonina: ML1, na qual derivam os receptores melatonérgicos 1 e 2 (MT1 e MT2, respectivamente) (Von Gall et al., 2002) e da classe ML2 composto pelo MT3. Os receptores de melatonina (MT1 e MT2) são membros da superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs). A ativação da subunidade Gi ou Gq, dependendo do tipo de receptor, medeia a sinalização intracelular

modificando as atividades da adenilato ciclase, fosfolipases C e A2, canais de potássio e cálcio e guanilil ciclase (Slominski et al., 2012).

Os receptores MT1 (MTNR1A) e MT2 (MTNR1B) (figura 3) são encontrados em várias regiões do cérebro, tais como: córtex cerebral, hipotálamo, cerebelo, habênula, núcleo dorsal da rafe, mesencéfalo (Ng et al., 2017), núcleo supraquiasmático e hipocampo (Pandi-Perumal et al., 2008). Esses receptores são igualmente identificados em áreas periféricas, incluindo: sistema cardiovascular, sistema imunológico, sistema endócrino, pâncreas, tecido gastrointestinal e reprodutivo, tecido ósseo, pele, rim, tecido muscular esquelético, entre outros (Slominski et al., 2012; Ha et al., 2006; BioGPS (<http://biogps.gnf.org>)).

O MT3 (figura 3) possui sua estrutura muito semelhante (95%) à enzima quinona redutase 2 humana (Gunata et al., 2019). Essa enzima pertence a um grupo de redutases que participam da proteção contra o estresse oxidativo, impedindo as reações de transferência de elétrons das quinonas (Pandi-Perumal et al., 2008). O "receptor MT3" (expresso em quinona redutase 2) é expresso no fígado, rim, cérebro, coração, pulmão, intestino, músculo esquelético e tecido adiposo marrom (Nosjean et al., 2001)

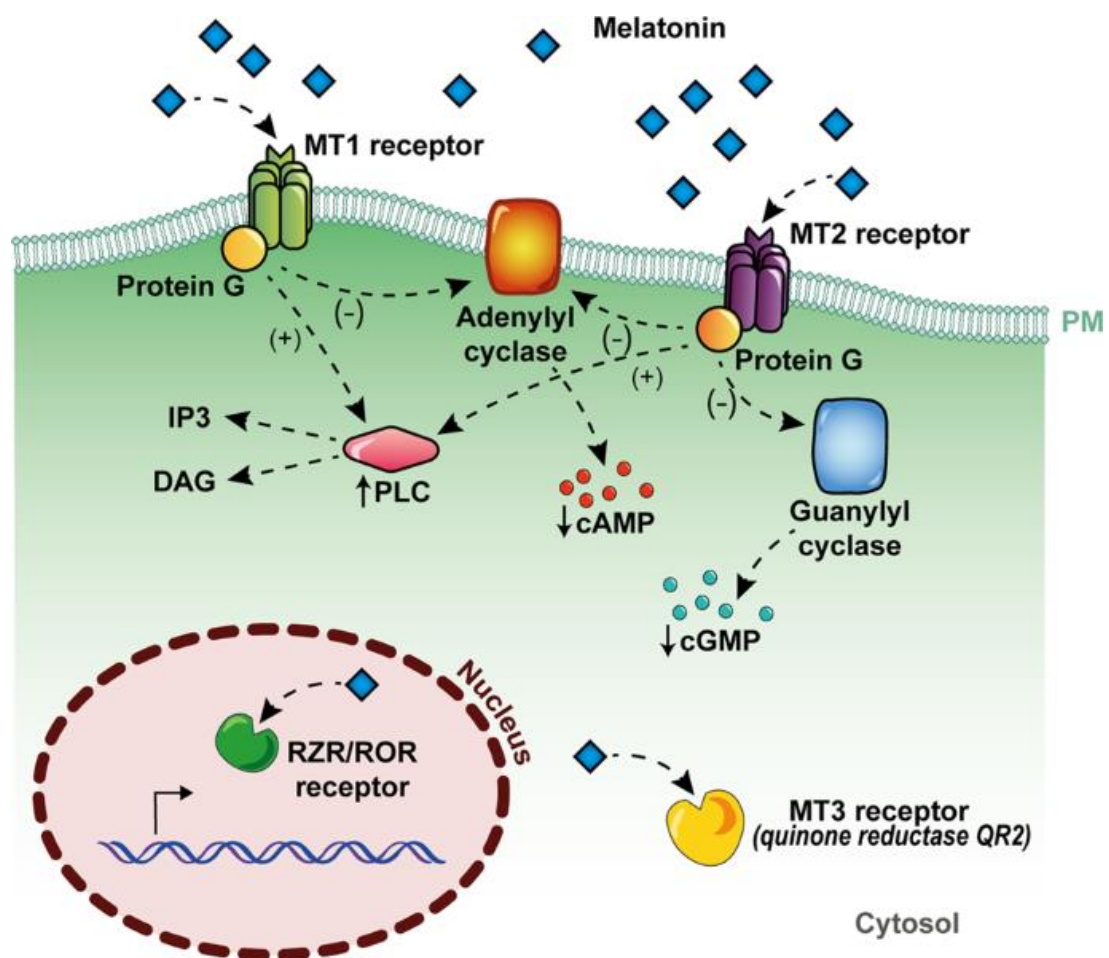
A melatonina também pode interagir com uma superfamília de receptores nucleares denominados de receptor órfão relacionado ao ácido retinóico (ROR) / receptor Z retinóide (RZR) (figura 3), que incluem ROR $\alpha$ , ROR $\beta$  e ROR $\gamma$ , RZR $\alpha$  e RZR $\beta$  (Gunata et al., 2019; Reiter et al., 2010). RORs estão relacionados à regulação do ritmo circadiano, metabolismo energético e sistema imunológico. O ROR $\alpha$  é expresso em vários tecidos, tais como, fígado, timo, músculo esquelético, pele, pulmão, tecido adiposo e rins, enquanto que ROR $\beta$  e ROR $\gamma$  são menos expressos (Kojetin et al., 2014). Foi relatado ainda que a melatonina ao se conectar aos sítios de ligação de ROR/RZR exibe efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (Reiter et al. 2010).

Além da ação mediada por receptores, esta indolamina atua sem a presença de receptor, com sua atividade principalmente relacionada ao efeito antioxidante, no qual tem sido fortemente demonstrado em relevantes revisões bibliográficas. Segundo Gunata et al. (2019), a melatonina age diretamente na detoxificação de radicais livres e seus produtos (radical hidroxila, ânion peroxinitrito, oxigênio singlete, radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e ácido hipocloroso (Reiter et al., 2010)), estimulando a atividade de uma variedade de enzimas antioxidantes, inibindo a atividade de enzimas oxidativas, aumentando a atividade de outros importantes antioxidantes, além de reduzir a formação de radicais livres pela mitocôndria. Em uma revisão publicada por Russel J. Reiter foi demonstrado que além da melatonina, os metabolitos formados através da interação com os radicais livres

também são altamente antioxidantes, são eles, 3-hidroximelatonina, N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e N1-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) (Reiter et al., 2016). Esta forte característica do hormônio concede a ele um efeito protetor contra o dano oxidativo ao DNA, consequentemente prevenindo uma variedade de doenças crônicas não transmissíveis (Galano et al., 2018).

Por fim, mas não menos importante, a melatonina interage com proteínas intracelulares tais como a calmodulina, atuando sobre o controle do cálcio no meio interno e a tubulina (Benítez-king e Antón-Tay, 1993).

**Figura 3** – Mecanismos de ação da melatonina



**Figura 3** – A melatonina pode exercer seus efeitos por meio de mecanismos independentes do receptor, que envolvem a interação direta da melatonina com outras moléculas, e estão principalmente relacionados à sua ação antioxidante e sequestradora de radicais. Como qualquer outro hormônio, a melatonina também pode atuar através de receptores de membrana, chamados MT1 e MT2, pela enzima citosólica QR2 (também chamado de MT3), ou através dos receptores nucleares RZR / ROR (Taroco et al., 2019). IP3: Inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol; PLC: fosfolipase C; cAMP: adenosina monofosfato cíclico; cGMP: guanosina monofosfato cíclico; RZR/ROR; receptor órfão relacionado ao ácido retinóico/receptor Z retinóide; MT1 e MT2: receptores melatonérgicos 1 e 2; PM: membrana plasmática (Tarocco et al., 2019).

#### 4.2.5 Melatonina e Músculo Esquelético

Dentre as diversas funções da melatonina, esta indolamina parece atuar no tecido muscular esquelético através dos seus receptores presentes no sarcolema (MT1 e MT2) (Ha et al., 2006; BioGPS (<http://biogps.gnf.org>), no citosol (quinona redutase 2 ou MT3) (Nosjean et al., 2001) e no núcleo (ROR/RZR) (Kojetin et al., 2014).

Ha et al. (2006) demonstraram que ao administrar melatonina (1 ou 10 nM) em células musculares esqueléticas isoladas de camundongo C2C12 transfectadas somente com receptores MT2 houve aumento do transporte de glicose via IRS-1 / PI3K. Neste cenário, Owino et al. (2016) analisaram camundongos WT, MT1<sup>-/-</sup> e MT2<sup>-/-</sup> e demonstraram efeito sobre a regulação dos clock genes e glicose plasmática. Mais tarde, Owino et al., (2019) usando os mesmos modelos de animais, analisaram a taxa de captação de glicose e as taxas de glicólise e glicogênese, demonstrando diferenças entre os animais.

Ambos receptores MT1 e MT2 são considerados receptores de membrana acoplados a proteína G (GPCRs) com sete domínios transmembrânicos em formato de hélice. A ativação do receptor MT1 permite a ativação de uma grande variedade de proteínas G, incluindo G<sub>ia2</sub>, G<sub>ia3</sub>, G<sub>aq/11</sub>, G<sub>as</sub>, G<sub>az</sub> e G<sub>a16</sub>. O mecanismo de sinalização acionado pela proteína Gi percorre para o interior da célula muscular apresentando efeito inibitório sobre a atividade da adenilato ciclase e toda sua cascata de transdução de sinais, incluindo reduções no conteúdo de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), atividade da proteína quinase A (PKA) e fosforilação do proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc (CREB) (Pandi Perumal et al., 2008). Além disso, a ativação da proteína G<sub>q/11</sub> estimula a fosfolipase C (PLC), resultando na ativação do inositol fosfato 3 (PI3) e diacilglicerol (DAG). Por sua vez, a ativação do PI3 permite o aumento nos níveis de cálcio e ativa a sinalização por Calmodulina (Slominski et al., 2012). Além da atividade semelhante ao MT1, o receptor MT2 possui efeito inibidor sobre a enzima guanilil ciclase culminando na redução de guanosina monofosfato cíclico (GMPc).

#### 4.2.6 Melatonina Exógena

A administração exógena deste hormônio tem aumentado no cenário acadêmico, visto sua ampla gama de efeitos fisiológicos em mamíferos. O aumento na concentração de melatonina sérica ocorre ao anoitecer (08:00 – 09:00 p. m.) e atinge seu pico próximo as 02:00 – 03:00 a. m., ao amanhecer (07:00 – 09:00 a. m.) a concentração de melatonina volta a valores praticamente nulos em humanos (Gunata et al., 2019; Cipolla Neto e Amaral, 2018). Estes horários podem sofrer alterações de acordo com ritmo biológico e exposição a luz de cada indivíduo.



O primeiro relato sobre a administração exógena de melatonina surgiu ao final da década de 60. Onde, Anton Tay et al., (1968) ao analisarem ratas Sprague-Dawley, demonstraram que ao aplicar 500  $\mu\text{g}$  de melatonina via intraperitoneal ocorria aumento na concentração de serotonina no cérebro, especialmente no mesencéfalo dentro do período de 20 minutos. Informações sobre a farmacocinética da melatonina são limitadas, no entanto, é conhecido pela literatura que a biodisponibilidade da melatonina varia conforme o método de administração. Neste cenário, Yeleswaram et al. (1997) demonstraram maior biodisponibilidade ao administrarem 10  $\text{mg.kg}^{-1}$  de melatonina via intraperitoneal (74%) quando comparada a via oral (53,5%). Além disso, é importante mencionar que a melatonina é considerada um hormônio com baixa toxicidade e conseqüentemente seguro de ser administrado. Desta maneira, a dose conhecidamente letal para administração intraperitoneal foi determinada para ratos e camundongos (1168 e 1131  $\text{mg.kg}^{-1}$ , respectivamente), enquanto que, se oralmente administrada, nenhuma toxicidade ainda foi encontrada, atingindo concentrações de 3200  $\text{mg.kg}^{-1}$  de melatonina (Sudgen, 1983).

Sendo assim, foi realizada uma revisão da literatura (tabela 1), na qual consiste em informações quanto a dosagem, forma de administração e método de dissolução e diluição para administração em roedores. Diante disso, podemos constatar que a administração de melatonina geralmente é conduzida após sua dissolução em etanol puro (menor quantidade possível) e empregando solução salina como transporte (NaCl 0,9%). A dose de aplicação mais utilizada atualmente em roedores é de 10  $\text{mg.kg.dia}^{-1}$ . Além disso, após dissolução e diluição, a solução deverá ser armazenada em frasco âmbar, envolto por papel alumínio, a fim de evitar os efeitos da luminosidade sobre a estabilidade da solução, assim como sua preparação deve ser realizada o mais próximo possível do momento de sua aplicação.

**Tabela 1** - Administração exógena de melatonina em ratos, considerando dosagem, diluição e via de administração.

Animal	Dose	Diluição	Via de administração	Referência
Ratas Sprague-Dawley	10 mg.kg <sup>-1</sup>	Dissolvida em etanol, diluída em salina (10% etanol)	Veia da calda	Chen et al., 2020
Ratas Sprague-Dawley	5 mg	-	Implantes de pallets subcutâneos	De Butte e Giesecking, 2019
Ratos Albinos	10 mg.kg.dia <sup>-1</sup>	-	Gavagem	Mahmoud e El-Deek, 2019
Ratos Sprague-Dawley	10 mg.kg.dia <sup>-1</sup>	-	Gavagem	Aslankoc e Ozmen, 2019
Ratos Sprague-Dawley	0,4 mg.kg <sup>-1</sup>	Dissolvida em etanol e adicionada à água (4 ug/mL e 0,01% etanol)	Oral	Haeger et al., 2019
Ratas Wistar	1 mg.kg <sup>-1</sup>	-	Intraperitoneal	De Araujo et al., 2019
Ratos Wistar	50 mg.kg <sup>-1</sup>	-	Oral	Fadda et al., 2019
Ratos Wistar	10 mg.kg.dia <sup>-1</sup>	Dissolvida em etanol e diluída em água (0,066% etanol)	Oral	Verma et al., 2019
Ratos Wistar	50 ou 100 mg.kg <sup>-1</sup>	Dissolvida em etanol e diluída em salina (5% etanol)	Intraperitoneal	Musa et al., 2019
Ratas Sprague-Dawley	10 mg.kg <sup>-1</sup>	Dissolvida em etanol e diluída em água (0,066% etanol)	Oral	Luengo et al., 2019
Ratos Sprague-Dawley	8 mg.kg <sup>-1</sup>	Dissolvida em etanol e diluída em salina (< 1% etanol)	Intraperitoneal	Aranarochana et al., 2019
Ratas adultas	20 mg.kg <sup>-1</sup>	-	Intraperitoneal	Mohamed et al., 2019
Ratos Wistar	20 mg.kg <sup>-1</sup>	Dissolvida em etanol e diluída em salina (5% etanol)	Intraperitoneal	Edizer et al., 2019

Estudos como o de Mahmoud e El-Deek, (2019) e Mohamed et al. (2019), não relatam a espécie utilizada. mg: miligrama; kg: quilograma.

#### 4.2.7 Melatonina, Metabolismo e Exercício Físico Aeróbio

As demandas metabólicas exigidas pelo esporte são bastante complexas, com eventos que duram de segundos (levantamento de peso, arremessos e corridas de curta duração) a várias horas ou até mesmo dias (provas de ultramaratona, triatlão e ciclismo de longa duração). O exercício físico depende diretamente de um intermediário metabólico, o trifosfato de adenosina

(ATP) gerado a partir da transformação química de alguns substratos, principalmente carboidratos e lipídeos. No entanto, os estoques de ATP intramuscular são relativamente limitados (~5 mmol por kg de músculo úmido) sendo incapazes de sustentar a atividade contrátil por longos períodos (Hargreaves and Spriet, 2020). Sendo assim, as vias metabólicas para ressíntese de ATP são rapidamente ativadas no início do exercício intenso (arremessos, saltos ou sprints de 100 – 400 m) por meio da quebra do fosfato de creatina (PCr) e do glicogênio muscular, dando origem ao lactato. A oxidação dos substratos ocorre no citoplasma como parte da glicólise (metabolismo glicolítico) e na mitocôndria como parte do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e prossegue sob condições aeróbicas (metabolismo oxidativo) (Egan et al., 2016).

Consequentemente, esportes cíclicos com duração de vários minutos a várias horas (maratona ou corrida ciclística) ou com sprints de alta intensidade (esportes coletivos como, futebol) são sustentados principalmente pela oxidação do glicogênio intramuscular e, em menor grau, pelos lipídeos. À medida que a intensidade (> 75%  $VO_{2max}$ ) e duração (> 1 minuto, corrida de 800 m) do exercício aumentam é necessário um maior aporte de substratos extra musculares como, carboidratos advindos do fígado (glicogenólise e gliconeogênese) ou intestino e de ácidos graxos livres liberados do tecido adiposo (lipólise) (Burke and Hawley, 2018; Hearn et al., 2018; Holloszy et al., 1998).

Durante provas de resistência de alto rendimento (triátlon ou maratona), as intensidades dos exercícios são mais altas e se aproximam de 80 – 100% do  $VO_{2max}$ , com duração de 2 – 2,5 h dependendo principalmente da oxidação de carboidratos (Hargreaves and Spriet, 2020). No entanto, as reservas deste substrato são limitadas e ao reduzirem criticamente durante exercício físico prolongado de alta intensidade podem prejudicar a performance esportiva (Kenney et al., 2011). Sendo assim, a baixa disponibilidade de glicogênio induz um aumento na liberação sistêmica de aminoácidos e simultaneamente aumenta a oxidação da gordura e, como consequência, a intensidade do exercício diminui (Knuiman et al., 2015), caracterizando a fadiga muscular.

Estudos prévios publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstram efeito ergogênico da administração aguda de melatonina sobre exercício exaustivo aeróbico em animais noturnos (Beck et al., 2015, 2016). Apesar da consistência do efeito ergogênico da melatonina, as razões para a ocorrência desse fenômeno permanecem obscuras. Neste cenário, a literatura tem demonstrado o papel da melatonina sobre o metabolismo energético em exercício de longa duração, no entanto, sem realizar controle ideal da intensidade de esforço.

De acordo com Mazepa et al. (2000), ratos Wistar tratados agudamente com uma dosagem de 0,5 ou 2,0 mg.kg<sup>-1</sup> de melatonina, administrada 30 min previamente a corrida em esteira, demonstraram aumento da disponibilidade de ácidos graxos livres, preservando o glicogênio muscular e hepático. Semelhante ao estudo anterior, Sánchez-Campos et al. (2001) demonstraram que a administração aguda de melatonina, conduzida 30 min previamente a corrida em esteira, aumentou o conteúdo de glicogênio hepático em animais não exercitados e reduziu o conteúdo de ácidos graxos livres nos animais exercitados. Em outro estudo, Kaya et al. (2010) analisaram ratos Sprague-Dawley submetidos ao exercício agudo de natação (duração: 30 minutos), sob administração de melatonina (3 mg.kg.dia<sup>-1</sup>, por 4 semanas). Os resultados apresentados demonstram aumento no estoque de glicogênio hepático dos animais submetidos à natação com administração de melatonina quando comparado aos animais que não receberam a droga. Por sua vez, Bicer et al. (2011) demonstraram o efeito protetor da melatonina sobre os níveis de glicogênio hepático de ratos Sprague-Dawley submetidos ao exercício agudo de natação e sob administração crônica (4 semanas) de melatonina a uma dose de 3 mg.kg.dia<sup>-1</sup>.

Mais recentemente outro estudo (Mendes et al., 2013) investigou o papel da suplementação diária de melatonina durante o envelhecimento do animal. Foram analisados ratos Wistar, submetidos ao treinamento de corrida (8 semanas) em esteira sobre administração de melatonina (1 mg.kg.dia<sup>-1</sup> por 16 semanas). Ao analisar os dados, não foi demonstrada alteração da glicemia entre os grupos. No entanto, o conteúdo de glicogênio hepático e muscular do grupo treinado que recebeu melatonina aumentou quando comparado ao controle. Diante dessas observações, percebe-se a importância desta indolamina sobre o metabolismo energético principalmente quando envolvidos ao exercício de endurance.

#### **4.2.8 Catabolismo e excreção**

De maneira geral, o processo de catabolismo e excreção ocorre inicialmente nos hepatócitos, onde a melatonina circulante é absorvida e hidroxilada na posição 6 pelas monooxigenases do citocromo P450 (principalmente CYP1A2). O produto é então conjugado ao sulfato (50 - 80%) ou glucoronido (5 - 30%), liberado das células hepáticas e excretado na urina como 6-sulfatoximelatonina (Gunata et al., 2019; Skene et al., 2001).

Outra forma de avaliar o catabolismo sofrido pelo hormônio após sua ação é observando sua característica antioxidante, quando a melatonina age diretamente sobre os radicais livres causando sua estabilização através da doação de elétrons. Durante esses processos, outros metabólitos são produzidos, incluindo 3-hidroxi-melatonina cíclica, N1-acetil-N2-formil-5-

metoxiquinuramina (AFMK) e N1-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) (Tan et al., 2002), todos excretados pela urina.

A concentração de melatonina pode ser facilmente mensurada no sangue, saliva e urina (6-sulfatoximelatonina). Amostras de sangue e saliva demonstram concentrações de melatonina no tempo exato da amostragem, enquanto as avaliações de urina apresentam a quantidade acumulada de 6-sulfatoximelatonina durante um intervalo de tempo. Além disso, é possível estimar toda a produção noturna de melatonina medindo a concentração de 6-sulfatoximelatonina na urina coletada no início da manhã (Cipolla-Neto e Amaral, 2018).

## 5 METODOLOGIA

Como forma de orientação ao leitor, a dissertação contém dois artigos apresentados individualmente na seção “resultados – Capítulos 1 e 2”, com suas respectivas metodologias detalhadamente descritas, no entanto, na presente seção consta uma metodologia geral, na qual abrangerá ambos os artigos. O mesmo ocorrerá para a discussão do trabalho, na qual será apresentada individualmente (seção resultados – Capítulos 1 e 2) e em seguida uma discussão contemplando ambos os artigos de forma simultânea.

### 5.1 AMOSTRA E CONDIÇÕES AMBIENTAIS

O estudo avaliou ratos albinos da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico (LAFEEEx), situado no Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da mesma Instituição. Além de visar o bem-estar dos animais, experimentos envolvendo variáveis da cronobiologia carecem de rigoroso controle das condições ambientais, como temperatura ambiente, umidade relativa e condições de luminosidade. Assim, os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (comprimento 40 cm, largura 40 cm, altura 20 cm e 5 animais/gaiola). Durante todo o experimento os ratos permaneceram em ambiente climatizado a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ , umidade relativa do ar entre 45 e 55% e alimentados com ração comercial própria para roedores (marca Presence – linha laboratorial) e água filtrada sem restrições. Os ruídos no biotério foram controlados para que não excedessem 85 decibéis e os experimentos foram realizados de acordo com a legislação Brasileira e normas correntes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSCar sob protocolo número 9144181218 (ver ANEXO – Certificado CEUA).

Animais albinos são facilmente acometidos de retinopatia fototóxica, condição estressante e capaz de gerar interferências indesejáveis nos experimentos, especialmente aqueles

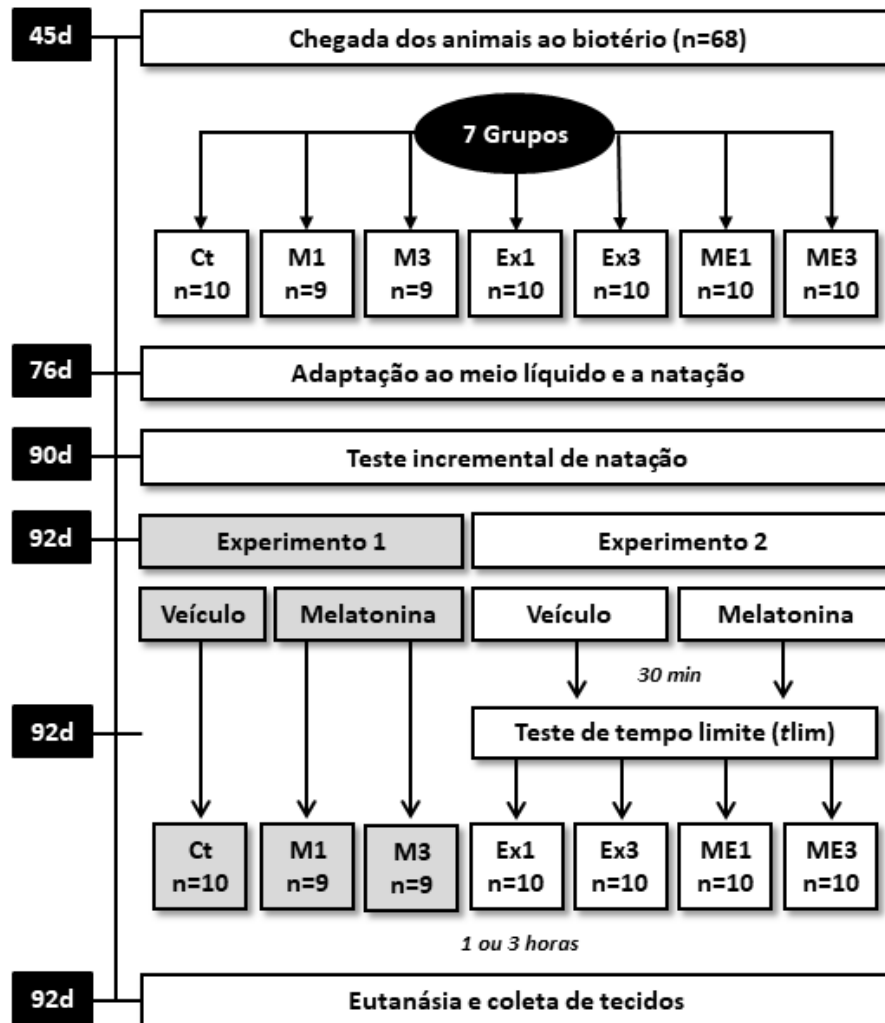
envolvidos com melatonina e ritmo circadiano. Com a finalidade de evitar tal condição, foram utilizadas lâmpadas incandescentes (Marca Philips, modelo Soft, de 100 W) nos ambientes de alojamento e de testes físicos, instaladas em um potenciômetro para controle preciso da intensidade da luz. Tal lâmpada possui temperatura de cor de aproximadamente 2700 K e comprimentos de onda entre 565 e 590 nm, sendo equiparada ao padrão da luminosidade ambiental natural. Sendo assim, a intensidade da luz não ultrapassou 60 lux dentro da gaiola durante o ciclo claro de 10 horas, devidamente aferida por um luxímetro. Para a realização de intervenções experimentais no período de vigília dos ratos (noturno – 16:00 às 06:00 horas), foram instalados refletores no biotério e sala de avaliação, envoltos por um filtro vermelho (Marca LEE Filters, modelo 019 Fire) que permitiu a emissão de ondas luminosas apenas acima de 600 nm e com intensidade controlada em até 15 lux de incidência sobre os animais. Este padrão luminoso foi padronizado por nosso grupo de pesquisas (Beck e Gobatto, 2013). Tal cenário luminoso permite impedir influência relevante da luz sobre a atividade da N-acetiltransferase da glândula pineal (Sun et al., 1993), algo de extrema importância à linha de pesquisa.

## 5.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Aos 45 dias de idade, 68 ratos da linhagem Wistar (pesando aproximadamente 120 - 150 g) chegaram ao biotério previamente preparado para o acolhimento visando atender as condições ambientais e foram divididos em 7 grupos: controle (Ct: n = 10), tratado com melatonina e eutanasiado 1 h (M1: n = 9) ou 3 h após os últimos procedimentos (M3: n = 9), exercitado e eutanasiado 1 h (Ex1: n=10) ou 3 h após o teste de tempo limite ( $t_{lim}$ ) (Ex3: n = 10), tratado com melatonina, exercitado e eutanasiado 1 h (ME1: n = 10) ou 3 h após o  $t_{lim}$  (ME3: n = 10). Os animais do grupo Ct, Ex1 e Ex3 receberam solução veículo (etanol e NaCl, 0,9 %), enquanto que, M1, M3, ME1 e ME3 receberam melatonina ( $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ ).

Após a adaptação ao meio líquido (início aos 76 dias de idade), os animais foram submetidos ao teste incremental aos 90 dias para determinação da intensidade de esforço correspondente a máxima capacidade aeróbia individual. Aos 92 dias, os animais receberam solução veículo ou melatonina ( $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e após 30 minutos foram submetidos ao teste de tempo limite ( $t_{lim}$ ). Em seguida, os animais foram eutanasiados por decapitação 1 ou 3 horas após o término do experimento, conforme permitido pela American Veterinary Medical Association (2013).

Figura 4 – Desenho experimental.



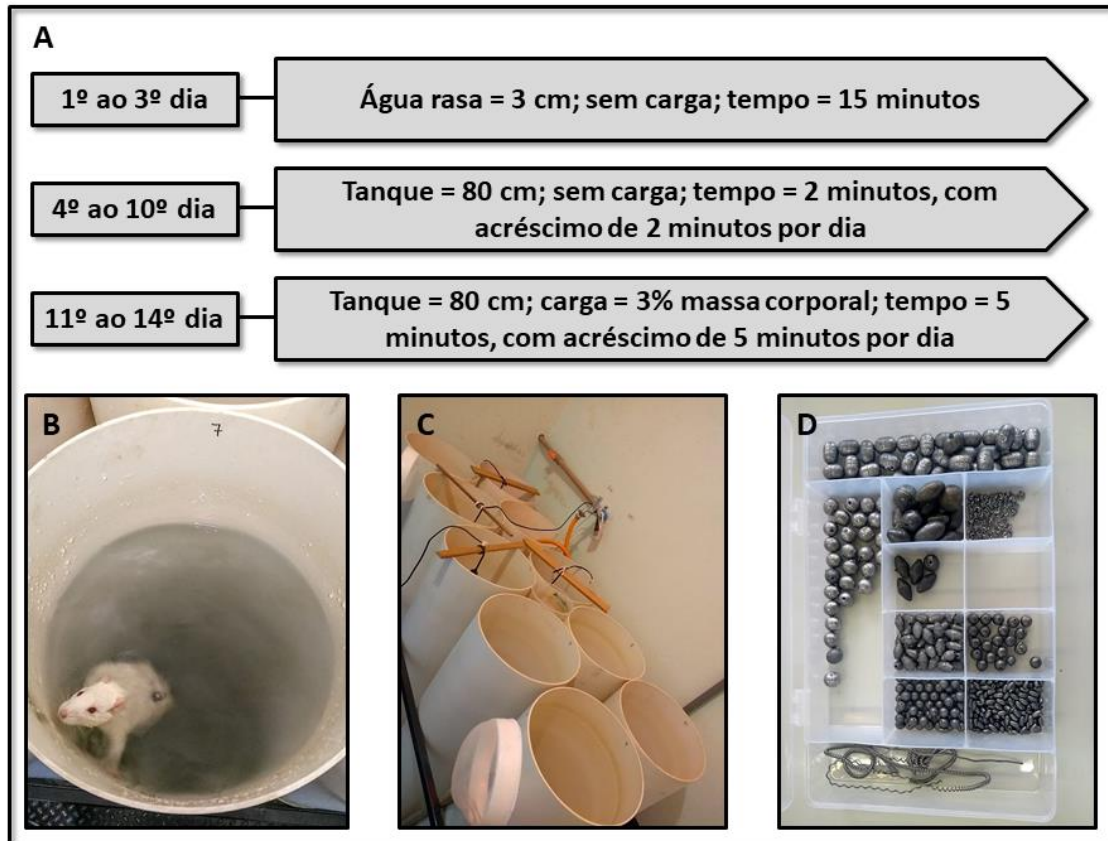
**Figura 4** - Sequência cronológica dos eventos ocorridos ao longo do experimento: chegada dos animais ao biotério, adaptação ao meio líquido, teste incremental de natação, teste de tempo limite e eutanásia. d: dias; min: minutos; Ct: controle; Ex1: exercitado e eutanasiado 1 hora após o tlim; Ex3: exercitado e eutanasiado 3 horas após o tlim; ME1: melatonina, exercitado e eutanasiado 1 hora após o tlim; ME3: melatonina, exercitado e eutanasiado 3 horas após o tlim; M1: melatonina e eutanasiado 1 hora após os últimos procedimentos; M3: melatonina e eutanasiado 3 horas após últimos procedimentos.

### 5.3 ADAPTAÇÃO AO MEIO LÍQUIDO

Aos 76 dias de idade iniciou-se a adaptação ao meio líquido (16:00 às 19:00 horas, Zeitgeber time 10 a 13). A familiarização ao ambiente aquático foi ajustada a partir do modelo proposto por Lima et al. (2017) (ver figura 5A) e perdurou por 14 dias de maneira progressiva levando em consideração parâmetros como tempo de exposição (5 a 20 minutos), profundidade da água (10 a 80 cm) e carga (0 ou 3% da massa corporal - % MC) (ver figura 5D). O protocolo de natação consiste em nado individual, em tanques cilíndricos e opacos com 100 cm de altura

(80 cm de profundidade de água), 30 cm de diâmetro (ver figura 5B e C) e temperatura da água mantida à  $31 \pm 1$  °C, seguindo orientações da American Physiological Society (2006).

**Figura 5** - Protocolo de adaptação ao meio líquido



**Figura 5** - Figura representativa do protocolo de adaptação ao meio líquido modificado segundo Lima et al., (2017), com duração de 14 dias (A). Após a adaptação ao meio líquido, os animais foram submetidos ao protocolo de natação individual (B) em tanques cilíndricos e opacos (C). Para realização do esforço em intensidade equivalente a 100% da máxima capacidade aeróbia individual, foi utilizada cargas de chumbo atada ao tórax dos animais (D) (Pejon, 2020). Cm: centímetros.

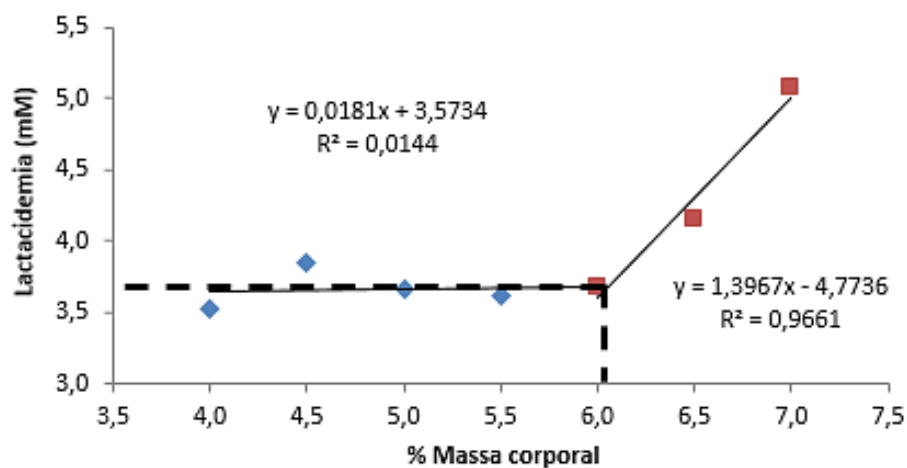
#### 5.4 TESTE INCREMENTAL DE NATAÇÃO

Aos 90 dias de idade todos os animais foram submetidos ao teste incremental (TI), no qual consiste em aumentos proporcionais na carga ao longo do tempo para identificação de um aumento desproporcional na concentração de lactato sanguíneo em um determinado momento (Zagatto et al., 2008), denominado máxima capacidade aeróbia. Sendo assim, os animais foram submetidos ao exercício de natação em estágios de 5 minutos com sobrecargas correspondentes a 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 e 7,0 % da massa corporal (% MC) atada ao tórax do animal por meio de uma cinta elástica. Após cada etapa, amostras de sangue (25 µL) foram coletadas da parte distal da cauda dos animais, adicionadas a 400 µl de ácido tricloroacético (4%) e armazenadas (4 ° C) para determinação da concentração de lactato. Em seguida, a concentração



de lactato foi determinada pelo método enzimático e analisado em espectrofotômetro (Spectramax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA) a 340 nm (descrito detalhadamente a seguir). A intensidade do exercício em relação à concentração de lactato sanguíneo foi plotada em um gráfico de dispersão e qualquer alteração na concentração de lactato sanguíneo foi identificada por inspeção visual, conforme descrito anteriormente por Matsumoto et al. (1999). Em seguida, duas regressões lineares foram construídas seguindo o ponto de quebra. A intersecção dessas regressões lineares interpoladas ao eixo X foi usada para definir a intensidade correspondente ao limiar anaeróbio lactacidêmico (Zagatto et al., 2008). A interpolação para a linha y correspondeu à concentração de lactato sanguíneo na intensidade da máxima capacidade aeróbia.

**Figura 6** – Ilustração da lactacidemia e porcentagem da massa corporal (% MC) durante o teste incremental.



**Figura 6** – O teste incremental consiste em aumentos proporcionais da carga (0,5% MC; eixo X), separados por 30 segundos de intervalo na qual amostras de sangue (25  $\mu$ L) são coletadas para determinação da concentração de lactato sanguíneo (eixo y). Em seguida, duas regressões lineares (pontos azuis e pontos vermelhos) são construídas seguindo o ponto de quebra. A intersecção dessas regressões lineares interpoladas ao eixo X é usada para definir a intensidade correspondente ao limiar anaeróbio lactacidêmico (Zagatto et al., 2008) (linhas tracejadas indicam intensidade no eixo X). A interpolação para a linha y corresponde à concentração de lactato sanguíneo na intensidade da máxima capacidade aeróbia (linhas tracejadas indicam a concentração de lactato no eixo y). Os dados apresentados no gráfico acima são referentes ao animal 56 (grupo controle).

## 5.5 TESTE DE TEMPO LIMITE

Aos 92 dias de idade os animais dos grupos Ex1, Ex3, ME1 e ME3 foram submetidos ao exercício de natação até a exaustão sob intensidade correspondente a 100% da iMCA (início às 19:00 h), denominado teste de tempo limite (*t*<sub>lim</sub>), afim de confirmar o efeito ergogênico da melatonina. O critério para identificação da exaustão do animal foi padronizado de acordo com

Beck e Gobatto (2013): foi realizada análise do comportamento do nado do animal a fim de observar execução de esforços vigorosos sem sucesso em retornar à superfície pelo período de 15 segundos seguidos, estabelecendo assim a exaustão e conduzindo o registro do tempo total de nado. A exaustão foi aceita pela concordância de dois observadores experientes considerando os critérios acima.

## 5.6 ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA

Melatonina (Sigma Aldrich Chemical Corporation; St Louis, MO, USA; M-5250, > 98%) foi dissolvida em etanol (< 0,1%) e diluída em solução salina (NaCl, 0,9%) para administração a 10 mg.kg<sup>-1</sup> (Beck et al., 2015, 2016). A preparação foi realizada anteriormente a sua utilização e armazenada em frasco âmbar, envolto por papel alumínio. Os animais dos grupos Ct, Ex1 e Ex3 receberam solução veículo de mesmo volume (etanol e NaCl 0,9 %). A administração foi conduzida por via intraperitoneal 30 minutos previamente a realização do teste de tempo limite.

## 5.7 EUTANÁSIA, COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL BIOLÓGICO

### 5.7.1 Sangue

Durante o TI foram coletadas amostras de sangue (25 µL) da cauda dos animais em tubos capilares heparinizados e calibrados. Em seguida, as amostras foram imediatamente transferidas para tubos plásticos de 1,5 mL contendo 400 µL de TCA (ácido tricloroacético - 4%), agitadas e armazenadas a 4 °C para posterior análise. Após agitação e centrifugação (3.000 rpm, durante 3 minutos) foi extraído 50 µL de sobrenadante e transferido para microplaca de 96 poços, onde adicionou-se em seguida 250 µL de solução reativa preparada para uso imediato (estoque glicina/EDTA, hidrazina-hidrato, NAD - *Beta-nicotinamide dinucleotide* e LDH - *L-lactic dehydrogenase bovine heart*), devidamente ajustada a um pH de 9,45. Após período adequado de incubação (20 minutos, 37 °C), as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (Spectramax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA) (ver figura 7) a 340 nm e a concentração de lactato sanguíneo foi determinada em relação à curva padrão construída a partir de diluição seriada de L-Lactato de 1 a 15 mmol/L.

Após eutanásia, alíquota de aproximadamente 2,0 mL de sangue foi obtida e repousou por cerca de 20 minutos em temperatura ambiente para posterior centrifugação (15 minutos, 3.000 rpm, 10 °C). O soro obtido foi armazenado a -20 °C em alíquotas para evitar ciclos de descongelamento. Tais alíquotas foram utilizadas para determinação da concentração sérica de glicose e triglicérides a partir dos kits comerciais (LaborLab; Guarulhos, SP, Brasil) e leitura

realizada em espectrofotômetro (Spectramax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizadas apenas amostras sem evidências de hemólise.

**Figura 7** - Espectrofotômetro SpectraMax® i3.



**Figura 7** - SpectraMax® i3 (Marca Molecular Devices) – Espectrofotômetro utilizado para mensuração da absorbância das amostras para dos dados de lactacidemia, glicose plasmática e triglicerídeo sérico e muscular – Laboratório de Bioquímica e biologia molecular – Responsável: Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, UFSCar (São Carlos/SP) (Pejon, 2020).

## 5.7.2 Tecido Muscular Esquelético.

### 5.7.2.1 Glicogênio

Para determinação do conteúdo de glicogênio seguiu-se o protocolo de Dubois et al. (1956). Foi coletado tecido muscular esquelético (glúteo máximo, gastrocnêmio vermelho e branco; 200 - 250 mg) e fígado (500 mg) e imediatamente armazenados com hidróxido de potássio (KOH; 30%). Em seguida, os tubos foram condicionados ao banho-maria (85 °C) e adicionado solução saturada de sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e álcool bidestilado (70%), a fim de causar a precipitação do glicogênio. Após 3 ciclos de lavagem com água destilada quente (85 °C) e álcool bidestilado (70%), as amostras foram submetidas ao método fenol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O) / sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e analisado em cubetas de quartzo por espectrofotometria (Hach Company, Loveland, Colo, USA; 490 nm) contra curva padrão de glicose.

### 5.7.2.2 Triglicerídeo muscular

Inicialmente, tecido muscular esquelético (glúteo máximo, gastrocnêmio vermelho e branco; 100 - 200 mg) e Triton X-100 (1%) foram misturados nas mesmas proporções (200 mg de tecido para 1 mL de Triton). Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas por barras magnéticas (5 x 3 mm) durante 10 horas seguidas (2 - 8 °C) e então centrifugadas (10 minutos,

4.000 rpm). Após esse período, 10  $\mu$ L do sobrenadante foram extraídos, pipetados em microplaca de 96 poços, misturados com kit de reagentes (200  $\mu$ L; LaborLab; Guarulhos, SP, Brasil) e incubados por 20 minutos (25 °C). A absorbância da amostra foi determinada em espectrofotômetro (SpectraMax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA) a 505 nm, seguindo as orientações do kit comercial.

### 5.7.2.3 Expressão de proteínas musculares

Imediatamente após a eutanásia, tecido muscular esquelético (sóleo) foi selado em talco, congelado em nitrogênio líquido e armazenado (-80 °C). Em seguida, foram realizados cortes histológicos transversais (6  $\mu$ m) com auxílio do criostato (-25 °C; Leica CM 1850 UV) e coletados em lâminas de vidro (26 x 76 mm). Previamente ao protocolo de imunofluorescência, as lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E, MERCK, Darmstadt, Germany) para identificação de possíveis alterações morfológicas no tecido que pudessem comprometer a análise, avaliada por meio de microscópio de luz.

Para a quantificação de GLUT4 e FAT CD36, os cortes foram fixados em marcação dupla com laminina (finalidade de demarcar a célula). As lâminas foram incubadas com uma mistura de anticorpos primários monoclonais anti-mouse: GLUT4 (diluição 1:1600; Santa Cruz Biotechnology, INC; Dallas, Texas, EUA) ou FAT CD36 (diluição 1:400; Santa Cruz Biotechnology, INC; Dallas, Texas, EUA) com laminina anti-rabbit (diluição 1:200; Abcam; Ab11575; Cambridge, Reino Unido) diluída em BSA 1% (Bovine Serum Albumin – Sigma Aldrich Chemical Corporation, St Louis, MO, USA) por 45 minutos a 37 °C. Após esse período, os cortes foram lavados em solução PBS (três ciclos de 5 minutos) e foi adicionada uma mistura de anticorpos secundários: Alexa 488 IgG<sub>1</sub> para marcar GLUT4 na cor verde (diluição 1:1000; Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC; West Grove, PA, EUA) ou Alexa 594 IgM para marcar FAT CD36 na cor vermelha (diluição 1:1000; Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC.; West Grove, PA, EUA) com Alexa Fluor 647 IgG (diluição 1:200; Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA) para marcar laminina na cor vermelha ou Alexa Fluor 488 IgG para marcar a laminina na cor verde (diluição 1:200; Invitrogen; Carlsbad, Califórnia, EUA) por 35 minutos a 37 °C, respectivamente. As amostras foram lavadas novamente com solução de PBS (3 ciclos de 5 minutos) e montadas com FluoroQuest™ Mounting Medium (AAT Bioquest®, INC, Sunnyvale, CA, EUA).

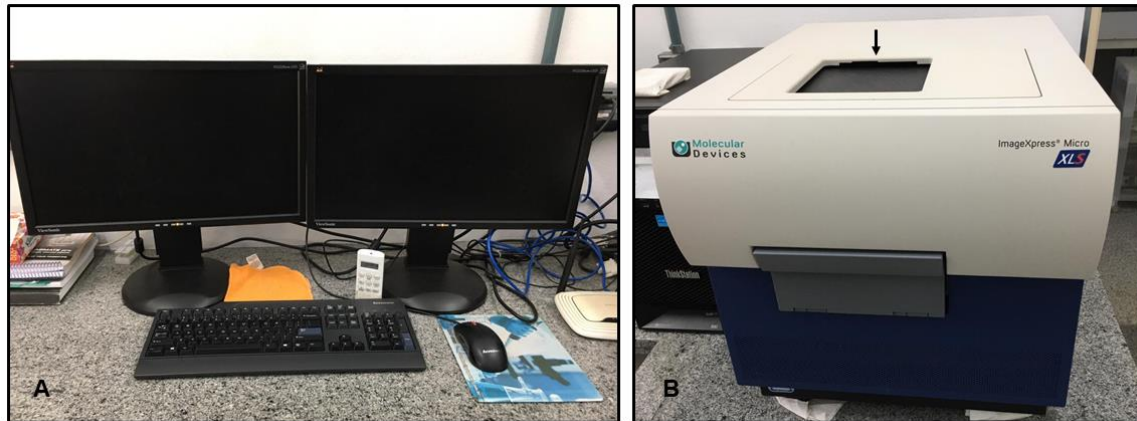
Para quantificação de PGC-1 $\alpha$  e NRF-1, as lâminas foram incubadas com uma mistura de anticorpos primários monoclonais anti-mouse: NRF-1 (diluição 1:500; Santa Cruz Biotechnology, INC; Dallas, Texas, EUA) ou PGC-1 $\alpha$  (diluição 1:50; Santa Cruz

Biotechnology, INC; Dallas, Texas, EUA) com laminina anti-rabbit (diluição 1:200; Abcam; Ab11575; Cambridge, Reino Unido) diluída em BSA 1% por 45 minutos a 37 °C. Após esse período, os cortes foram lavados em solução PBS (três ciclos de 5 minutos) e foi adicionada uma mistura de anticorpos secundários: Alexa 488 IgG<sub>1</sub> para marcar NRF-1 na cor verde (diluição 1:1000; Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC.; West Grove, PA, EUA) ou Alexa 647 IgG<sub>2a</sub> para marcar PGC-1 $\alpha$  na cor vermelha (diluição 1:1000; Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC.; West Grove, PA, EUA) com Alexa Fluor 647 IgG (diluição 1:200; Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA) para marcar laminina na cor vermelha ou Alexa Fluor 488 IgG para marcar a laminina na cor verde (diluição 1:200; Invitrogen; Carlsbad, Califórnia, EUA) por 35 minutos a 37 °C, respectivamente. As amostras foram lavadas novamente com solução de PBS (3 ciclos de 5 minutos) e montadas com FluoroQuest™ Mounting Medium (AAT Bioquest®, INC, Sunnyvale, CA, EUA).

As lâminas foram fotografadas por sistema automatizado de microscopia epifluorescente de alta resolução (ImageXpress® Micro, Molecular Devices; San José, CA, EUA) (ver figura 8) utilizando lente objetiva de 20x, com filtros específicos para GLUT4 e NRF-1 (FITC - exposição 1000 - 1200 ms), FAT CD36 e PGC-1 $\alpha$  (Cy5 - exposição 1800 - 2200 ms) e laminina (FITC e Cy5 - exposição 100 ms). As imagens foram salvas com tamanho e resolução idênticas.

A densidade integrada da intensidade de fluorescência de GLUT4, FAT CD36, PGC-1 $\alpha$  e NRF-1 foi quantificada em cinco campos distintos e aleatórios (altura: 220 e largura: 220) pelo software ImageJ 1.52a (National Institutes of Health, EUA) e as imagens foram analisadas individualmente. O valor médio das proteínas de cada amostra foi calculado e plotado no gráfico.

**Figura 8** – Sistema automatizado de microscopia epi fluorescente de alta resolução (ImageXpress® Micro).



**Figura 8** – (A) Monitores para análise das imagens coletadas através do (B) microscópio de alta resolução – Laboratório de Bioquímica e biologia molecular – Responsável: Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, UFSCar (São Carlos/SP).

## 5.8 ANÁLISE E PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. A normalidade e homogeneidade foram verificadas com os testes de Shapiro-Wilk e Levene ( $p > 0,05$ ). O teste de tempo limite ( $t_{lim}$ ) foi analisado por meio do teste  $t$  para amostras independentes. A análise de variância (ANOVA) One-Way e Two-Way foram utilizadas para diversos parâmetros nos capítulos 1 e 2 dispostos na sessão “resultados” (para maiores detalhes ver: Resultados – Capítulo 1 e 2 - “Statistical analysis”). Quando apropriado, utilizamos o teste post hoc de Newman-Keuls. Foi estabelecido um nível de significância de 5% para todas as análises e foi utilizado o Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.; Tulsa, OK, EUA). Análise do tamanho do efeito (TE) foi usada como um teste complementar. Os limiares para efeitos pequenos, moderados e grandes foram 0,20, 0,50 e 0,80, respectivamente. O TE foi determinado pela fórmula:  $(m\u00e9dia1 - m\u00e9dia2) / m\u00e9dia\ desvio\ padr\u00e3o$  (Cohen D., 1988)

## 6 RESULTADOS

Como previamente mencionado acima, a sessão resultados será apresentada em formato de artigo e será dividida em capítulo 1 e 2.

### 6.1 CAPÍTULO 1

O presente artigo foi aceito para publicação pela revista Scientific Reports (fator de impacto: 4,379) e está de acordo com as normas da mesma.

## ACUTE MELATONIN ADMINISTRATION IMPROVES EXERCISE TOLERANCE AND THE METABOLIC RECOVERY AFTER EXHAUSTIVE EFFORT

### ABSTRACT

The present study investigated the effects of acute melatonin administration on the biomarkers, muscle energy substrates, GLUT4, and FAT CD36 of skeletal muscle and its performance in rats that were subjected to exhaustive swimming exercise at an intensity corresponding to the maximal aerobic capacity (iMAC). Sixty-eight Wistar rats were allocated into seven groups: a control (Ct), rats treated with melatonin and euthanized 1 h (M1) or 3 h after the last procedures (M3), rats that exercised and were euthanized 1 h (Ex1) or 3 h after the time to exhaustion (*t*lim) (Ex3), and rats that were treated with melatonin, exercised, and were euthanized 1 h (ME1) or 3 h after *t*lim (ME3). After the incremental tests, the animals received melatonin (10 mg.kg<sup>-1</sup>) or vehicles 30 minutes prior to *t*lim. Afterwards, the animals were euthanized and the soleus muscles were collected for an immunofluorescence analysis, the blood was collected for the determination of the glycemic and triglyceridemic concentrations, and the gluteus maximus was collected for the assessment of the contents of glycogen and triglycerides. In conclusion, melatonin increased the availability of glycidic substrates and GLUT4, improved exercise tolerance, and, after exercise, accelerated the recovery of muscle energy substrates with GLUT4 and FAT CD36.

**Key words:** glycogen and triglyceride; ergogenic aid; aerobic exercise; N-acetyl-5-methoxytryptamine; GLUT4; FAT CD36.

### INTRODUCTION

The regulatory role of exogenous melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine; molecular weight: 232 kDa) in circadian and seasonal rhythms has been well established [1]; nevertheless, there is growing evidence that broadly demonstrates several other functions, including antioxidant properties [2-5], anti-inflammatory effects [6], changes in energy metabolism [7], the prevention and/or inhibition of cancer development [8,9], and the treatment of neurological diseases [10], diabetes [7,11], sleep disorders [12], and obesity [7,13]. Beyond these features, studies have also demonstrated the ergogenic effects of melatonin on performance in physical exercise [14,15].

Physical exercise depends on the intermediary metabolism for ATP resynthesis—mainly through the chemical transformation of carbohydrates and lipids—as the intramuscular ATP concentration limits (~5 mmol per kg of wet muscle) the contractile activity for extended periods [16]. A substantial increase in muscle glucose uptake is fundamental in sustaining the energy needed for endurance exercise [17], and this occurs through facilitated diffusion, which is carried out by the translocation of the glucose transporter (GLUT4) to the sarcolemma and transverse tubes [18]. A single physical exercise session can increase the GLUT4 content [11,19-21], thus improving glucose uptake and the consequent oxidation or glycogen storage during recovery. As the duration of the exercise increases, a greater supply of substrates is

necessary, such as carbohydrates from the liver or intestine, free fatty acids (FFAs) released from adipose tissue, and intramuscular triglycerides [22-24]. Thus, endurance exercise requires an enhanced pool of fatty acid translocase CD36 (FAT CD36) in the sarcolemma and mitochondrial membrane in order to increase the uptake and oxidation rate of FFAs [25-27]. A single physical exercise session is also known to increase FAT CD36 in the skeletal muscle of rats [28], thus possibly influencing the energy metabolism for the next exercise session. In this scenario, some studies have demonstrated the effects of melatonin by increasing the content of glycogen in the muscles and liver and altering the bioavailability of blood glucose and plasma free fatty acids after long-term acute exercise [29-32].

Compelling evidence has shown carbohydrate dependence during high-intensity, long-term exercise [16,22,34] and that its reduction is a limiting factor for performance [35]. Therefore, considering the modulating role of melatonin in energy metabolism [32] and its ability to increase performance in long-term physical exercises [14,15], it is necessary to study its influence on glucose and free fatty acid transporters in skeletal muscle—beyond the substrates themselves—in order to confirm and better understand the mechanism of the ergogenic effect. In addition, if melatonin positively influences the GLUT4 and FAT CD36 in exercised muscle, it could accelerate the metabolic recovery, which would be a considerable advantage in future efforts, at least from the bioenergetic point of view. Nevertheless, no studies have shown the effects of melatonin administration on the content of energy substrates and their transporters (GLUT4 and FAT CD36) in skeletal muscle several hours after a long-term exercise session. Thus, the present study aimed to investigate the effects of melatonin on the energy substrates in the plasma and muscle, as well as GLUT4 and FAT CD36 in the skeletal muscle, in rats that were subjected to exhaustive swimming exercise at an intensity corresponding to the maximal aerobic capacity. We hypothesized that melatonin administration increases the GLUT4, FAT CD36, and energy substrates in exercised skeletal muscle, thus enhancing performance in terms of endurance and metabolic recovery.

## **METHODS**

### **ANIMALS AND ENVIRONMENTAL CONDITIONS**

Sixty-eight male *Rattus norvegicus albinus* (Wistar) rats that were 45 days old were housed in a bioterium and kept in polypropylene cages (length: 40 cm, width: 40 cm, height: 20 cm, and 5 animals per cage); they received feed and water ad libitum. Throughout the experiment, the environmental conditions were maintained, including the temperature ( $22 \pm 2$



°C), relative humidity (45% and 55%), noise (<85 decibels), and photoperiod (10:14 h light/dark cycle). Incandescent lamps (Philips's brand, soft model, 100 W, 2700 K; 565–590 nm; 60 lux, measured with a lux meter) were used during the 10-hour light cycle. To carry out experimental interventions with the rats during the dark cycle (nighttime: 4:00 pm to 6:00 am), reflectors were installed in the bioterium and room and were surrounded by a red filter (ROSCO brand, model # fire19; >600 nm; <15 lux) [14,15,36]. The experimental procedures were conducted in accordance with Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA, Brazil) and was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of Federal University of São Carlos (São Paulo, Brazil) under protocol no. 9144181218. The experimental procedures were conducted in accordance with the Ethical Principles in Animal Research (ARRIVE guidelines 2.0).

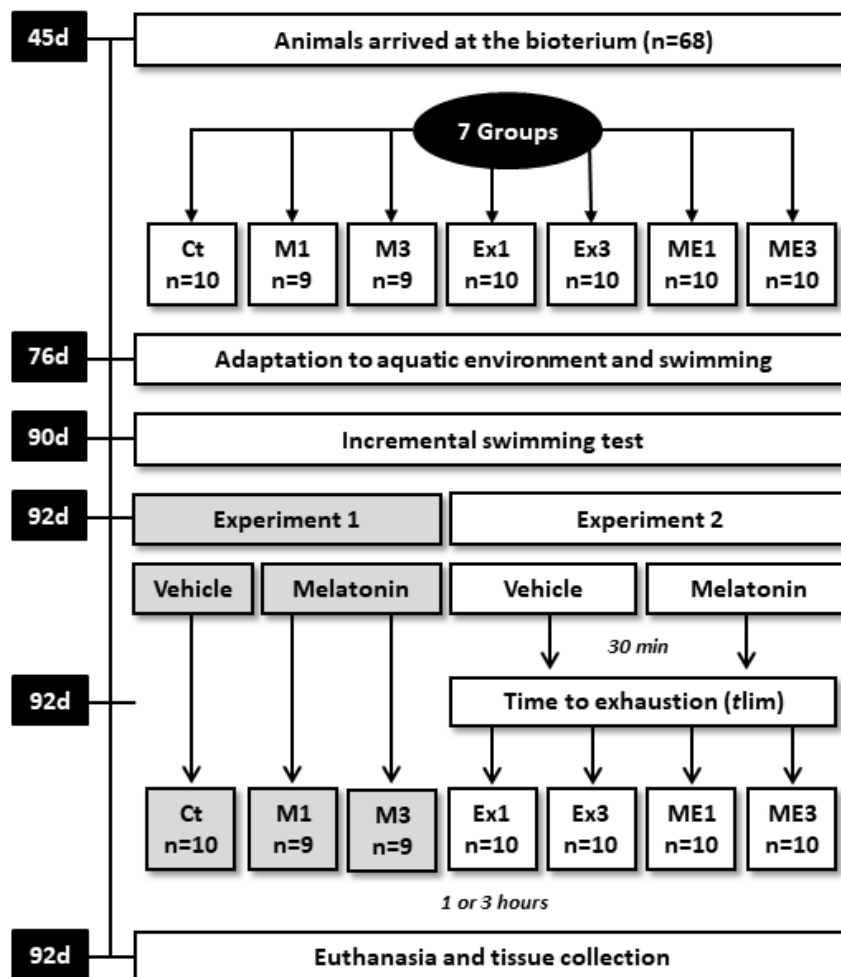
## EXPERIMENTAL DESIGN

The animals (n = 68) were randomly split into 7 groups: a control (Ct: n = 10), rats treated with melatonin and euthanized 1 h (M1: n = 9) or 3 h after the last procedures (M3: n = 9), rats that exercised and were euthanized 1 h (Ex1: n = 10) or 3 h after the time to exhaustion (*t*<sub>lim</sub>) (Ex3: n = 10), and rats that were treated with melatonin, exercised, and were euthanized 1 h (ME1: n = 10) or 3 h after *t*<sub>lim</sub> (ME3: n = 10). The animals in the Ct, Ex1, and Ex3 groups received vehicles, while the animals in the M1, ME1, M3, and ME3 groups received melatonin (10 mg.kg<sup>-1</sup>); both were administered in the same volume. The M1, Ex1, and ME1 groups and the M3, Ex3, and ME3 groups were euthanized 1 and 3 hours after the end of the experimental procedures for each group, respectively. The experiments were divided into experiment 1 (Ct, M1, and M3) and experiment 2 (Ex1, Ex3, ME1, and ME3).

After the housing familiarization period, when they were from 76 to 89 days old, all of the rats were adapted to aquatic environments and swimming according to a protocol from Lima et al. [37] that focused on the exposure time in water (5–20 minutes), water depth (10–80 cm), and load weight (0 or 3% of the body mass). The swimming protocol was individualized in cylindrical and opaque tanks that were 100 cm in height (80 cm in water depth) and 30 cm in diameter; the water temperature was maintained at 31 ± 1 °C in accordance with the guidelines of the American Physiological Society [38]. When they were 90 days old, all animals were submitted to an incremental test (IT) to determine the intensity of the effort corresponding to the individuals' maximal aerobic capacities.

At 92 days old, the animals (body mass: 398.06 ± 3.80 g at the end of the experiment) received melatonin or vehicles from 30 minutes before the swimming exercise until exhaustion

at the intensity corresponding to the maximal aerobic capacity, which was called the time to exhaustion (*t*<sub>lim</sub>). The criteria for identifying the animals' exhaustion were standardized according to Beck and Gobatto [36]; an analysis of the swimming behaviors of the animals was performed to observe the execution of vigorous efforts in returning to the surface without success for a period of 15 seconds. The achievement of exhaustion was accepted upon the agreement of two experienced observers using the above criteria. Then, the animals were euthanized 1 or 3 hours after the end of the experiment via decapitation, a method that is allowed by the American Veterinary Medical Association [39]. The experimental design is shown in Figure 9.



**Figure 9.** Chronological sequence of events that occurred during the experiments. Control group (Ct); rats treated with melatonin and euthanized 1 hour (M1) or 3 hours after the last procedures (M3); rats that exercised and were euthanized 1 hour (Ex1) or 3 hours after *t*<sub>lim</sub> (Ex3); rats that were treated with melatonin, exercised, and were euthanized 1 hour (ME1) or 3 hours after *t*<sub>lim</sub> (ME3). d: days; min: minutes.

## INCREMENTAL SWIMMING TEST

The IT consisted of proportional increases in the load over time in order to identify a disproportionate increase in the concentration of blood lactate at a given moment [40], which was called the maximal aerobic capacity. Therefore, the animals were subjected to five-minute stages with overloads corresponding to 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, and 7.0% of their body mass (% BM); these overloads were attached to the animals' chests with an elastic strap. After each stage, blood samples (25  $\mu$ L) were collected from the distal part of the animals' tails and then stored (4 °C) in order to determine the lactate concentration. After analyzing the lactate concentration with the enzymatic method, the intensity of the exercise in relation to the blood lactate concentration was plotted on a scatter plot, and any changes in the blood lactate concentration were identified through visual inspection, as previously described by Matsumoto et al. [41]. Then, two linear regressions were constructed after the breaking point. The intersection of these linear regressions was interpolated to the X-axis and then used to define the intensity corresponding to the anaerobic lactic acid threshold [40]. The interpolation for line y corresponded to the blood lactate concentration at the intensity of the maximal aerobic capacity.

## MELATONIN ADMINISTRATION

Melatonin (Sigma Aldrich Chemical Corporation; St Louis, MO, USA; M-5250, >98%) was dissolved in ethanol (<0.1%) and diluted in saline (0.9% NaCl) for administration at 10 mg.kg<sup>-1</sup> [14,15]. The preparation was carried out just prior to its use, and it was stored in an amber bottle that was wrapped in aluminum foil. Administration was intraperitoneal and took place 30 minutes prior to the *flim*.

## ANALYTICAL PROCEDURES ON BIOLOGICAL MATERIALS

### **Plasma and Serum Parameters**

During the IT, blood samples (25  $\mu$ L) were collected from the animals' tails in heparinized and calibrated glass capillaries. These samples were immediately transferred to 1.5 mL tubes containing 400  $\mu$ L of trichloroacetic acid (4%), which were then agitated and stored at 4 °C. After stirring and centrifuging (3000 rpm for 3 minutes), 50  $\mu$ L of supernatant was extracted and transferred to a 96-well microplate, where added 250  $\mu$ L of reactive solution that was prepared for immediate use (glycine/EDTA and hydrazine hydrate stock), NAD ( $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide), and LDH (L-lactic dehydrogenase bovine heart) were added; the pH was properly adjusted to 9.45 before the added of NAD and LDH. The samples

and reagent were incubated (20 minutes, 37 °C) and the absorbance was determined in a spectrophotometer (Spectramax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA) at 340 nm. The blood lactate concentration was determined in relation to the standard curve constructed from the serial dilution of L-Lactate 1 to 15 mmol/L.

After euthanasia, an aliquot of approximately 2.0 mL of blood was obtained and allowed to rest for 20 minutes (4 °C) before a subsequent centrifugation (15 minutes, 3000 rpm, 10 °C). These samples were stored at –20 °C for further analysis.

For the glucose analysis, 3 µL of serum was mixed with the kit reagent (300 µL; LaborLab; Guarulhos, SP, Brazil) and incubated for 25 minutes (25 °C); GOD ( $\geq 15$  kU/L), POD ( $\geq 2$  kU/L), 4-AAT (0.5 mmol/L), phosphates (pH = 7.5, 250 mmol/L), and phenol (5 mmol/L). The glucose absorbance was determined in a spectrophotometer (SpectraMax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA) at 505 nm according to the kit's guidelines.

To determine the triglyceride concentration, 3 µL of serum was mixed with the kit reagent (300 µL; LaborLab; Guarulhos, SP, Brazil) and incubated for 20 minutes (25 °C); good (pH = 6.8, 50 mmol/L), chlorophenol (2 mmol/L), lipoprotein lipase ( $\geq 800$  U/L), GK ( $\geq 500$  U/L), GPO ( $\geq 1500$  U/L), POD ( $\geq 900$  U/L), ATP (2 mmol/L), and 4-AF (0.4 mmol/L). The triglyceride absorbance was determined in a spectrophotometer (SpectraMax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA) at 505 nm according to the kit's guidelines.

### **Skeletal muscle glycogen**

The procedure was performed according to the method presented by Dubois et al. [42]. Firstly, skeletal muscle tissue (200–250 mg; gluteus maximus) was digested in potassium hydroxide (KOH 30%). Then, a saturated sodium sulfate solution (20 µL, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and ethanol (3 mL, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH 70%) were added for the precipitation of glycogen. The samples were submitted to the colorimetric phenol (10 µL, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O) and sulfuric (2.0 mL, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) method and measured via spectrophotometry (Hach Company, Loveland, Colo, USA; 490 nm) against a standard glucose curve.

### **Skeletal muscle triglyceride**

Initially, skeletal muscle tissue (100–200 mg; gluteus maximus) and Triton X-100 (1%) were mixed at the same proportions (200 mg of tissue to 1 mL of Triton). Next, the samples were homogenized with magnet bars (5 x 3 mm) overnight (2–8 °C) and centrifuged (10 minutes, 4000 rpm). After this period, 10 µL of the supernatant was extracted, pipetted into a 96-well microplate in a mixture with the kit reagent (200 µL; LaborLab; Guarulhos, SP, Brazil),

and incubated for 20 minutes (25 °C); good (pH = 6.8, 50 mmol/L), chlorophenol (2 mmol/L), lipoprotein lipase ( $\geq 800$  U/L), GK ( $\geq 500$  U/L), GPO ( $\geq 1500$  U/L), POD ( $\geq 900$  U/L), ATP (2 mmol/L), and 4-AF (0.4 mmol/L). The triglyceride absorbance was determined in a spectrophotometer (SpectraMax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA) at 505 nm according to the kit's guidelines.

### **Histological and immunofluorescence procedures**

Immediately after euthanasia, the soleus muscle was dusted in talc, frozen in liquid nitrogen, and stored ( $-80$  °C). Transversal histological frozen sections (6  $\mu\text{m}$ ) were obtained from a cryostat ( $-25$  °C; Leica CM 1850 UV) and collected on glass slides (26 x 76 mm). Prior to the immunofluorescence protocol, the slides were stained with Hematoxylin–Eosin (HE) in order to identify morphological changes in the tissue that could compromise the analysis with a light microscope.

For the quantification of GLUT4 and FAT CD36, the sections were double-stained with laminin (for the purpose of demarcating the cells). The slides were incubated with a mix of primary anti-mouse monoclonal antibodies for GLUT4 (dilution 1:1600; Santa Cruz Biotechnology, INC; Dallas, Texas, USA) or for FAT CD36 (dilution 1:400; Santa Cruz Biotechnology, INC; Dallas, Texas, USA), in combination with anti-rabbit laminin (dilution 1:200; Abcam; Ab11575; Cambridge, UK) diluted in 1% BSA (Bovine Serum Albumin – Sigma Aldrich Chemical Corporation, St Louis, MO, USA), for 45 minutes at 37 °C. After this period, the sections were washed in PBS solution (three cycles of 5 minutes), and a mix of secondary antibodies was added: Alexa 488 IgG<sup>1</sup> to mark GLUT4 with a green color (dilution 1:1000; Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC.; West Grove, PA, USA) or Alexa 594 IgM to mark FAT CD36 with a red color (dilution 1:1000; Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC.; West Grove, PA, USA), in combination with Alexa Fluor 647 IgG (dilution 1:200; Invitrogen; Carlsbad, California, USA) to mark laminin with a red color or Alexa Fluor 488 IgG to mark laminin with a green color (dilution 1:200; Invitrogen; Carlsbad, California, USA); this procedure was performed for 35 minutes at 37 °C. The sections were washed again with PBS solution (3 cycles of 5 minutes) and mounted with FluoroQuest<sup>TM</sup> Mounting Medium (AAT Bioquest<sup>®</sup>, INC, Sunnyvale, CA, USA).

The slides were photographed with an automated high-resolution epifluorescent microscopy system (ImageXpress<sup>®</sup> Micro, Molecular Devices; San José, CA, USA) using an objective lens with a magnification of 20x, with specific filters for GLUT4 (FITC—1000–1200

ms exposure), FAT CD36 (Cy5—1800–2200 ms exposure), and laminin (FITC and Cy5—200 ms exposure). The images were saved with an identical size and resolution.

The integrated density of the fluorescence intensity of GLUT4 and FAT CD36 was quantified in five distinct and random fields (height: 220 and width: 220) by the ImageJ 1.52a software (National Institutes of Health, USA), and the images were individually analyzed. The mean values of the proteins in each sample were calculated and plotted in a graph.

## STATISTICAL DATA ANALYSIS AND PROCESSING

The data were presented as mean  $\pm$  standard error. Normality was verified with the Shapiro–Wilk test ( $p > 0.05$ ). The time to exhaustion was analyzed with the *t*-test for independent samples by using pooled data from all exercised animals that were treated with melatonin (ME1 and ME3) versus exercised animals that were treated with a vehicle (Ex1 and Ex3). A one-way analysis of variance was performed for all the parameters of experiment 1 (experiment 1: Ct, M1, and M3) and for lactacidemia and % BM in experiment 2. A two-way analysis of variance was performed for the other parameters in experiment 2—the effects of melatonin (melatonin or vehicle) and the time of euthanasia (1 or 3 h) (experiment 2: Ex1, Ex3, ME1, and ME3). When appropriate, we used the Newman–Keuls post hoc test. A significance level of 5% was established for all analyses, and Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.; Tulsa, OK, USA) was used. The effect size (ES) analysis was used as a complementary test. The thresholds for small, moderate, and large effects were 0.20, 0.50, and 0.80, respectively. The ES was determined with the formula:  $(\text{mean1} - \text{mean2}) / \text{pooled SD}$  [43].

## RESULTS

### EXPERIMENT 1—ACUTE ADMINISTRATION OF MELATONIN INCREASES GLYCOGEN CONTENT AND GLUT4 IN RESTING SKELETAL MUSCLE

#### **Energy substrates in the muscle and blood**

There was an increase in glycogen content in the M1 and M3 groups with respect to the Ct group ( $F = 8.85$ ,  $p < 0.01$ ). No differences among the groups were found for the muscle triglycerides, blood glucose, or blood triglyceride ( $F = 1.06$ ,  $F = 3.11$ , and  $F = 0.36$ , respectively;  $p > 0.05$ ) (Table 1). Large effects were demonstrated when comparing Ct with M1 ( $p = 0.021$ , ES: 1.59) and Ct with M3 ( $p = 0.001$ , ES: 2.12) in terms of the muscle glycogen content.

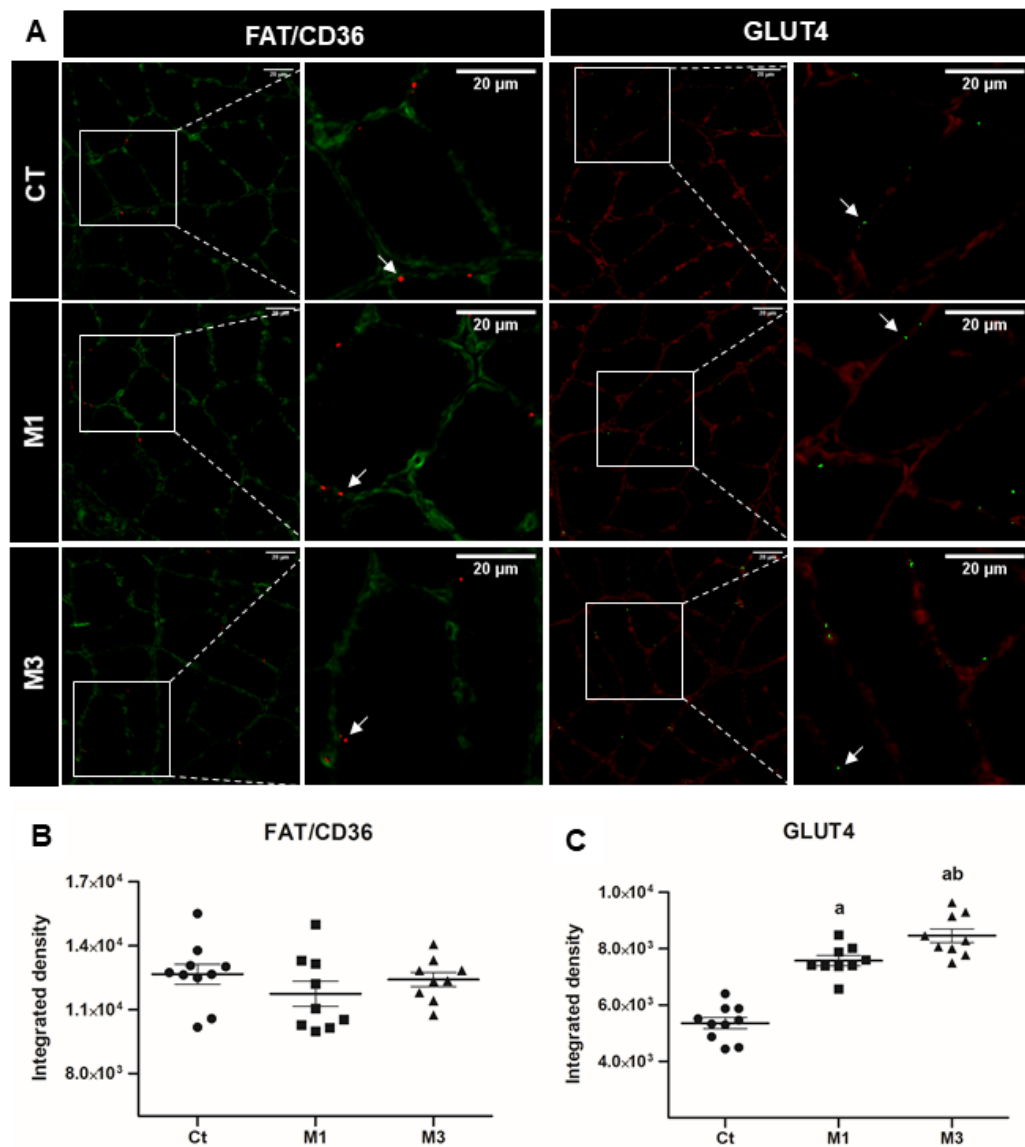
Table 2. Data on the muscular glycogen and triglyceride content and blood glucose and triglyceride concentrations in the groups that were treated with the vehicle (Ct) or melatonin (M1 and M3) and euthanized 1 (M1) or 3 (M3) hours after the last procedures.

	<b>Ct</b>	<b>M1</b>	<b>M3</b>
Muscle glycogen (mg/g)	4.97±0.01	6.08±0.02 <sup>a</sup>	6.84±0.03 <sup>a</sup>
Muscle triglyceride (mg/g)	1.16±0.04	1.12±0.02	1.19±0.01
Blood glucose (mg/dL)	132.69±6.43	153.17±6.67	145.01±4.10
Blood triglyceride (mg/dL)	96.04±5.10	91.28±4.60	98.62±7.90

Control group (Ct); rats treated with melatonin and euthanized 1 hour (M1) or 3 hours after the last procedures (M3). Values are expressed as mean and standard error. <sup>a</sup> $p < 0.05$  with respect to Ct for the same parameter. g: grams; mg: milligrams; dL: deciliters.

### **Muscle GLUT4 and FAT CD36**

GLUT4 increased in the M1 and M3 groups compared to the Ct group ( $F = 60.70$ ,  $p < 0.05$ ). Otherwise, no differences among the groups were observed for FAT CD36 ( $F = 0.99$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig. 10). Large effects were demonstrated when comparing Ct with M1 ( $p = 0.0001$ , ES: 3.84), Ct with M3 ( $p = 0.0001$ , ES: 4.57), and M1 with M3 ( $p = 0.0006$ , ES: 1.39) in terms of muscle GLUT4.



**Figure 10.** GLUT4 and FAT CD36 in skeletal muscles. Representative samples of laminin (green) with FAT CD36 (red) in the soleus skeletal muscle with immunofluorescence (A). Representative samples of laminin (red) with GLUT4 (green) in the soleus skeletal muscle with immunofluorescence (A) in the control group (Ct) and rats treated with melatonin and euthanized 1 hour (M1) or 3 hours after the last procedures group (M3). The white arrows indicate FAT CD36 and GLUT4 in the soleus skeletal muscle. The figures represent the means and standard errors of the FAT CD36 (B) and of the GLUT4 (C). <sup>a</sup> $p < 0.05$  with respect to Ct; <sup>b</sup> $p < 0.05$  with respect to M1 for the same parameter. For the illustration, an objective lens = 20x was used; bars = 20  $\mu$ m; zoom = 300 height and 300 width.

## EXPERIMENT 2—MELATONIN IMPROVES PERFORMANCE AND ACCELERATES METABOLIC RECOVERY IN SKELETAL MUSCLE

### Incremental test and time to exhaustion at maximal aerobic capacity

As expected, in the ITs, lactacidemia and the percentage of body mass (% BM) did not show differences when comparing all seven groups (Ct:  $4.14 \pm 0.24$ ; M1:  $3.39 \pm 0.28$ ; M3:  $3.56$



$\pm 0.40$ ; Ex1:  $3.71 \pm 0.22$ ; Ex3:  $3.88 \pm 0.37$ ; ME1:  $3.96 \pm 0.27$ ; ME3:  $4.06 \pm 0.20$  mM and Ct:  $5.42 \pm 0.26$ ; M1:  $5.41 \pm 0.15$ ; M3:  $5.56 \pm 0.20$ ; Ex1:  $5.11 \pm 0.18$ ; Ex3:  $5.30 \pm 0.15$ ; ME1:  $5.81 \pm 0.14$ ; ME3:  $5.46 \pm 0.15$  % BM;  $F = 0.69$  and  $F = 1.49$ , respectively;  $p > 0.05$ ). Regarding  $t_{lim}$ , melatonin increased the performance (ME1 and ME3;  $78.30 \pm 9.36$  min;  $p = 0.01$ , ES: 0.99, 49.42%) compared to the performance with the vehicle (Ex1 and Ex3;  $52.40 \pm 5.25$  min).

### **Energy substrates in the muscles and blood**

The glycogen content increased in the gluteus maximus at 3 h compared to that at 1 h ( $F = 15.57$ ,  $p < 0.01$ ; 3 h > 1 h), while the groups that exercised and received melatonin did not experience a difference in glycogen content compared to the animals that received the vehicle ( $F = 1.12$ ,  $p = 0.72$ ). For the muscle triglyceride, the time and treatment did not promote an effect on the gluteus maximus ( $F = 0.70$ ,  $p = 0.40$  and  $F = 0.05$ ,  $p = 0.80$ , respectively) (Table 3). Large effects on the glycogen content were demonstrated when comparing Ex1 with ME3 ( $p = 0.041$ , ES: 2.09), Ex3 with ME1 ( $p = 0.012$ , ES: 1.25), and ME1 with ME3 ( $p = 0.004$ , ES: 3.09). Large effects on the triglyceride content were observed when comparing Ex1 with Ex3 ( $p = 0.019$ , ES: 1.74), Ex1 with ME1 ( $p = 0.007$ , ES: 1.34), Ex3 with ME3 ( $p = 0.018$ , ES: 1.84), and ME1 with ME3 ( $p = 0.004$ , ES: 1.42).

The blood triglyceride concentration was higher at 1 h than that at 3 h ( $F = 54.39$ ,  $p < 0.01$ ; 3 h < 1 h), while the blood glucose remained unchanged between the animals that were euthanized 1 or 3 hours after  $t_{lim}$  ( $F = 0.82$ ,  $p = 0.36$ ). Moreover, melatonin decreased the serum triglyceride concentration ( $F = 9.50$ ,  $p < 0.01$ ), but did not cause a change in the blood glucose compared to animals that received the vehicle ( $F = 1.16$ ,  $p = 0.28$ ) (Table 3). Large effects on the blood glucose concentration were demonstrated when comparing Ex1 with Ex3 ( $p = 0.026$ , ES: 1.52) and Ex3 with ME3 ( $p = 0.035$ , ES: 1.19). Large effects on the blood triglyceride concentration were noted when comparing Ex1 with Ex3 ( $p = 0.004$ , ES: 1.69), Ex3 with ME1 ( $p = 0.004$ , ES: 1.61), Ex1 with ME3 ( $p = 0.0001$ , ES: 3.17), Ex3 with ME3 ( $p = 0.0004$ , ES: 1.81), and ME1 with ME3 ( $p = 0.0001$ , ES: 3.20).

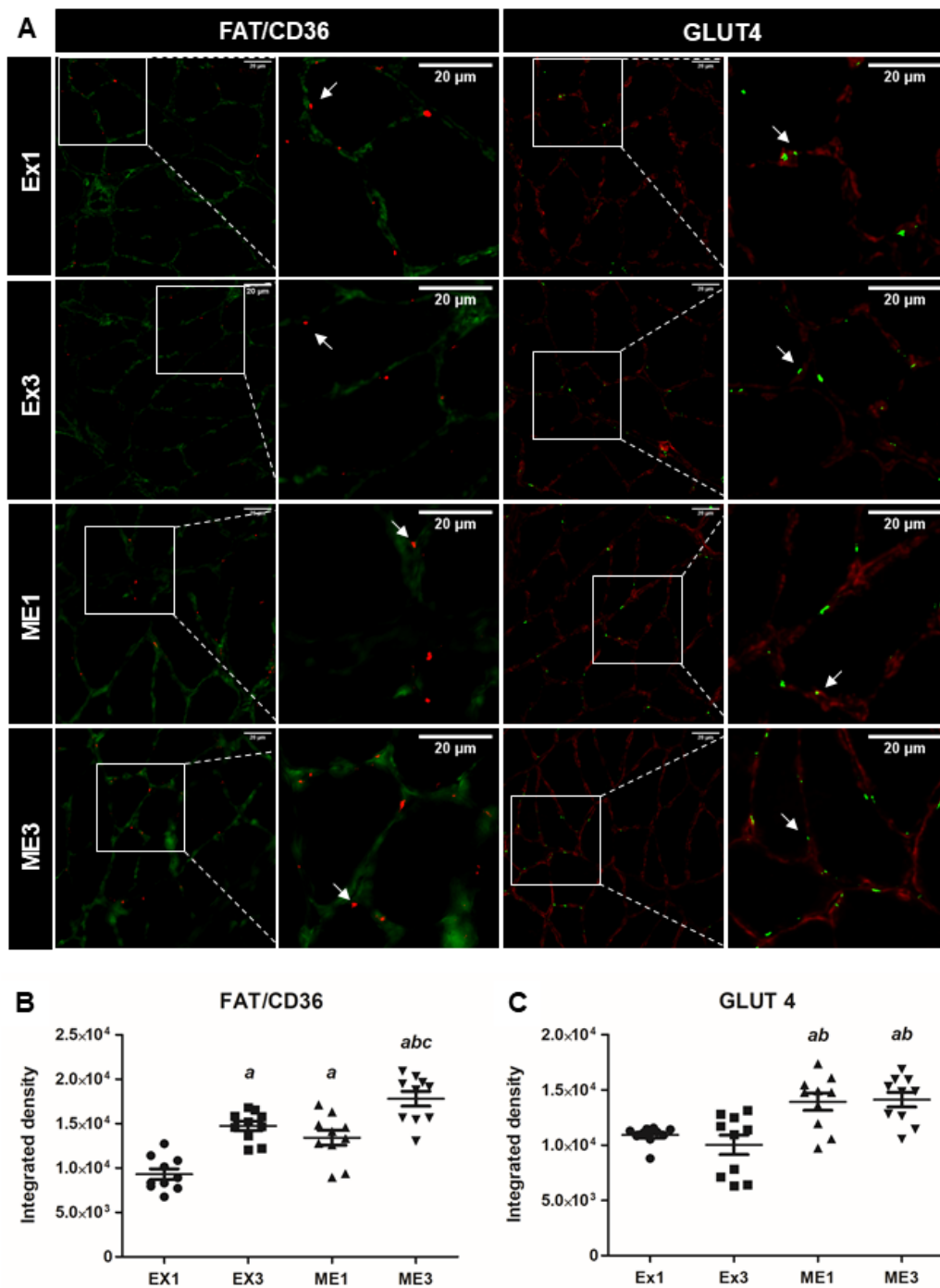
Table 3. Data on the muscular glycogen and triglyceride content, as well as the blood glucose and triglyceride concentrations, in the exercised groups (Ex1, Ex3, ME1, and ME3), those treated with the vehicle (Ex1 and Ex3) or melatonin (ME1 and ME3), and those euthanized 1 (Ex1 and ME1) or 3 (Ex3 and ME3) hours after *tlim*.

	<b>Ex1</b>	<b>Ex3</b>	<b>ME1</b>	<b>ME3</b>
Muscle glycogen (mg/g)	4.19±0.03	5.44±0.06	3.49±0.03 <sup>b</sup>	5.82±0.01 <sup>ac</sup>
Muscle triglyceride (mg/g)	1.16±0.04	1.36±0.03 <sup>a</sup>	1.43±0.08 <sup>a</sup>	1.12±0.04 <sup>bc</sup>
Blood glucose (mg/dL)	108.27±4.22	138.21±8.71 <sup>a</sup>	122.81±8.01	106.96±7.94 <sup>b</sup>
Blood triglyceride (mg/dL)	126.14±4.05	106.82±3.56 <sup>a</sup>	123.97±3.52 <sup>b</sup>	84.35±4.72 <sup>abc</sup>

Rats that exercised and were euthanized 1 hour (Ex1) or 3 hours after *tlim* (Ex3); rats that were treated with melatonin, exercised, and were euthanized 1 hour (ME1) or 3 hours after *tlim* (ME3). Values are expressed as the mean and standard error. <sup>a</sup> $p < 0.05$  with respect to Ex1; <sup>b</sup> $p < 0.05$  with respect to Ex3; <sup>c</sup> $p < 0.05$  with respect to ME1 for the same parameter. g: grams; mg: milligrams; dL: deciliters.

### Muscle GLUT4 and FAT CD36

Melatonin increased GLUT4 ( $F = 26.83$ ,  $p < 0.01$ ) without a time effect ( $F = 0.25$ ,  $p = 0.61$ ). Furthermore, the effects of melatonin and time (3 h > 1 h) increased FAT CD36 ( $F = 25.28$ ,  $p < 0.01$  and  $F = 47.56$ ,  $p < 0.01$ , respectively) (Fig. 11). Large effects on GLUT4 were demonstrated when comparing Ex1 with ME1 ( $p = 0.003$ , ES: 1.85), Ex3 with ME1 ( $p = 0.001$ , ES: 1.49), Ex1 with ME3 ( $p = 0.006$ , ES: 2.20), and Ex3 with ME3 ( $p = 0.001$ , ES: 1.68). Large effects on FAT CD36 were obtained when comparing Ex1 with Ex3 ( $p = 0.0001$ , ES: 3.05), Ex1 with ME1 ( $p = 0.0003$ , ES: 1.80), Ex1 with ME3 ( $p = 0.0001$ , ES: 3.76), Ex3 with ME3 ( $p = 0.004$ , ES: 1.43), and ME1 and ME3 ( $p = 0.0004$ , ES: 1.67).



**Figure 11.** GLUT4 and FAT CD36 in the skeletal muscle. Representative samples of laminin (green) with FAT CD36 (red) in the soleus skeletal muscle with immunofluorescence (A). Representative samples of laminin (red) with GLUT4 (green) in the soleus skeletal muscle with immunofluorescence (A) in rats that exercised and were euthanized 1 hour (Ex1) or 3 hours after *tlim* (Ex3) and rats that were treated with melatonin, exercised, and were euthanized 1 hour (ME1) or 3 hours after *tlim* (ME3). The white arrows indicate FAT CD36 and GLUT4 in the soleus skeletal muscle. The figures show the means and standard errors of FAT CD36 (B) and of GLUT4 (C). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  with respect to Ex1; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  with respect to Ex3; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  with respect to ME1 for the same parameter. For the illustration, objective lens = 20x was used; bars = 20  $\mu$ m; zoom = 300 height and 300 width.

## DISCUSSION

The main finding of this study was the ability of melatonin to increase GLUT4, FAT CD36, and the metabolic recovery process in exercised skeletal muscle favoring cellular environment for future efforts, which corroborated our hypothesis. In addition, this is the first study to highlight the acute effect of melatonin administration on energy substrate transporters, as well as melatonin's role in the metabolic recovery of rats that were submitted to an individualized exhaustive exercise session with an intensity corresponding to maximal aerobic capacity.

In experiment 1, we observed that the acute administration of melatonin increased the muscular glycogen content ( $p < 0.05$ ; 22.33% and 37.62%, M1 and M3 > Ct, respectively). This was associated with an increase in the GLUT4 presented by the animals that were treated with melatonin compared to the animals treated with the vehicle ( $p < 0.05$ ; 41.87% and 57.87%, M1 and M3 > Ct, respectively). It is well known that melatonin acts by binding to membrane receptors that are coupled to G proteins (MTNR1A or MT1 and MTNR1B or MT2) [44], which are present in the membranes of skeletal muscles (BioGPS (<http://biogps.gnf.org>)); this causes an increase in the activity of IRS-1 and PI3K [45]. These upstream signals are responsible for raising the activity and content of GLUT4 in a way that is similar to insulin signaling.

Considering the robust effect of melatonin on muscular glycogen content (as observed in experiment 1) and the importance of the oxidation of carbohydrates during exercise, we investigated the effects of melatonin in animals that exercised at their maximal aerobic capacity and were euthanized at different times after the exercise. Therefore, the intensity of the effort was individually determined by using an incremental test; no differences were demonstrated between the groups ( $p > 0.05$ ) for lactacidemia or % BM before the  $t_{lim}$ . Then, the ergogenic capacity of melatonin was confirmed by the time to exhaustion ( $t_{lim}$ ) (Ex1 and Ex3,  $52.40 \pm 19.66$  min; ME1 and ME3,  $78.30 \pm 32.43$  min;  $p = 0.01$ ). These findings corroborate those of previous studies published by our group, which demonstrated high performance in  $t_{lim}$  by animals treated with melatonin during periods of wakefulness ( $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) [14,15].

According to Bergstrom et al. [46], an increased glycogen content is one of the main determinants for performance in moderate and prolonged exercise. In addition, the dependence on carbohydrates in high-intensity and long-term physical exercises is well recognized [47]. To confirm this, previous studies by our group demonstrated that, when submitted to endurance exercise until exhaustion at individualized intensities of effort corresponding to the maximal aerobic capacity, Wistar rats (92 days old) showed a depletion of the glycogen content in the gluteus maximus immediately after swimming exercise, among other effects ( $p < 0.05$ ) [48]. In addition, Matsui et al. [49] demonstrated that as the duration of the exercise increased, the

glycogen content was observed to decrease after the effort. Based on these assumptions, animals treated with melatonin were expected to show lower values for the muscular glycogen content, as they swam longer than animals treated with the vehicle ( $p = 0.01$ , 49.42%). However, in the analysis of the muscular glycogen content, despite the ME1 group showing a reduction with respect to the Ex1 group (16.7%), the values were found to be statistically equal ( $p > 0.05$ ). This possibly occurred due to the ability of melatonin to increase the glycogen content ( $p < 0.05$ ; M1 and M3  $>$  Ct), thus improving the rats' performance in the exercise. Therefore, the data indicated that melatonin is one of the factors responsible for the better performance due to the increase in the pre-effort glycogen stores (as seen in the M1 and M3 groups), thus consequently increasing the time until exhaustion during the swimming exercise at an intensity corresponding to the maximal aerobic capacity (as seen in the ME1 and ME3 groups).

Regarding the metabolic recovery, in the presence of melatonin, the animals euthanized 3 h after  $t_{lim}$  (ME3) showed an increase in glycogen content with respect to the animals euthanized 1 h after  $t_{lim}$  (ME1) ( $p < 0.05$ ; 40.03%). However, in the absence of melatonin, no differences in glycogen content were demonstrated when comparing the Ex3 and Ex1 groups ( $p > 0.05$ ). Moreover, no statistical differences were observed between the ME3 and Ex3 groups ( $p > 0.05$ ); however, the ME3 group swam longer than the Ex3 group ( $p < 0.05$ ). Based on these results, in the presence of melatonin, the metabolic recovery after exercise until exhaustion was improved. The enhancement of the glycogen content possibly occurred due to the increase in the GLUT4 demonstrated by the animals treated with melatonin (ME1 and ME3) in comparison to the animals treated with the vehicle (Ex1 and Ex3,  $p < 0.05$ ), thus increasing the uptake of glucose in the skeletal muscles after exercise. These data are consistent with the findings of Mendes et al. [50], who demonstrated an increase in the content of PI3K, GLUT4, and glycogen stores in the skeletal muscles of rats that were submitted to treadmill training (20 m.min<sup>-1</sup>, 5 days.week<sup>-1</sup>, 16 weeks) and treated with melatonin (10 mg.kg.day<sup>-1</sup>, 8 weeks).

Regarding the metabolism of lipids, the muscular triglyceride content of the ME1 group was higher than that of the Ex1 group ( $p < 0.05$ ), which was possibly due to the increase in the FAT CD36 shown by the ME1 group compared to Ex1 group ( $p < 0.05$ ). Interestingly, in the absence of melatonin, such an increase with respect to the Ex1 group ( $p < 0.05$ ) occurred only 3 hours after the  $t_{lim}$  (Ex3). Due to the increase in FAT CD36 in comparison to Ex1 ( $p < 0.05$ ), it also occurs only 3 hours after the  $t_{lim}$  (Ex3). Therefore, melatonin enhances the triglyceride content 1 h after exercise, which possibly improves the metabolic recovery process. Assuming that the activation pathway of FAT CD36 is similar to that of GLUT4 [51,52] and given the presence of MTNR1A/MTNR1B in the skeletal muscles of rats [45] (BioGPS

(<http://biogps.gnf.org>)), we believe that the enhancement of FAT CD36 was possibly influenced by melatonin through its binding to the MTNR1B receptor and, consequently, its activation of PI3K, IRS [45], DAG, IP3, PLC, and Ca<sup>2+</sup> [44]. However, there are no studies concerning the effects of acute melatonin administration on the content of FAT CD36 in exercised skeletal muscles. Furthermore, the ME3 group showed a reduction in the muscle triglyceride content in comparison to the ME1 group ( $p < 0.05$ ), which was possibly due to the greater use of fat while resting, which is considered an optimal muscle environment for fat oxidation and the consequent supply of ATPs for the post-exercise recovery. In addition, the reduction demonstrated by the ME3 group possibly occurred due to the increase in FAT CD36 in the ME3 group ( $p < 0.05$ ), which consequently increased the transport of triglyceride from the blood to the skeletal muscles to be oxidized. Thus, it would be plausible to affirm the ability of melatonin to accelerate the metabolic recovery processes related to carbohydrate metabolism and to modulate the supply of lipids after exhaustive exercise.

Some limitations in this manuscript must be addressed. First, other dosages should be tested in order to demonstrate the lowest concentration of melatonin that would make it possible to achieve similar effects. Finally, we focused on transporters and their respective substrates; however, evaluating the activation of upstream signals would be quite enlightening. However, our findings make clear that future studies must be conducted in order to deepen the knowledge on this relevant area.

In conclusion, the present study demonstrated that melatonin increased the availability of glycidic substrates and GLUT4 in skeletal muscles and consequently provided a greater tolerance to physical exercise. In addition, melatonin improved the efficiency of the recompositing of energetic substrates and enhanced GLUT4 and FAT CD36 in the exercised skeletal muscles, thus improving the cellular environment for future efforts, at least from the bioenergetic point of view.

## REFERENCES

1. Reiter, R. J., Tan, D. X., & Fuentes-Broto, L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog. Brain Res.* 181, 127-151 (2010).
2. Reiter, R. J. et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J. Pineal Res.* 61, 253-278 (2016).
3. Manchester, L. C. et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J. Pineal Res.* 59, 403-419 (2015).
4. Galano, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. Melatonin: a versatile protector against oxidative DNA damage. *Molecules.* 23, 530 (2018).

5. Rodriguez, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* 36, 1-9 (2004).
6. Mauriz, J. L., Collado, P. S., Veneroso, C., Reiter, R. J., & González-Gallego, J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J. Pineal Res.* 54, 1-14 (2013).
7. Cipolla-Neto, J., Amaral, F. G., Afeche, S. C., Tan, D. X., & Reiter, R. J. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *J. Pineal Res.* 56, 371-381 (2014).
8. Zare, H., Shafabakhsh, R., Reiter, R. J., & Asemi, Z. Melatonin is a potential inhibitor of ovarian cancer: molecular aspects. *J. Ovarian Res.* 12, 1-8 (2019).
9. Li, Y. et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget.* 8, 39896 (2017).
10. Gunata, M. E. H. M. E. T., Parlakpınar, H. A. K. A. N., & Acet, H. A. Melatonin: A review of its potential functions and effects on neurological diseases. *Revue neurologique.* 176, 148-165 (2019).
11. Sharma, S., Singh, H., Ahmad, N., Mishra, P., & Tiwari, A. The role of melatonin in diabetes: therapeutic implications. *Arch Endocrinol Metab.* 59, 391-399 (2015).
12. Xie, Z. et al. A review of sleep disorders and melatonin. *Neurological Res.* 39, 559-565 (2017).
13. Xu, P. et al. Melatonin prevents obesity through modulation of gut microbiota in mice. *J. Pineal Res.* 62, e12399 (2017).
14. Beck, W. R., Botzelli, J. D., Pauli, J. R., Ropelle, E. R., & Gobatto, C. A. Melatonin has an ergogenic effect but does not prevent inflammation and damage in exhaustive exercise. *Sci. Rep.* 5, 1-10 (2015).
15. Beck, W. R., Scariot, P. P. M., & Gobatto, C. A. Melatonin is an ergogenic aid for exhaustive aerobic exercise only during the wakefulness period. *Int. J. Sports Med.* 37, 71-76 (2016).
16. Hargreaves, M., & Spriet, L. L. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nat. Metab.* 2, 817-828 (2020).
17. Klip, A., McGraw, T. E., & James, D. E. Thirty sweet years of GLUT4. *J. Biol. Chem.* 294, 11369-11381 (2019).
18. Richter, E. A. Is GLUT4 translocation the answer to exercise-stimulated muscle glucose uptake?. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 320, E240-E243 (2021).
19. Chibalin, A. V. et al. Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 38-43 (2000).
20. Ren, J. M., Semenkovich, C. F., Gulve, E. A., Gao, J., & Holloszy, J. O. Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J. Biol. Chem.* 269, 14396-14401 (1994).
21. Goodyear, L. J., Hirshman, M. F., Smith, R. J., & Horton, E. S. Glucose transporter number, activity, and isoform content in plasma membranes of red and white skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 261, E556-E561 (1991).

22. Burke, L. M., & Hawley, J. A. Swifter, higher, stronger: What's on the menu?. *Sci.* 362, 781-787 (2018).
23. Watt, M. J., Heigenhauser, G. J., Dyck, D. J., & Spriet, L. L. Intramuscular triacylglycerol, glycogen and acetyl group metabolism during 4 h of moderate exercise in man. *J. Physiol.* 541, 969-978 (2002).
24. Holloszy, J. O., Kohrt, W. M., & Hansen, P. A. The regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. *Front.Biosci.* 3, D1011-D1027 (1998).
25. Smith, B. K., Bonen, A., & Holloway, G. P. A dual mechanism of action for skeletal muscle FAT CD36 during exercise. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 40, 211-217 (2012).
26. Holloway, G. P. Mitochondrial function and dysfunction in exercise and insulin resistance. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 34, 440-446 (2009).
27. Bonen, A. PGC-1 $\alpha$ -induced improvements in skeletal muscle metabolism and insulin sensitivity. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 34, 307-314 (2009).
28. Greene, N. P. et al. Regulators of blood lipids and lipoproteins? PPAR $\delta$  and AMPK, induced by exercise, are correlated with lipids and lipoproteins in overweight/obese men and women. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303, E1212-E1221 (2012).
29. Bicer, M. et al. Interactive effects of melatonin, exercise and diabetes on liver glycogen levels. *Endokrynol. Pol.* 62, 252-256 (2011).
30. Kaya, O., Kilic, M., Celik, I., Baltaci, A. K., & 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, 241-244 (2010).
31. Sánchez-Campos, S. et al. Effects of melatonin on fuel utilization in exercised rats: role of nitric oxide and growth hormone. *J. Pineal Res.* 31, 159-166 (2001).
32. Mazepa, R. C., Cuevas, M. J., Collado, P. S., & Gonzalez-Gallego, J. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Sci.* 66, 153-160 (2000).
33. Burke, L. M., & Hawley, J. A. Swifter, higher, stronger: What's on the menu?. *Sci.* 362, 781-787 (2018).
34. Leckey, J. J., Burke, L. M., Morton, J. P., & Hawley, J. A. Altering fatty acid availability does not impair prolonged, continuous running to fatigue: evidence for carbohydrate dependence. *J. Appl. Physiol.* 120, 107-113 (2016).
35. Krssak, M. et al. Intramuscular glycogen and intramyocellular lipid utilization during prolonged exercise and recovery in man: a <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 748-754 (2000).
36. Beck, W., & Gobatto, C. Effects of maximum intensity aerobic swimming exercise until exhaustion at different times of day on the hematological parameters in rats. *Acta Physiol. Hung.* 100, 427-434 (2013).
37. Lima, A. A. D. et al. Two water environment adaptation models enhance motor behavior and improve the success of the lactate minimum test in swimming rats. *Motriz.* 23, (2017).



38. APS. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. *Am. J. Physiol.* 137, 2006.
39. American Veterinary Medical Association. *AVMA Guidelines on Euthanasia*. AVMA, Schaumber, Illinois, 2013.
40. Zagatto, A. M., Papoti, M., & Gobatto, C. A. Validity of critical frequency test for measuring table tennis aerobic endurance through specific protocol. *J. Sports Sci & Med.* 7, 461 (2008).
41. Matsumoto, I. et al. Effects of swimming training on aerobic capacity and exercise induced bronchoconstriction in children with bronchial asthma. *Thorax.* 54, 196-201 (1999).
42. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356 (1956).
43. Cohen D. Statistical power analysis for the behavioral sciences (second edition). Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale (1988).
44. Amaral, F. G. D., Andrade-Silva, J., Kuwabara, W. M., & Cipolla-Neto, J. New insights into the function of melatonin and its role in metabolic disturbances. *Expert. Ver. Endocrinol. Metab.* 14, 293-300 (2019).
45. Ha, E. et al. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. *J. Pineal Res.* 41, 67-72 (2006).
46. Bergström, J., Hermansen, L., Hultman, E., & Saltin, B. Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol. Scand.* 71, 140-150 (1967).
47. Hawley, J. A., & Leckey, J. J. Carbohydrate dependence during prolonged, intense endurance exercise. *Sports Med.* 45, 5-12 (2015).
48. Beck, W. F., De Araujo, G. G., Menezes Scariot, P. P., Masselli dos Reis, I. G., & Gobatto, C. A. Time to exhaustion at anaerobic threshold in swimming rats: metabolic investigation. *Bratisl. Lek. Listy.* 115, 617-621 (2014).
49. Matsui, T. et al. Brain glycogen decreases during prolonged exercise. *J. Physiol.* 589, 3383-3393 (2011).
50. Mendes, C. et al. Adaptations of the aging animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin. *J. Pineal Res.* 55, 229-239 (2013).
51. Holloway, G. P., Luiken, J. J. F. P., Glatz, J. F. C., Spriet, L. L., & Bonen, A. Contribution of FAT CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview. *Acta Physiol. Scand.* 194, 293-309 (2008).
52. Koonen, D. P., Glatz, J. F., Bonen, A., & Luiken, J. J. Long-chain fatty acid uptake and FAT CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 1736, 163-180 (2005).

## 6.2 CAPÍTULO 2

O presente artigo está de acordo com as normas da revista – Journal of Sport and Health Science (fator de impacto: 7.179) e encontra-se em fase de preparação para submissão.

### MELATONIN INCREASES EXERCISE PERFORMANCE AND IMPROVES THE METABOLIC RECOVERY AFTER EXHAUSTIVE EXERCISE.

#### ABSTRACT

Compelling evidences has demonstrated the effect of melatonin on exhaustive exercise tolerance and its modulatory role on muscle energy substrates. However, no study has demonstrated the effect of melatonin in the replacement of skeletal muscle energy substrates few hours after exercise. Thus, the aim of the present study was determined the effects of acute melatonin administration on PGC-1 $\alpha$  and NRF-1, and its modulatory role on energy substrates in rats that were subjected to exhaustive swimming exercise at an intensity corresponding to the maximal aerobic capacity (iMAC). Thirty-nine Wistar rats were allocated into four groups: a control (Ct), rats treated with melatonin (Mel), rats that were exercised (Ex), and rats that were treated with melatonin and exercised (MEx). After the incremental tests, the animals received melatonin (10 mg.kg<sup>-1</sup>) or vehicles 30 minutes prior to time to exhaustion test (*t*<sub>lim</sub>). Afterwards, the animals were euthanized 3 hours after *t*<sub>lim</sub> and the soleus muscles were collected for an immunofluorescence analysis, the gluteus maximus, red and white gastrocnemius were collected for the assessment of the contents of glycogen and triglycerides, and liver for the measurement of glycogen content. The animals treated with melatonin (MEx) swam higher than animals treated with vehicle (Ex;  $p < 0.01$ , ES: 1.17, 120,26%). PGC-1 $\alpha$  and NRF-1 increased in animals that were exercised and treated with melatonin (MEx) with respect to the control animals (Ct;  $p < 0.05$ ), however, only PGC-1 $\alpha$  enhanced when compared to the exercised animals (Ex). Regarding energy substrates, melatonin reduced the triglyceride content in gluteus maximus, red and white gastrocnemius ( $F = 6.66$ ,  $F = 4.51$ , and  $F = 6.02$ ,  $p < 0.05$ ). On the other hand, in the presence of melatonin, there was an overcompensation of glycogen content in the red gastrocnemius of the animals that were exercised (MEx;  $p = 0.01$ , ES: 1.71), however, this no occurs in the absence of melatonin (Ex;  $p > 0.05$ ) with respect to the control animals (Ct). In conclusion, melatonin potentiates the exercise-mediated increases in PGC-1 $\alpha$ , decreased the triglyceride content and improve the recovery of glycogen in skeletal muscle. In addition, melatonin enhanced exercise tolerance, and, after exercise, modulate the muscle energy substrates use.

**Keywords:** PGC-1 $\alpha$  and NRF-1; ergogenic aid; N-acetyl-5-methoxytryptamine; Glycogen and Triglyceride; Aerobic exercise.

#### INTRODUCTION

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine – molecular weight: 232.28 kDa), considered an indoleamine with amphiphilic characteristics (Amaral et al., 2019). Although melatonin is mainly produced by the pineal gland and directly released into the blood or cerebrospinal fluid, it is also found in several extra pineal organs, including: brain, retina, liver, skeletal muscle, and others (Acuña-Castroviejo et al., 2014). Compelling evidences has

demonstrated the regulatory role of melatonin on circadian and seasonal rhythms (Reiter et al., 2010), antioxidant (Reiter et al., 2016; Manchester et al., 2015; Galano et al., 2011, Rodriguez et al., 2011, Rodriguez et al., 2004) and anti-inflammatory effects (Mauriz et al., 2013), among others. Besides the well-established effects in the literature, our research group and others has demonstrated the effect of melatonin on exhaustive exercise tolerance in nocturnal animals (Beck et al., 2015, 2016) and its modulatory role on muscle energy substrates immediately after exercise (Sanchez-Campos et al., 2001; Mazepa et al., 2000). However, no study has demonstrated the effect of melatonin in the replacement of skeletal muscle energy substrates few hours after exercise.

Skeletal muscle comprises the biggest portion of total body mass (30% to 40%) (Duchesne et al., 2017; Jung and Kim, 2014;) and is considered the major site of energy turnover, which makes it central player to whole-body metabolism (Halling and Pilegaard, 2020). In this scenario, it is necessary an energy coin (ATP; adenosine triphosphate) to maintain cellular homeostasis, and on growth and locomotion (Seebacher et al., 2010). However, the intramuscular ATP concentration is limited and insufficient to sustain the contractile activity of muscle cells during long-term and high-intensity physical exercise. Making necessary a higher supply of ATP produced by the mitochondria, through the oxidation of carbohydrates and lipids. Therefore, mitochondrial capacity for substrate oxidation in skeletal muscle is the major determinant of metabolic health, avoiding metabolic disturbances, as well as exercise performance (Halling et al., 2019), and recovery, through the improvement of ATP production.

The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) is a transcriptional coactivator that interacts with nuclear respiratory factors 1 and 2 (NRF-1 and NRF-2) (Lira et al., 2010) to stimulate mitochondrial biogenesis (Seebacher et al., 2010). Beyond the well-established role on biogenesis and mitochondrial function, PGC-1 $\alpha$  is involved in the regulation of thermogenesis, energy metabolism, and others biological process (Lira et al., 2010). It's well known that, a single bout of exercise is able to increase PGC-1 $\alpha$  (Shute et al., 2018; Fujimoto et al., 2011; Seebacher and Glanville, 2010; Ikeda et al., 2008; Wright et al., 2007) and NRF-1 (Daussin et al., 2011; Seebacher and Glanville, 2010; Murakami et al., 1998).

Therefore, it is relevant to study the effect of acute administration of melatonin on PGC-1 $\alpha$  and NRF-1 – due the effect of melatonin on exhaustive exercise performance (Beck et al., 2015, 2016), and its modulatory role on skeletal muscle energy metabolism (Sanchez-Campos et al., 2001; Mazepa et al., 2000) – and the regulatory effect of PGC-1 $\alpha$  on mitochondrial function and biogenesis (Both et al., 2015; Seebacher et al., 2010), and its role on energy

metabolism during exercise, consequently improving exercise tolerance (Wong et al., 2015) and possibly improving the recovery after exhaustive exercise. Nevertheless, no studies have shown the effects of melatonin administration on the PGC-1 $\alpha$  and NRF-1, and its modulating role on energy substrates in skeletal muscle few hours after a long-term exhaustive exercise session. Thus, the present study aimed to determine the effects of melatonin on the energy substrates in the muscle and liver, as well as PGC-1 $\alpha$  and NRF-1 expression in the skeletal muscle, in rats that were subjected to exhaustive swimming exercise at an intensity corresponding to the maximal aerobic capacity. We hypothesized that acute melatonin administration increases PGC-1 $\alpha$ , NRF-1, and modulate the content of energy substrates in exercised skeletal muscle, consequently providing a better cellular environment for future efforts, through bioenergetic modulations.

## **METHODS**

### **ANIMALS AND ENVIRONMENTAL CONDITIONS**

Thirty-nine young male Wistar rats (45 days old at arrival; weighing: 120-150 g) were provided by Central Animal Biotery of the Federal University of São Carlos (Brazil). The animals were housed in controlled environmental conditions: temperature ( $22 \pm 2$  °C), relative humidity (between 45 – 55%), noise (< 85 decibels), and photoperiod (10:14 h light/dark cycle), as suggest by the guidelines for the housing of rats in scientific institutions (ARRP Guideline 20). Animals (4 – 5 per cage) received commercial chow and filtered water ad libitum. Incandescent lamps (Philips's brand, Soft model, 100 W, 2700 K; 565-590 nm; 60 lux, measured by a lux meter) were used during the 10-hour light cycle. To carry out experimental interventions with the rats during the dark cycle (nighttime: 4:00 p.m. to 6:00 a.m.), reflectors were installed surrounded by a red filter (ROSCO's brand, model # fire19; > 600 nm; < 15 lux) (Beck and Gobatto, 2013; Beck et al., 2015, 2016). All experimental procedures were conducted in accordance with Ethical Principles in Animal Research (ARRIVE guidelines 2.0), adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA, Brazil) and was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of Federal University of São Carlos (São Paulo, Brazil) under protocol no. 9144181218.

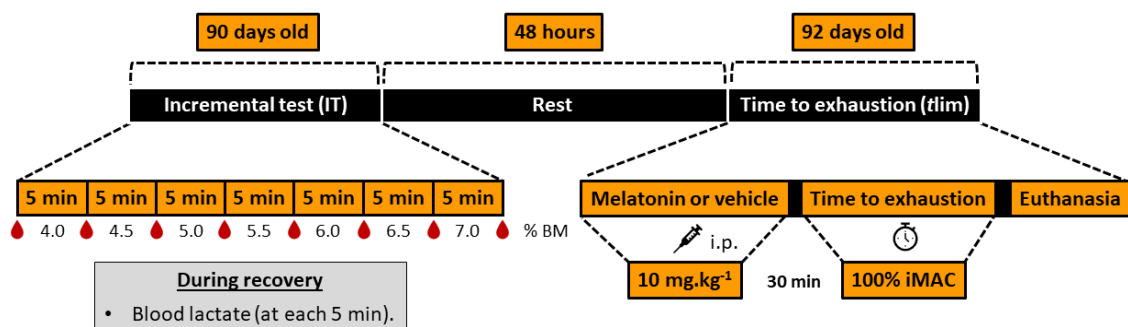
### **EXPERIMENTAL DESIGN**

The rats (n = 39) were randomly divided into four groups: a control (Ct: n = 10), rats treated with melatonin (Mel: n = 9), rats that were exercised (Ex: n = 10), and rats that were treated with melatonin and exercised (MEx: n = 10). The animals in the Ct and Ex groups

received vehicle solution (ethanol and NaCl, 0.9%), while Mel and MEx received melatonin ( $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). All the animals were euthanized 3 h after the end of the experimental procedures.

After environmental adaptation, from 76 to 89 days old, all the rats were adapted to aquatic environment and swimming exercise, considering a protocol adapted from Lima et al. (2017): exposure time in water (5 - 20 minutes), water depth (10 - 80 cm) and load weight (0 or 3% of body mass). Animals were introduced in individual swimming protocol, in cylindrical and opaque tanks – height: 100 cm (water depth: 80 cm), diameter: 30 cm, and water temperature:  $31 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , following the guidelines of the American Physiological Society (APS, 2006). At 90 days old, all animals were subjected to the incremental test (IT) to determine the intensity of effort corresponding to the individual maximal aerobic capacity (iMAC).

At 92 days old, the animals received melatonin (Mel and MEx) or vehicle (Ct and Ex) and after 30 minutes they were submitted to a swimming exercise until exhaustion in the iMAC (Ex and MEx), which was called the time to exhaustion test (*t*lim). The criterion for identifying the animal's exhaustion was standardized according Beck and Gobatto (2013): analysis of the swimming behavior was carried out in order to observe the execution of vigorous efforts without success in returning to the surface for a period of 15 seconds. In this way, exhaustion was accepted by the agreement of two experienced observers considering the above criteria. Then, the animals were euthanized 3 hours after the end of the experiment by decapitation, a method that is allowed by the American Veterinary Medical Association (2013). The chronological sequence of events occurred from 90 to 92 days old of the animals are detailed in figure 12.



**Figure 12.** Chronological sequence of events occurred from 90 to 92 days old of the animals. At 90 days old, all animals were subjected to the incremental test (IT) to determine the intensity of effort corresponding to the individual maximal aerobic capacity (iMAC). During the IT, the stages were separated by 30 seconds intervals in which blood samples ( $25 \mu\text{L}$ ) were collected. Afterward, the animals were submitted to the swimming exercise with increments of 0.5% of body mass (% BM) until exhaustion. 48 h later (rest period), the animals received melatonin (Mel and MEx groups:  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) or vehicle (NaCl 0.09%) and after 30 minutes they were submitted to the time to exhaustion test (*t*lim) at 100% of iMAC. The time to exhaustion was recorded and after 3 hours the animals were euthanized. min: minutes; i.p.: intraperitoneal.

## INCREMENTAL SWIMMING TEST

The incremental test (IT) consisted of proportional increases in the load over time in order to identify a disproportionate increase in the concentration of blood lactate at a given moment (Zagatto et al., 2008), called the maximal aerobic capacity. Therefore, the animals were subjected to five-minute stages with overloads corresponding to 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, and 7.0% of the body mass (% BM) attached to the animal's back through elastic strap. Each stage was separated by 30 seconds intervals in which blood samples (25  $\mu$ L) were collected from the tip of the animals' tail and then stored (4 °C) to determine lactatemia. After analyzing the lactate concentration by the enzymatic method, the intensity of the exercise with respect to the blood lactate concentration was plotted on a scatter plot and any change in the blood lactate concentration was identified by visual inspection, as previously described by Matsumoto et al. (1999). Then, two linear regressions were constructed following the break point and the intersection of these linear regressions interpolated to the X axis was used to define the intensity corresponding to the anaerobic lactacidemic threshold (Zagatto et al., 2008). The interpolation for line y corresponded to the blood lactate concentration in the intensity of maximal aerobic capacity (iMAC).

## MELATONIN ADMINISTRATION

Melatonin (Sigma Aldrich Chemical Corporation; St Louis, MO, USA; M-5250, > 98%) was dissolved in ethanol (< 0.1%) and diluted in saline (0.9% NaCl) for administration at 10 mg.kg<sup>-1</sup> (Beck et al., 2015, 2016). The preparation was performed prior to its use and stored in an amber bottle that was wrapped in aluminum foil. Administration was via intraperitoneally 30 minutes prior to the *t*lim.

## OBTAINING AND PROCESSING BIOLOGICAL MATERIALS

### **Determination of blood lactate concentration**

During the IT, blood samples (25  $\mu$ L) were collected from the animals' tails in heparinized and calibrated glass capillaries. Samples were deposited in plastic tubes (1.5 mL) containing 400  $\mu$ L of trichloroacetic acid (4%), agitated and stored at 4 °C. After stirring and centrifuging (3000 rpm for 3 minutes) 50  $\mu$ L of supernatant was extracted and transferred to a 96-well microplate, where were added 250  $\mu$ L of reactive solution prepared for immediate use

(glycine, EDTA, and hydrazine hydrate-based reagent, adjusted to a pH of 9.45, and were added  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), and L-lactic dehydrogenase bovine heart (LDH)). After incubation period (20 minutes, 37 °C), the samples were subjected to spectrophotometric measurement (Spectramax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA) at 340 nm comparing sample values to a standard curve constructed from serial dilution of L-Lactate 1 to 15 mmol/L.

#### **Determination of glycogen content**

Glycogen content within skeletal muscle (gluteus maximus, red and white portion of gastrocnemius) and liver were determined as described in Dubois et al. (1956). Skeletal muscle (250 mg) and liver (500 mg) were firstly digested in potassium hydroxide (30%; Êxodo Científica; Sumaré, SP, Brazil) and then mixed with saturated sodium sulfate solution (Dinâmica Química Contemporânea Ltda; Indaiatuba, SP, Brazil) and ethanol (70%) for precipitation of glycogen. Samples were homogenized with phenol (10  $\mu$ L; Êxodo Científica; Sumaré, SP, Brazil) and sulfuric acid (2 mL; Dinâmica Química Contemporânea Ltda; Indaiatuba, SP, Brazil), and heated in water bath for 5 minutes (85 °C). Finally, the absorbance was measured in spectrophotometry (Hach Company, Loveland, Colo, USA; 490 nm) and glycogen content was calculated using a calibration glucose curve.

#### **Determination of triglycerides content**

To determine triglyceride content, skeletal muscle (100 - 200 mg; gluteus maximus, red and white portion of gastrocnemius) were deposited in plastic tubes (1.5 mL) containing Triton X-100 (1%) at the same proportions (200 mg of tissue to 1 mL de Triton). Next, the samples were homogenized using magnetic bars (5 x 3 mm) overnight (4 °C). After this period, the samples were centrifuged (4000 rpm for 10 minutes) and 10  $\mu$ L of the supernatant was extracted, pipetted into a 96-well microplate in a mixture with the kit reagent (200  $\mu$ L; LaborLab; Guarulhos, SP, Brazil), and incubated for 20 minutes (25 °C). The triglycerides absorbance was performed in a spectrophotometer (SpectraMax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA) at 505 nm, according to the kit's guidelines.

#### **Histology and Immunofluorescence**

Immediately after euthanasia, the soleus muscle was dusted in talc, frozen in liquid nitrogen, and stored (-80 °C). Glass slides (26 x 76 mm) were prepared by sectioning the muscles (6  $\mu$ m) using a cryostat (Leica CM 1850 UV) at -25 °C. The sections were stained by Hematoxilin-Eosin (H&E, MERCK, Darmstadt, Germany) to identify morphological alteration

in tissue through a light microscope.

Immunofluorescence was applied to quantify NRF-1 and PGC-1 $\alpha$ . The slides with frozen sections were incubated in a mix of primary anti-mouse monoclonal antibodies for NRF-1 (dilution 1:500; Santa Cruz Biotechnology, INC; Dallas, Texas, USA) or for PGC-1 $\alpha$  (dilution 1:50; Santa Cruz Biotechnology, INC; Dallas, Texas, USA) conjugated with anti-rabbit laminin (dilution 1:200; Abcam; Ab11575; Cambridge, UK) diluted in 1% BSA (Bovine Serum Albumin – Sigma Aldrich Chemical Corporation, St Louis, MO, USA) for 45 minutes at 37 °C. Then, the slides were washed (3 cycles of 5 minutes) in PBS solution and incubated in a mix of secondary antibodies: Alexa 488 IgG<sup>1</sup> to mark NRF-1 in green color (dilution 1:1000; Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC.; West Grove, PA, USA) or Alexa Fluor 647 IgG<sub>2a</sub> to mark PGC-1 $\alpha$  in red color (dilution 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, INC; Dallas, Texas, USA), in combination with Alexa Fluor 647 IgG (dilution 1:200; Invitrogen; Carlsbad, California, USA) to mark laminin with a red color or Alexa Fluor 488 IgG to mark laminin with a green color (dilution 1:200; Invitrogen; Carlsbad, California, USA); for 35 minutes at 37 °C. The sections were washed (3 cycles of 5 minutes) in PBS solution and mounted with FluoroQuest<sup>TM</sup> Mounting Medium (AAT Bioquest<sup>®</sup>, INC, Sunnyvale, CA, USA).

The slides were analyzed with ImageXpress<sup>®</sup> Micro (Molecular Devices; San José, CA, USA) using an objective lens with magnification of 20x, with specific filters for NRF-1 (FITC - 1200 ms exposure), PGC-1 $\alpha$  (Cy5 – 2000 ms exposure), and laminin (FITC and Cy5 - 100 ms exposure). The integrated density of the fluorescence intensity of NRF-1 and PGC-1 $\alpha$  were quantified in five distinct and random fields (height: 220 and width: 220) by ImageJ 1.52a software (National Institutes of Health, USA) and the images were individually analyzed. The mean value of the proteins in each sample was calculated and plotted in a graph.

## STATISTICAL ANALYSIS

The data were presented as mean  $\pm$  standard error mean. Normality and homogeneity were verified with the Shapiro-Wilk and Levene tests ( $p > 0.05$ ), respectively. Time to exhaustion was analyzed through the *t*-test for independent samples comparing exercised animals treated with melatonin (MEx) versus exercised animals treated with vehicle (Ex). One-way analysis of variance was evaluated for lactacidemia and % BM. Two-way analysis of variance was analyzed to other parameters for the effects of melatonin (melatonin or vehicle) and exercise (exercised or non-exercised). When appropriated, we used the Newman-Keuls post hoc test. A significance level of 5 % was established for all analysis and Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.; Tulsa, OK, USA) was used. Effect size analysis (ES) was used as a complementary test.



The thresholds for small, moderate, and large effects were 0.20, 0.50, and 0.80, respectively. ES was determined by the formula:  $(\text{mean1} - \text{mean2})/\text{pooled standard deviation}$  (Cohen, 1988).

## RESULTS

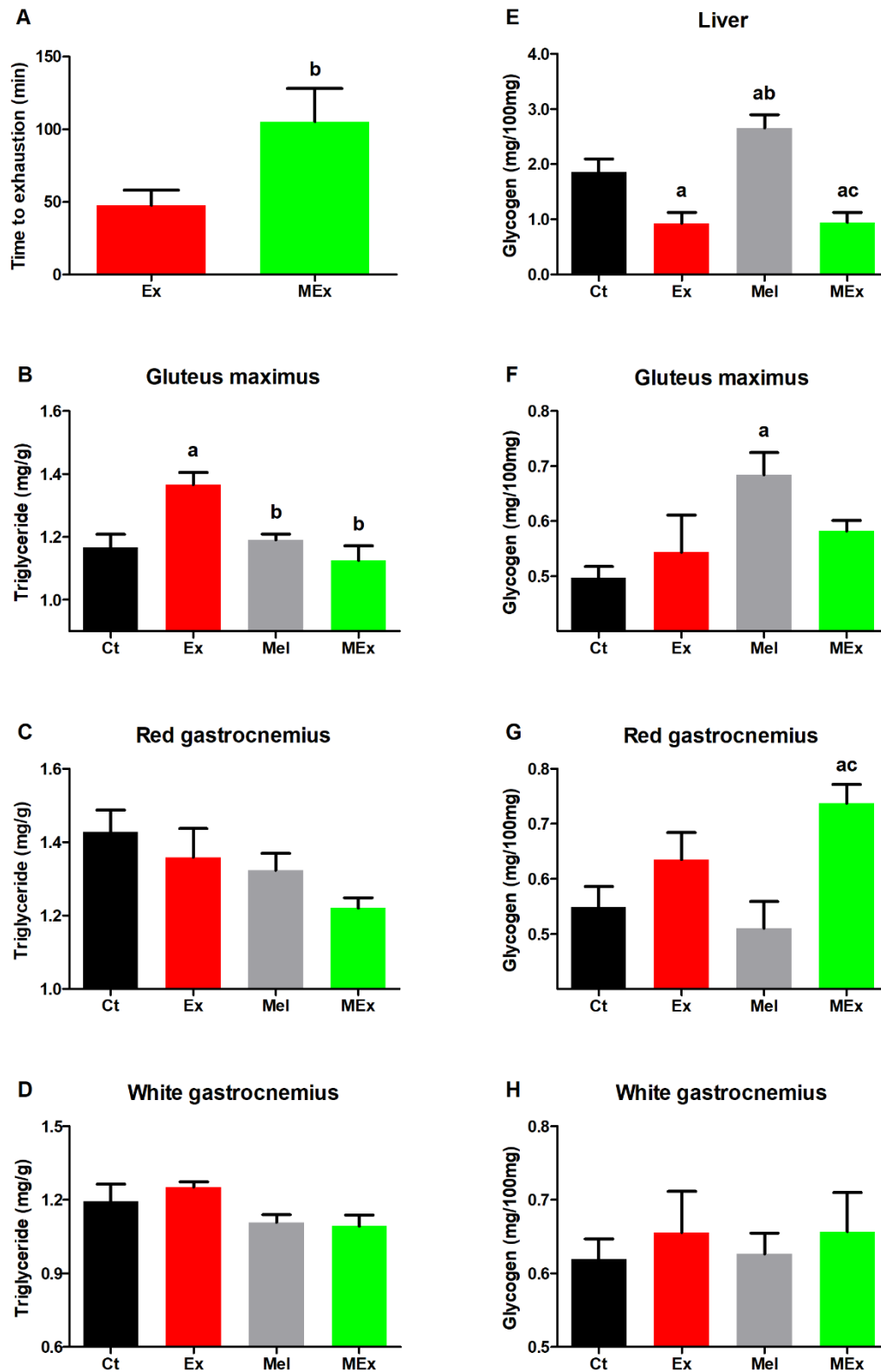
Lactacidemia and the percentage of body mass (%BM) in incremental test did not show differences when comparing all groups: Ct:  $4.08 \pm 0.29$ , Ex:  $3.93 \pm 0.41$ , Mel:  $3.56 \pm 0.41$ , and MEx:  $4.02 \pm 0.22$  mM and Ct:  $5.41 \pm 0.29$ , Ex:  $5.32 \pm 0.17$ , Mel:  $5.51 \pm 0.23$ , and MEx:  $5.46 \pm 0.17$  %BM ( $F = 0.41$ ,  $p = 0.74$  and  $F = 0.13$ ,  $p = 0.94$ ). Regarding  $\Delta\text{lim}$ , the animals treated with melatonin swam higher than animals treated with vehicle ( $p < 0.01$ , ES: 1.17, 120,26%).

Regarding energy substrates, the exercise increased the content of glycogen in red gastrocnemius ( $F = 13.32$ ,  $p < 0.01$ ) and decreased in liver ( $F = 37.70$ ,  $p < 0.01$ ), while no difference was observed in gluteus maximus and white gastrocnemius ( $F = 0.35$ ,  $p = 0.55$  and  $F = 0.56$ ,  $p = 0.45$ ). As for triglyceride content, exercise did not cause any change in skeletal muscle, such as: gluteus maximus ( $F = 2.51$ ,  $p = 0.12$ ), and red and white gastrocnemius ( $F = 2.23$ ,  $p = 0.14$  and  $F = 0.18$ ,  $p = 0.66$ , respectively).

Furthermore, melatonin increased the content of glycogen in gluteus maximus ( $F = 5.71$ ,  $p = 0.02$ ), while did not promote difference in liver ( $F = 3.59$ ,  $p = 0.06$ ), and red and white gastrocnemius ( $F = 0.55$ ,  $p = 0.46$  and  $F < 0.01$ ,  $p = 0.92$ , respectively). As for triglyceride content, melatonin caused a decrease in skeletal muscle, such as: gluteus maximus ( $F = 6.66$ ,  $p = 0.01$ ), red and white gastrocnemius ( $F = 4.51$ ,  $p = 0.04$  and  $F = 6.02$ ,  $p = 0.02$ ).

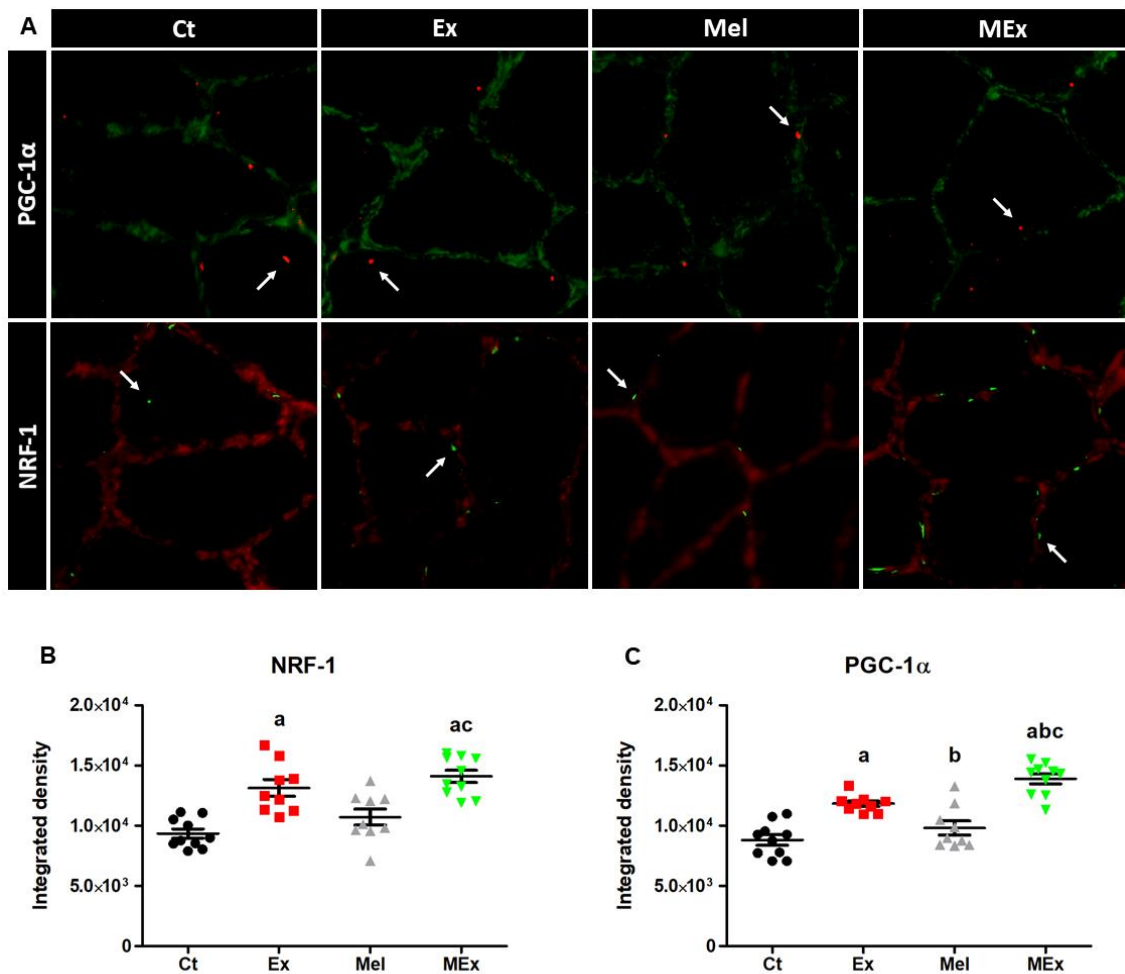
Large effects were demonstrated on glycogen content in liver (Ct vs Ex –  $p = 0.01$ , ES: 1.36; Ct vs Mel;  $p = 0.01$ , ES: 1.10; Ex vs Mel –  $p < 0.01$ , ES: 2.61; Ct vs MEx –  $p < 0.01$ , ES: 1.41; Mel vs MEx –  $p < 0.01$ , ES: 2.73), gluteus maximus (Ct vs Mel –  $p = 0.04$ , ES: 2.13) and red gastrocnemius (Ct vs MEx –  $p = 0.01$ , ES: 1.71; Mel vs MEx –  $p < 0.01$ , ES: 1.83). Large effects on the triglyceride content in gluteus maximus were noted when comparing Ct vs Ex ( $p < 0.01$ , ES: 1.63), Ex vs Mel ( $p < 0.01$ , ES: 2.22), Ex vs MEx ( $p < 0.01$ , ES: 1.84).

The exercise and melatonin increased PGC-1 $\alpha$  ( $F = 64.64$ ,  $p < 0.01$  and  $F = 12.00$ ,  $p < 0.01$ ) and NRF-1 ( $F = 39.81$ ,  $p < 0.01$  and  $F = 4.20$ ,  $p < 0.05$ ). Large effects on PGC-1 $\alpha$  were obtained when comparing Ct vs Ex ( $p < 0.01$ , ES: 2.84), Ex vs Mel ( $p < 0.01$ , ES: 1.64), Ct vs MEx ( $p < 0.01$ , ES: 3.69), Ex vs MEx ( $p < 0.01$ , ES: 2.00), Mel vs MEx ( $p < 0.01$ , ES: 2.64). Large effects on NRF-1 were showed when comparing Ct vs Ex ( $p < 0.01$ , ES: 2.84), Ct vs MEx ( $p < 0.01$ , ES: 3.69), Mel vs MEx ( $p < 0.01$ , ES: 1.87).



**Figure 13.** Time to exhaustion, glycogen content in skeletal muscle and liver, and triglyceride content in skeletal muscle. The graphs represent the means and standard errors of the time to exhaustion (A) triglyceride content in gluteus maximus (B), red (C) and white (D) gastrocnemius, and glycogen content in the liver (E), gluteus maximus (F), red (G) and white (H) gastrocnemius in control rats (Ct), rats treated with melatonin (Mel), rats that were exercised (Ex), and rats that

were treated with melatonin and exercised (MEx). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  with respect to Ct; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  with respect to Ex; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  with respect to Mel for the same parameter. mg: milligrams; g: grams; min: minutes.



**Figure 14.** NRF-1 and PGC-1 $\alpha$  in skeletal muscles. Representative samples of laminin (green) with PGC-1 $\alpha$  (red) in the soleus skeletal muscle with immunofluorescence (A). Representative samples of laminin (red) with NRF-1 (green) in the soleus skeletal muscle (A) with immunofluorescence in the control (Ct), rats treated with melatonin (Mel), rats that were exercised (Ex), and rats that were treated with melatonin and exercised (MEx). The white arrows indicate NRF-1 and PGC-1 $\alpha$  in the soleus skeletal muscle. The figures represent the means and standard errors of the NRF-1 (B) and of the PGC-1 $\alpha$  (C). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  with respect to Ct; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  with respect to Ex; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  with respect to Mel for the same parameter. For the illustration, an objective lens = 20x was used; bars = 20  $\mu$ m; zoom = 350 height and 350 width.

## DISCUSSION

The main findings of this study were the ability of melatonin to maximize the effect of exercise on PGC- $\alpha$  and NRF-1, and to modulate the energy substrates replacement after exhaustive exercise session, favoring cellular environment for future efforts, which confirming our hypothesis. In addition, this is the first study to highlight the acute effect of melatonin administration on PGC- $\alpha$  and NRF-1, and its influence on the replacement of energy substrates in rats that were submitted to an individualized exhaustive exercise session with an intensity corresponding to maximal aerobic capacity.

To evaluate the beneficial effect of melatonin and exercise on mitochondrial biogenesis, we quantify PGC-1 $\alpha$ , a transcriptional coactivator that functions as a master regulator of mitochondrial biogenesis (Both et al., 2015). Thus, PGC-1 $\alpha$  and NRF-1 of the animals treated with melatonin showed an increased compared to the animals treated with vehicle ( $F = 12.00$ ,  $p < 0.01$  and  $F = 4.20$ ,  $p < 0.05$ , respectively). These effects possibly occurred via melatonin receptors that were found to be present in the skeletal muscle membrane (Ha et al., 2006; BioGPS (<http://biogps.gnf.org>)). Thus, melatonin acts through the activation of CAMKII, inducing CREB phosphorylation, which increases the expression of PGC-1 $\alpha$  (Teodoro et al. 2014). The increase in PGC-1 $\alpha$  expression leads to activation of key genes involved in mitochondrial biogenesis, such as NRF-1 (Islam et al., 2019; Jung and Kim, 2014). It seems that the activation pathway of PGC-1 $\alpha$  is tissue dependent. In heart tissue, melatonin can act via AMPK-PGC-1 $\alpha$  to improve the mitochondrial biogenesis (Qi and Wang, 2020; Yu et al., 2016). Thus, more studies are necessary to better understand the pathways involved in the activation of PGC-1 $\alpha$  in skeletal muscle of animals treated with melatonin.

Regarding exercise effect, PGC-1 $\alpha$  and NRF-1 of animals that were exercised showed an increased with respect to the non-exercised animals ( $F = 64.64$ ,  $p < 0.01$  and  $F = 39.81$ ,  $p < 0.01$ ). It's well known that the exercise is one of the main stimuli for PGC-1 $\alpha$  activation. Thus, a single bout of exercise is able to activate calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK), p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), and phosphorylate AMP activated protein kinase (AMPK), which are the molecular signals responsible for the increase of PGC-1 $\alpha$  expression (Memme et al, 2021; Perry and Hawley, 2018; Lira et al., 2010; Bonen, 2009). Our results are in accordance with the literature, who demonstrated an increase in the expression and/or content of PGC-1 $\alpha$  (Shute et al., 2018; Fujimoto et al., 2011; Seebacher and Glanville, 2010; Ikeda et al., 2008; Wright et al., 2007) and NRF-1 (Daussin et al., 2011; Seebacher and Glanville, 2010; Murakami et al., 1998) in response to a single bout of exercise.

In the absence of a stressful stimulus, such as exhaustive physical exercise, melatonin did not cause any change in PGC-1 $\alpha$  and NRF-1 when compared to non-exercised animals treated with vehicle (Mel vs Ct group;  $p > 0.05$ ). On the other hand, in the presence of exhaustive physical exercise, melatonin maximizes the acute effects generated by contraction of skeletal muscle on PGC-1 $\alpha$  in relation to animals that were exercised and treated with vehicle solution (MEx vs Ex groups;  $p = 0.002$ , ES: 2.00). These results are in accordance with previous study reported by our research group and others, which demonstrated the effect of melatonin only in the presence of a stressful stimulus, such as exhaustive exercise (Beck et al., 2015), and

*in vitro* palmitic acid-induced insulin resistance model or *in vivo* pinealectomized rats (Teodoro et al., 2014).

Concerning exercise performance, compelling evidences has shown that skeletal muscle-specific PGC-1 $\alpha$  knock-out animals (PGC-1 $\alpha$  MKO) or whole-body PGC-1 $\alpha$  knock-out (PGC-1 $\alpha$  KO) caused a lower performance in isometric and dynamic muscle endurance, when comparing to the control animals, assed by muscle grip strength test ( $p < 0.05$ ) and graded exhaustive running treadmill exercise test ( $p < 0.05$ ), respectively (Handschin et al., 2007; Leone et al., 2005). According Leone et al. (2005), the exercise capacity was reduced in part due to the abnormalities in skeletal muscle mitochondrial structure and function of PGC-1 $\alpha$  KO animals, who showed lower  $VO_{2max}$  and fatigue resistance index than control mice ( $p < 0.05$ ).

On the contrary, skeletal muscle-specific PGC-1 $\alpha$  overexpressed animals (PGC-1 $\alpha$  MKC), reached a longer distance and a higher  $VO_2$  (Wong et al., 2015) and  $VO_{2peak}$  (Tadaishi et al., 2011) than control animals during graded maximal exercise test ( $p < 0.05$ ). Therefore, when analyzing our results, we believe that the increase in exhaustion time presented by animals treated with melatonin (MEx) compared to animals treated with vehicle ( $p < 0.01$ , ES: 1.17) may have occurred due to two factors: 1) the ability to melatonin in potentiating the effect of muscle contraction on PGC-1 $\alpha$  (as seen by MEx group with respect to Ex group;  $p = 0.002$ , ES: 2.00), thus allowing greater exercise tolerance. Indeed, Wong et al. (2015) and Tadaishi et al. (2011) demonstrated in their studies that there is a relationship between exercise tolerance and PGC-1 $\alpha$ ; 2) according Sanchez-Campos et al. (2001) and Mazepa et al. (2000), the animals that were treated with melatonin and were euthanized approximately 2 h (30 min + time to exhaustion) after administration of melatonin, demonstrated a higher liver and/or muscle glycogen content than control animals ( $p < 0.05$ ); a similar behavior was observed in ours results, who showed the ability of melatonin to increase the glycogen content in animals that were euthanized approximately 4 h (30 min + time to exhaustion + 3 hours) after the administration of melatonin (as seen by Mel group compared to Ct group, for gluteus maximus and liver ( $p < 0.05$ ; ES: 2.13 and ES: 1.10, respectively)) – thus, considering that this exercise model ( $tlim$ ) considerably depletes the muscle glycogen content (Beck et al., 2014), and its absence is a limiting factor for performance (Krssak et al., 2000), we believe that the increase in time to exhaustion ( $tlim$ ) presented by the MEx group compared to the Ex-group ( $p < 0.01$ , ES: 1.17) may also be due to the increase in the pre-exercise glycogen content. However, there are no studies involving the acute effect of melatonin on pre-exercise glycogen content (30 minutes after the administration) and its subsequent use during exhaustive exercise ( $tlim$ ). Thus, more studies must be conducted in order to confirm this initial hypothesis.

Regarding metabolic recovery, mitochondrial capacity for substrate oxidation in skeletal muscle is the major determinant of performance (Halling et al., 2019), as well as the metabolic recovery after exercise, through the replacement of glycogen. Besides the role on the biogenesis and mitochondrial function, PGC-1 $\alpha$  and NRF-1 are directly linked to the regulation of energy substrate for skeletal muscle (Bonen, 2009), resulting in a profound increase in the capacity of the skeletal muscle to use lipid substrate (Wong et al., 2015). In this scenario, we believe that the increase in PGC-1 $\alpha$  and NRF-1, take together with an optimal environment for fat oxidation after exercise, were responsible to maximize the oxidation of skeletal muscle triglyceride, as demonstrated for the animals treated with melatonin with respect to the animals treated with vehicle for all skeletal muscles, such as: gluteus maximus ( $F = 6.66$ ,  $p = 0.01$ ), red and white gastrocnemius ( $F = 4.51$ ,  $p = 0.04$  and  $F = 6.02$ ,  $p = 0.02$ ). These results are in accordance with the literature, who demonstrated a better lipid profile in animals treated with melatonin, decreasing intramuscular fat deposition by promoting lipolysis and increasing mitochondrial function in porcine intramuscular preadipocytes (Liu et al., 2019), and reducing the blood triglyceride concentration (Lolei et al., 2019; Mendes et al., 2013; Agil et al., 2011). Considering the improvement in fat oxidation, it was expected higher glycogen content, as demonstrated by the animals treated with melatonin compared with the animals treated with vehicle for gluteus maximus ( $F = 5.71$ ,  $p = 0.02$ ).

In relation to glycogen replacement, it is important to note that the animals treated with melatonin (MEx) swam longer than animals treated with vehicle (Ex;  $p < 0.05$ , 120,26%, ES: 1.17), thus we expected lower content of glycogen, as suggested by the literature (Beck et al., 2014; Matsui et al., 2011). However, when analyzing our results, the animals that were treated with melatonin and were exercised (MEx) were statistically equal with the animals that were treated with vehicle and were exercised (Ex) for the glycogen content of liver ( $p > 0.05$ ) and skeletal muscles (gluteus maximus, red and white gastrocnemius ( $p > 0.05$ )), even swam longer than ones. In addition, in the presence of melatonin, there was an overcompensation of glycogen content in the red gastrocnemius of the animals that were exercised (MEx;  $p = 0.01$ , ES: 1.71), however, this does not occur in the absence of melatonin (Ex;  $p > 0.05$ ) with respect to the control animals (Ct). Therefore, we considered that melatonin accelerates the replacement of energy substrates, consequently, improving the glycogen stores.

Some limitations in this manuscript must be addressed: 1) we focused on the master regulator of the mitochondrial biogenesis and its relation with NRF-1; however, evaluating another proteins involved in the mitochondrial biogenesis process, as well as the PGC-1 $\alpha$  downstream signals, could provide additional information for the mechanism of action of

melatonin; 2) we chose the dosage of 10 mg.kg<sup>-1</sup> due to the effects of melatonin on time to exhaustion (*t*<sub>lim</sub>), as previous reported for our research group (Beck et al., 2015, 2016); however, another concentration of melatonin should be tested to achieve similar effect with lower dosage. Therefore, our findings make clear that future studies must be conducted in order to deepen the knowledge on this relevant area.

In summary, the present study highlighted the role of melatonin in exercise tolerance, on PGC-1 $\alpha$  and NRF-1, and its role on the regulation of energy substrate use after exhaustive exercise, decreasing triglyceride content and accelerating the glycogen replacement in skeletal muscle. Consequently, providing a better cellular metabolism environment for future efforts, through bioenergetic modulations.

## REFERENCES

1. Amaral, F. G. D., Andrade-Silva, J., Kuwabara, W. M., & Cipolla-Neto, J. (2019). New insights into the function of melatonin and its role in metabolic disturbances. *Expert review of endocrinology & metabolism*, 14(4), 293-300.
2. Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., ... & Reiter, R. J. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and molecular life sciences*, 71(16), 2997-3025.
3. Reiter, R. J., Tan, D. X., & Fuentes-Broto, L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog. Brain Res.* **181**, 127-151 (2010).
4. Reiter, R. J. et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J. Pineal Res.* **61**, 253-278 (2016).
5. Manchester, L. C. et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J. Pineal Res.* **59**, 403-419 (2015).
6. Galano, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. Melatonin: a versatile protector against oxidative DNA damage. *Molecules.* **23**, 530 (2018).
7. Rodriguez, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* **36**, 1-9 (2004).
8. Mauriz, J. L., Collado, P. S., Veneroso, C., Reiter, R. J., & González-Gallego, J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J. Pineal Res.* **54**, 1-14 (2013).
9. Beck, W. R., Botzelli, J. D., Pauli, J. R., Ropelle, E. R., & Gobatto, C. A. Melatonin has an ergogenic effect but does not prevent inflammation and damage in exhaustive exercise. *Sci. Rep.* **5**, 1-10 (2015).
10. Beck, W. R., Scariot, P. P. M., & Gobatto, C. A. Melatonin is an ergogenic aid for exhaustive aerobic exercise only during the wakefulness period. *Int. J. Sports Med.* **37**, 71-76 (2016).
11. Sánchez-Campos, S. et al. Effects of melatonin on fuel utilization in exercised rats: role of nitric oxide and growth hormone. *J. Pineal Res.* **31**, 159-166 (2001).

12. Mazepa, R. C., Cuevas, M. J., Collado, P. S., & Gonzalez-Gallego, J. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Sci.* **66**, 153-160 (2000).
13. Duchesne, E., Dufresne, S. S., & Dumont, N. A. (2017). Impact of inflammation and anti-inflammatory modalities on skeletal muscle healing: from fundamental research to the clinic. *Physical therapy*, *97*(8), 807-817.
14. Jung, S., & Kim, K. (2014). Exercise-induced PGC-1 $\alpha$  transcriptional factors in skeletal muscle. *Integrative medicine research*, *3*(4), 155-160.
15. Halling, J. F., & Pilegaard, H. (2020). PGC-1 $\alpha$ -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, *45*(9), 927-936.
16. Seebacher, F., & Glanville, E. J. (2010). Low levels of physical activity increase metabolic responsiveness to cold in a rat (*Rattus fuscipes*). *PLoS One*, *5*(9), e13022.
17. Halling, J. F., Jessen, H., Nøhr-Meldgaard, J., Buch, B. T., Christensen, N. M., Gudiksen, A., ... & Pilegaard, H. (2019). PGC-1 $\alpha$  regulates mitochondrial properties beyond biogenesis with aging and exercise training. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *317*(3), E513-E525.
18. Lira, V. A., Benton, C. R., Yan, Z., & Bonen, A. (2010). PGC-1 $\alpha$  regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *299*(2), E145-E161.
19. Shute, R. J., Heesch, M. W., Zak, R. B., Kreiling, J. L., & Slivka, D. R. (2018). Effects of exercise in a cold environment on transcriptional control of PGC-1 $\alpha$ . *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *314*(6), R850-R857.
20. Fujimoto, E., Yamaguchi, W., Terada, S., Higuchi, M., & Tabata, I. (2011). Change in PGC-1 $\alpha$  expression in rat skeletal muscle after low-intensity prolonged swimming exercise. *Journal of physiological anthropology*, *30*(1), 23-27.
21. Ikeda, S. I., Kizaki, T., Haga, S., Ohno, H., & Takemasa, T. (2008). Acute exercise induces biphasic increase in respiratory mRNA in skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications*, *368*(2), 323-328.
22. Wright, D. C., Han, D. H., Garcia-Roves, P. M., Geiger, P. C., Jones, T. E., & Holloszy, J. O. (2007). Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1 $\alpha$  expression. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(1), 194-199.
23. Daussin, F. N., Rasseneur, L., Bouitbir, J., Charles, A. L., Dufour, S. P., Geny, B., ... & Richard, R. (2012). Different timing of changes in mitochondrial functions following endurance training. *Medicine and science in sports and exercise*, *44*(2), 217-224.
24. Murakami, T., Shimomura, Y., Yoshimura, A., Sokabe, M., & Fujitsuka, N. (1998). Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1381*(1), 113-122.
25. Booth, F. W., Ruegsegger, G. N., Toedebusch, R. G., & Yan, Z. (2015). Endurance exercise and the regulation of skeletal muscle metabolism. *Progress in molecular biology and translational science*, *135*, 129-151.



26. Wong, K. E., Mikus, C. R., Slentz, D. H., Seiler, S. E., DeBalsi, K. L., Ilkayeva, O. R., ... & Muoio, D. M. (2015). Muscle-specific overexpression of PGC-1 $\alpha$  does not augment metabolic improvements in response to exercise and caloric restriction. *Diabetes*, *64*(5), 1532-1543.
27. Animal Research Review Panel. ARRP Guideline 20: Guidelines for the Housing of Rats in Scientific Institutions (2007).
28. Beck, W., & Gobatto, C. Effects of maximum intensity aerobic swimming exercise until exhaustion at different times of day on the hematological parameters in rats. *Acta Physiol. Hung.* **100**, 427-434 (2013).
29. Lima, A. A. D. et al. Two water environment adaptation models enhance motor behavior and improve the success of the lactate minimum test in swimming rats. *Motriz*. **23**, (2017).
30. APS. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. *Am. J. Physiol.* **137**, 2006.
31. American Veterinary Medical Association. *AVMA Guidelines on Euthanasia*. AVMA, Schaumber, Illinois, 2013.
32. Zagatto, A. M., Papoti, M., & Gobatto, C. A. Validity of critical frequency test for measuring table tennis aerobic endurance through specific protocol. *J. Sports Sci & Med.* **7**, 461 (2008).
33. Matsumoto, I. et al. Effects of swimming training on aerobic capacity and exercise induced bronchoconstriction in children with bronchial asthma. *Thorax*. **54**, 196-201 (1999).
34. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356 (1956).
35. Cohen D. Statistical power analysis for the behavioral sciences (second edition). Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale (1988).
36. Ha, E. et al. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. *J. Pineal Res.* **41**, 67-72 (2006).
37. Teodoro, B. G., Baraldi, F. G., Sampaio, I. H., Bomfim, L. H., Queiroz, A. L., Passos, M. A., ... & Vieira, E. (2014). Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Journal of pineal research*, *57*(2), 155-167.
38. Islam, H., Hood, D. A., & Gurd, B. J. (2020). Looking beyond PGC-1 $\alpha$ : emerging regulators of exercise-induced skeletal muscle mitochondrial biogenesis and their activation by dietary compounds. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, *45*(1), 11-23.
39. Qi, X., & Wang, J. (2020). Melatonin improves mitochondrial biogenesis through the AMPK/PGC1 $\alpha$  pathway to attenuate ischemia/reperfusion-induced myocardial damage. *Aging (Albany NY)*, *12*(8), 7299.
40. Yu, L., Gong, B., Duan, W., Fan, C., Zhang, J., Li, Z., ... & Wang, H. (2017). Melatonin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic rats by preserving

- mitochondrial function: role of AMPK-PGC-1 $\alpha$ -SIRT3 signaling. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
41. Memme, J. M., Erlich, A. T., Phukan, G., & Hood, D. A. (2021). Exercise and mitochondrial health. *The Journal of physiology*, 599(3), 803-817.
  42. Perry, C. G., & Hawley, J. A. (2018). Molecular basis of exercise-induced skeletal muscle mitochondrial biogenesis: Historical advances, current knowledge, and future challenges. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(9), a029686.
  43. Bonen, A. (2009). PGC-1 $\alpha$ -induced improvements in skeletal muscle metabolism and insulin sensitivity. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 34(3), 307-314.
  44. Handschin, C., Chin, S., Li, P., Liu, F., Maratos-Flier, E., LeBrasseur, N. K., ... & Spiegelman, B. M. (2007). Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1 $\alpha$  muscle-specific knock-out animals. *Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 30014-30021.
  45. Leone, T. C., Lehman, J. J., Finck, B. N., Schaeffer, P. J., Wende, A. R., Boudina, S., ... & Kelly, D. P. (2005). PGC-1 $\alpha$  deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS biology*, 3(4), e101.
  46. Tadaishi, M., Miura, S., Kai, Y., Kano, Y., Oishi, Y., & Ezaki, O. (2011). Skeletal muscle-specific expression of PGC-1 $\alpha$ -b, an exercise-responsive isoform, increases exercise capacity and peak oxygen uptake. *PloS one*, 6(12), e28290.
  47. Krssak, M. et al. Intramuscular glycogen and intramyocellular lipid utilization during prolonged exercise and recovery in man: a <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 748-754 (2000).
  48. Liu, K., Yu, W., Wei, W., Zhang, X., Tian, Y., Sherif, M., ... & Chen, J. (2019). Melatonin reduces intramuscular fat deposition by promoting lipolysis and increasing mitochondrial function. *Journal of lipid research*, 60(4), 767-782.
  49. Loloie, S., Sepidarkish, M., Heydarian, A., Tahvilian, N., Khazdouz, M., Heshmati, J., & Pouraram, H. (2019). The effect of melatonin supplementation on lipid profile and anthropometric indices: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(3), 1901-1910.
  50. Mendes, C., Lopes, A. M. D. S., do Amaral, F. G., Peliciari-Garcia, R. A., Turati, A. D. O., Hirabara, S. M., ... & Cipolla-Neto, J. (2013). Adaptations of the aging animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin. *Journal of pineal research*, 55(3), 229-239.
  51. Agil, A., Navarro-Alarcón, M., Ruiz, R., Abuhamadah, S., El-Mir, M. Y., & Vázquez, G. F. (2011). Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. *Journal of pineal research*, 50(2), 207-212.
  52. Beck, W. F., De Araujo, G. G., Menezes Scariot, P. P., Masselli dos Reis, I. G., & Gobatto, C. A. Time to exhaustion at anaerobic threshold in swimming rats: metabolic investigation. *Bratisl. Lek. Listy.* **115**, 617-621 (2014).
  53. Matsui, T. et al. Brain glycogen decreases during prolonged exercise. *J. Physiol.* **589**, 3383-3393 (2011).

## 7 DISCUSSÃO

A presente discussão trata-se da análise conjunta dos resultados apresentados no capítulo 1 e 2.

Os principais achados do presente estudo foram a capacidade da melatonina em aumentar GLUT4, FAT CD36, PGC-1 $\alpha$  e NRF-1 e modular a reposição de substratos energéticos em tecido muscular esquelético exercitado, além de aumentar a tolerância ao esforço físico e favorecer o ambiente celular para futuros esforços, através da redução de triglicerídeos musculares e plasmáticos e aumento no conteúdo de glicogênio muscular e hepático, na qual corrobora com nossa hipótese (Figura 14). Além disso, este é o primeiro estudo a destacar o efeito agudo da administração de melatonina sobre a expressão de proteínas do metabolismo intermediário e sua influência sobre a reposição de substratos energéticos após esforço exaustivo em intensidade correspondente a máxima capacidade aeróbia.

Em relação ao tempo de exaustão, de acordo com Bergstrom et al. (1967), o aumento no conteúdo de glicogênio é um dos principais determinantes para a performance em exercícios de intensidade moderada e esforço prolongado. Além disso, é bem estabelecido na literatura a dependência de carboidratos em exercícios físicos de alta intensidade e longa duração (Hawley e Leckey, 2015). Sendo assim, os dados sugerem que a melatonina é um dos fatores responsáveis pelo melhor desempenho devido ao aumento de GLUT4 e dos estoques de glicogênio pré-esforço (como observado nos grupos M1 e M3;  $p < 0.05$ ), aumentando consequentemente o tempo até a exaustão durante o exercício de natação em intensidade correspondente à máxima capacidade aeróbia (como visto nos grupos ME1 e ME3,  $p < 0.05$ ) (capítulo 1). Estes achados corroboram com estudos prévios publicados pelo nosso grupo de pesquisa, no qual demonstramos maior performance no flim pelos animais tratados com melatonina (10 mg.kg<sup>-1</sup>) durante o período escuro (Beck et al., 2015, 2016).

Em relação ao metabolismo lipídico, é bem conhecido na literatura que a capacidade mitocondrial de oxidação de substratos no músculo esquelético é um dos principais determinantes da performance (Halling et al., 2019), assim como da recuperação metabólica após o exercício, favorecendo a reposição do glicogênio. Além do papel na biogênese e função mitocondrial, o PGC-1 $\alpha$  e o NRF-1 estão diretamente ligados à regulação do substrato energético para o músculo esquelético (Bonen, 2009), resultando em um profundo aumento na capacidade do músculo esquelético em utilizar lipídios (Wong et al., 2015). Nesse cenário, acreditamos que o aumento de FAT CD36, PGC-1 $\alpha$  e NRF-1, juntamente com um ambiente ideal para a oxidação da gordura após o exercício, foram responsáveis por maximizar a

oxidação dos triglicerídeos no tecido muscular esquelético, conforme demonstrado pelos animais tratados com melatonina em relação aos animais tratados com veículo para todos os músculos esqueléticos, tais como: glúteo máximo ( $F = 6,66$ ,  $p = 0,01$ ), gastrocnêmio vermelho e branco ( $F = 4,51$ ,  $p = 0,04$  e  $F = 6,02$ ,  $p = 0,02$ ) (capítulo 2). Além disso, a redução da concentração de triglicéride plasmático demonstrada pelo grupo ME3, possivelmente ocorreu devido ao aumento de FAT CD36 no grupo ME3 ( $p < 0,05$ ), no qual conseqüentemente aumentou o transporte de triglicerídeo do sangue para o musculo esquelético para ser oxidado (capítulo 1). Esses resultados estão de acordo com a literatura, na qual demonstram um melhor perfil lipídico em animais tratados com melatonina, diminuindo a deposição de gordura intramuscular por promover lipólise e aumentar a função mitocondrial em pré-adipócitos intramusculares de porcos (Liu et al., 2019), e reduzindo a concentração de triglicerídeos sanguíneos (Lolei et al., 2019; Mendes et al., 2013; Agil et al., 2011). Considerando a melhora na oxidação de gordura após o esforço, conseqüentemente fornecendo um maior aporte de ATPs para recuperação metabólica, esperava-se um maior conteúdo de glicogênio, conforme demonstrado pelos animais tratados com melatonina em relação aos animais tratados com veículo para glúteo máximo ( $F = 5,71$ ,  $p = 0,02$ ).

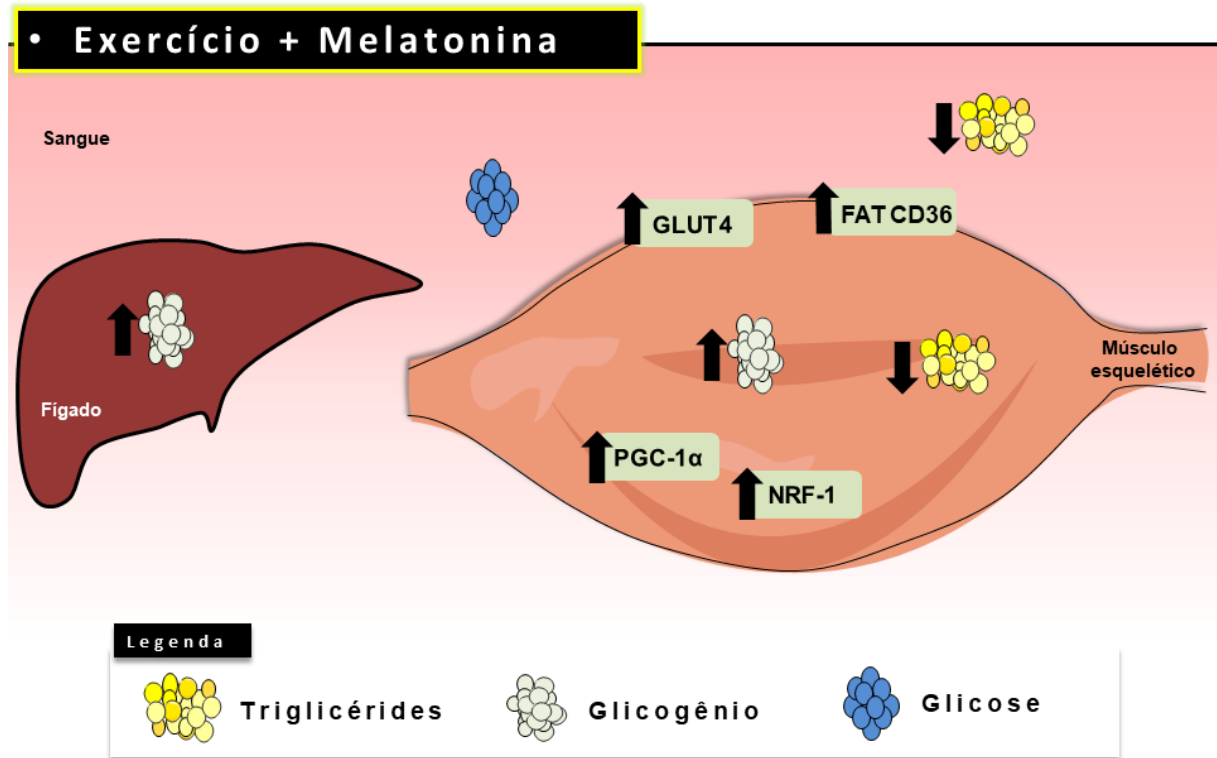
Em relação à reposição de glicogênio após o esforço, é importante ressaltar que os animais tratados com melatonina (MEx) nadaram mais tempo quando comparado aos animais tratados com veículo (Ex;  $p < 0,05$ , 120,26%, ES: 1,17), portanto esperávamos menor conteúdo de glicogênio, conforme sugerido pela literatura (Beck et al., 2014; Matsui et al., 2011). Porém, ao analisar nossos resultados, os animais que foram tratados com melatonina e exercitados (MEx) apresentaram resultados estatisticamente iguais aos animais que foram tratados com veículo e foram exercitados (Ex) para o conteúdo de glicogênio hepático ( $p > 0,05$ ) e muscular esquelético (glúteo máximo, gastrocnêmio vermelho e branco ( $p > 0,05$ )). Além disso, na presença de melatonina, houve uma supercompensação do conteúdo de glicogênio no gastrocnêmio vermelho dos animais que se exercitaram (MEx;  $p = 0,01$ , ES: 1,71), porém, isso não ocorre na ausência de melatonina (Ex;  $p > 0,05$ ) em relação aos animais controle (Ct) (capítulo 2). Sendo assim, acreditamos que o aumento no conteúdo de glicogênio foi devido ao aumento de GLUT4 apresentado pelos grupos ME1 e ME3 ( $p < 0,05$ ; capítulo 1). Portanto, consideramos que a melatonina acelera a reposição de substratos energéticos, conseqüentemente, melhorando os estoques de glicogênio.

Neste contexto, a administração de melatonina parece ser mais promissora em um cenário de recuperação após esforço exaustivo quando comparada a sua aplicabilidade para aumento da performance física. Quando considerada sua aplicação no âmbito do treinamento

físico, esta indolamina possivelmente seria capaz de acentuar e/ou antecipar a síndrome da adaptação geral (super compensação). Sendo assim, o indivíduo tratado com melatonina estaria apto a receber a aplicação de um novo estímulo de treinamento antecipadamente em relação ao indivíduo tratado com solução veículo. Isso teria repercussões até na carreira esportiva, podendo acelerar o período até o atingimento do ápice da performance. Além disso, a administração de melatonina parece ser relevante em um cenário de overtraining, devido seu efeito anti-inflamatório e antioxidante, assim como seu papel modulador sobre o metabolismo energético. Um dos sintomas comuns do overtraining envolve a redução da captação de glicose e o consequente aumento do conteúdo de glicogênio afetado pela inflamação e produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, enquanto que a melatonina parece ser eficiente em atenuar este quadro. Além do seu papel sobre o tecido muscular esquelético exercitado, devemos considerar o uso deste hormônio para o tratamento de algumas patologias, como o diabetes mellitus, aonde evidenciamos um cenário de baixa captação de glicose, inflamação sistêmica de baixo grau e produção de espécies reativas de oxigênio. Com base nisso, a melatonina parece demonstrar um papel promissor em diferentes cenários. No entanto, tais possibilidades sobre a aplicação da melatonina carecem ser investigadas em futuros experimentos.

Neste cenário, acreditamos que o presente estudo destacou relevantes achados que certamente irão contribuir com a literatura. No entanto, algumas limitações devem ser consideradas, como: 1) novas dosagens de melatonina devem ser testadas a fim de obtermos efeitos semelhantes utilizando dosagens inferiores a utilizada neste experimento; 2) além disso, diferentes intensidades exercício e duração controlada poderiam trazer respostas interessantes 3) por fim, optamos por concentrar nossas análises sobre proteínas relacionadas ao metabolismo intermediário (GLUT4, FAT CD36, PGC-1 $\alpha$  e NRF-1) e seus substratos energéticos, no entanto, seria relevante estudar suas vias de sinalização, como seus *upstreams* e *downstreams*.

**Figura 15** – Efeito da melatonina sobre tecido muscular esquelético exercitado.



**Figura 15** – Efeito da melatonina sobre a expressão proteica (GLUT4, FAT CD36, PGC-1 $\alpha$  e NRF-1), conteúdo de substratos energéticos em tecido muscular esquelético (glicogênio e triglicérides) e fígado (glicogênio), e concentração de glicose e triglicérides plasmáticos em ratos submetidos ao exercício exaustivo de natação em intensidade correspondente a máxima capacidade aeróbia

## 8 CONCLUSÃO

De acordo com os nossos dados, o presente estudo demonstrou o efeito ergogênico da administração aguda de melatonina sobre a tolerância ao exercício em intensidade correspondente a máxima capacidade aeróbia individualizada. Além disso, na presença de melatonina, houve aumento da expressão de GLUT4, FAT CD36, PGC-1 $\alpha$  e NRF-1 em tecido muscular esquelético exercitado, conseqüentemente, modulando o metabolismo energético através da redução dos estoques de triglicérido musculares e plasmático e acelerando a reposição do conteúdo de glicogênio muscular. Desta maneira, melhorando o ambiente celular para futuros esforços, ao menos do ponto de vista bioenergético.

## REFERÊNCIAS

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D., et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n.16, p. 2997-3025, 2014.
- AGIL, Ahmad et al. Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. **Journal of pineal research**, v. 50, n. 2, p. 207-212, 2011.
- AMARAL, F. G. do, et al. New insights into the function of melatonin and its role in metabolic disturbances. **Expert Review of Endocrinology & Metabolism**, v. 14, n. 4, p. 293-300, 2019.
- AMARAL, F. G. do; CIPOLLA-NETO, J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 4, p. 472-479, 2018.
- American Veterinary Medical Association. **AVMA Guidelines on Euthanasia**. AVMA, Schaumber, Illinois, 2013.
- ANTON-TAY, F. et al. Brain serotonin concentration: elevation following intraperitoneal administration of melatonin. **Science**, v. 162, n. 3850, p. 277-278, 1968.
- APS. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. **American Physiological Society**. 137, 2006.
- ARANAROCHANA, A. et al. Protective effects of melatonin against valproic acid-induced memory impairments and reductions in adult rat hippocampal neurogenesis. **Neuroscience**, v. 406, p. 580-593, 2019.
- ASLANKOC, R.; OZMEN, O. The effects of high-fructose corn syrup consumption on testis physiopathology—The ameliorative role of melatonin. **Andrologia**, v. 51, n. 8, p. e13327, 2019.
- BECK, W. R. et al. Melatonin is an ergogenic aid for exhaustive aerobic exercise only during the wakefulness period. **International Journal of Sports Medicine**, v. 37, n. 01, p. 71-76, 2016.
- BECK, W. R. et al. Melatonin has an ergogenic effect but does not prevent inflammation and damage in exhaustive exercise. **Scientific reports**, v. 5, n. 18065, 2015.
- BECK, W. R. 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. 2015. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Educação Física, Campinas, SP.
- BECK, W.; GOBATTO, C.A. Effects of maximum intensity aerobic swimming exercise until exhaustion at different times of day on the hematological parameters in rats. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 100, n. 4, p. 427-434, 2013.
- BENITEZ-KING, G.; ANTON-TAY, F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. **Experientia**, v. 49, n. 8, p. 635-641, 1993.

- BENTON, C. R. et al. PGC-1 $\alpha$  increases skeletal muscle lactate uptake by increasing the expression of MCT1 but not MCT2 or MCT4. **Physiological Genomics**, v. 35, n. 1, p 45-54, 2008.
- BERGSTRÖM, J. et al. Diet, muscle glycogen and physical performance. **Acta physiologica scandinavica**, v. 71, n. 2-3, p. 140-150, 1967.
- BICER, M. et al. Interactive effects of melatonin, exercise and diabetes on liver glycogen levels. **Endokrynologia Polska**, v. 62, n. 3, p. 252-256, 2011.
- BONEN, A. PGC-1 $\alpha$ -induced improvements in skeletal muscle metabolism and insulin sensitivity. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 34, n. 3, p. 307-314, 2009.
- BURKE, L. M.; HAWLEY, John A. Swifter, higher, stronger: What's on the menu?. **Science**, v. 362, n. 6416, p. 781-787, 2018.
- CHEN, W. et al. Melatonin restores the osteoporosis-impaired osteogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells by preserving SIRT1-mediated intracellular antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 146, p. 92-106, 2019.
- CIPOLLA-NETO, J. et al. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **Journal of Pineal Research**, v. 56, n. 4, p. 371-381, 2014.
- CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G. do. Melatonin as a hormone: new physiological and clinical insights. **Endocrine Reviews**, v. 39, n. 6, p. 990-1028, 2018.
- Cohen D. Statistical power analysis for the behavioral sciences (second edition). Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale (1988).
- DE ARAUJO, J. G. et al. Protective Effect of Melatonin on Cisplatin-induced Ototoxicity in Rats. **Anticancer Research**, v. 39, n. 5, p. 2453-2458, 2019.
- DE BUTTE, M.; GIESEKING, B. Efficacy of a low-dose melatonin pretreatment in protecting against the neurobehavioral consequences of chronic hypoperfusion in middle-aged female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 377, p. 112257, 2020.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- ECKER, J. L. et al. Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision. **Neuron**, v. 67, n. 1, p. 49-60, 2010.
- EDIZER, D. T. et al. Effects of Melatonin and Dexamethasone on Facial Nerve Neurotrophin. **The Journal of International Advanced Otolaryngology**, v. 15, n. 1, p. 43, 2019.
- ERLICH, S. S.; APUZZO, M. L. J. The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. **Journal of Neurosurgery**, v. 63, n. 3, p. 321-341, 1985.
- FADDA, L. M. et al. Prophylactic administration of carnosine and melatonin abates the incidence of apoptosis, inflammation, and DNA damage induced by titanium dioxide nanoparticles in rat livers. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-9, 2019.
- FREEDMAN, M. S. et al. Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. **Science**, v. 284, n. 5413, p. 502-504, 1999.



- FILGUEIRAS, M. Q. Glândula Pineal: revisão da anatomia e correlações entre os marca-passos e fotoperíodos na sincronização dos ritmos cardíacos. **HU Revista**, v. 32, n. 2, p. 47-50, 2006.
- GALANO, A. et al. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n.1, p. 1-16, 2011.
- GALANO, A. et al. Melatonin: a versatile protector against oxidative DNA damage. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 530, 2018.
- GHEBAN, B. A. et al. The morphological and functional characteristics of the pineal gland. **Medicine and Pharmacy Reports**, v. 92, n. 3, p. 226-234, 2019.
- GUNATA, M. et al. Melatonin: A review of its potential functions and effects on neurological diseases. **Revue Neurologique**, 2019.
- HA, E. et al. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. **Journal of Pineal Research**, v. 41, n. 1, p. 67-72, 2006.
- HAEGER, P. et al. Treatment with Melatonin Improves Cognitive Behavior and Motor Skills in a Rat Model of Liver Fibrosis. **Annals of Hepatology**, v. 18, n. 1, p. 101-108, 2019.
- HALLING, J. F. et al. PGC-1 $\alpha$  regulates mitochondrial properties beyond biogenesis with aging and exercise training. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 317, n. 3, p. E513-E525, 2019.
- HARGREAVES, M.; SPRIET, L. L. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. **Nature Metabolism**, v. 2, n. 9, p. 817-828, 2020.
- HAWLEY, J. A.; LECKEY, J. J. Carbohydrate dependence during prolonged, intense endurance exercise. **Sports Medicine**, v. 45, n. 1, p. 5-12, 2015.
- HEARRIS, M. A. et al. Regulation of muscle glycogen metabolism during exercise: implications for endurance performance and training adaptations. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 298, 2018.
- HOLLOSZY, J. O. et al. The regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p.1011-1027, 1998.
- ILAHY S.; ILAHY T. B. Physiology, Pineal Gland. Pubmed, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525955/>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2020.
- KANG, C. et al. Exercise activation of muscle peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  signaling is redox sensitive. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 47, n. 10, p 1394-1400, 2009.
- KAYA, O. et al. Effect of melatonin supplementation on plasma glucose and liver glycogen levels in rats subjected to acute swimming exercise. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 3, p. 241-244, 2010.
- KENNEY W. L. et al. **Physiology of Sport and Exercise**. 5 Ed. Human Kinetics, 2015.
- KLEIN, D. C. et al. Melatonin metabolism: neural regulation of pineal serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 12, p. 3107-3110, 1971.

- KNUIMAN, P. et al. Glycogen availability and skeletal muscle adaptations with endurance and resistance exercise. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 59, 2015.
- KOJETIN, D. J. et al. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. **Nature reviews Drug discovery**, v. 13, n. 3, p. 197-216, 2014.
- LAIOS, K. The Pineal Gland and its earliest physiological description. **Hormones**, v. 16, n. 3, p. 328-330, 2017.
- LERNER, A. B. et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 2587-2587, 1958.
- LI, Y. et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 24, p. 39896-39921, 2017.
- LIMA, A. A. de. et al. Two water environment adaptation models enhance motor behavior and improve the success of the lactate minimum test in swimming rats. **Motriz: Revista de Educação Física**, vol. 23, 2017.
- LIU, K. et al. Melatonin reduces intramuscular fat deposition by promoting lipolysis and increasing mitochondrial function. **Journal of lipid research**, v. 60, n. 4, p. 767-782, 2019.
- LOLOEI, S. et al. The effect of melatonin supplementation on lipid profile and anthropometric indices: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 3, p. 1901-1910, 2019.
- LUENGO, E. et al. Pharmacological doses of melatonin impede cognitive decline in tau-related Alzheimer models, once tauopathy is initiated, by restoring the autophagic flux. **Journal of Pineal Research**, v. 67, n. 1, p. e12578, 2019.
- MAHMOUD, G. S.; EL-DEEK, H. E. Melatonin modulates inflammatory mediators and improves olanzapine-induced hepatic steatosis in rat model of schizophrenia. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 11, n. 3, p. 64, 2019.
- MANCHESTER, L. C. et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 4, p. 403-419, 2015.
- MATSUI, T. et al. Endurance and Brain Glycogen: A Clue Toward Understanding Central Fatigue. **Brain Glycogen Metabolism. Advances in neurobiology, Springer, Cham**, v.23, p. 331-346, 2019.
- MATSUMOTO, I. et al. Effects of swimming training on aerobic capacity and exercise induced bronchoconstriction in children with bronchial asthma. **Thorax**, v. 54, n. 3, p. 196-201, 1999.
- MAURIZ, J. L. et al. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n.1, p. 1-14, 2013.
- MAZEPA, R. C., et al. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. **Life Sciences**, 1999, v. 66, n. 2, p. 153-160, 2000.
- MENDES, C. et al. Adaptations of the aging animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 55, n. 3, p. 229-239, 2013.

- MOHAMED, Y. et al. The potential therapeutic effect for melatonin and mesenchymal stem cells on hepatocellular carcinoma. **BioMedicine**, v. 9, n. 4, p. 24, 2019.
- MUSA, A. E. et al. Protective Effect of Melatonin Against Radiotherapy-Induced Small Intestinal Oxidative Stress: Biochemical Evaluation. **Medicina**, v. 55, n. 6, p. 308, 2019.
- NG, K. Y. et al. Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions. **Brain Structure and Function**, v. 222, n. 7, p. 2921-2939, 2017.
- NOSJEAN, O. et al. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 11, p. 1369-1379, 2001.
- OWINO, S. et al. Melatonin signaling controls the daily rhythm in blood glucose levels independent of peripheral clocks. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0148214, 2016.
- OWINO, S. et al. Melatonin signaling a key regulator of glucose homeostasis and energy metabolism. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 488, 2019.
- PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Progress in Neurobiology**, v. 85, n. 3, p. 335-353, 2008.
- PEJON T. M. M. Efeito do treinamento aeróbio de natação no conteúdo de glut4 e fat cd36 e metabolismo energético de ratas ovariectomizadas. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Universidade Federal de São Carlos, SP.
- REITER, R. J. et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of Pineal Research**, v. 61, n. 3, p. 253-278, 2016.
- REITER, R. J. et al. Melatonin: a multitasking molecule. **Progress in Brain Research. Elsevier**, v. 181, p. 127-151, 2010.
- RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2004.
- SÁNCHEZ-CAMPOS, S. et al. Effects of melatonin on fuel utilization in exercised rats: role of nitric oxide and growth hormone. **Journal of Pineal Research**, v. 31, n. 2, p. 159-166, 2001.
- SHARMA, S. et al. The role of melatonin in diabetes: therapeutic implications. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 59, n. 5, p. 391-399, 2015.
- SHOJA, M. M. et al. History of the pineal gland. **Child's Nervous System**, v. 32, n. 4, p. 583-586, 2016.
- SKENE, D. J. et al. Contribution of CYP1A2 in the hepatic metabolism of melatonin: studies with isolated microsomal preparations and liver slices. **Journal of Pineal Research**, v. 31, n. 4, p. 333-342, 2001.
- SLOMINSKI, R. M. et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 2, p. 152-166, 2012.
- SUGDEN, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. **Experientia**, v. 45, n. 10, p. 922-932, 1989.

- SUGDEN, D. Psychopharmacological effects of melatonin in mouse and rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 227, n. 3, p. 587-591, 1983.
- SUN J. H. et al. Reduction in pineal N-acetyltransferase activity and pineal and serum melatonin levels in rats after their exposure to red light at night. **Neuroscience Letters**, v. 149, n. 1, p. 56-8, 1993.
- TAN, D. X., et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 181-197, 2002.
- TAN, D. X.; REITER, R. J. Mitochondria: the birth place, battle ground and the site of melatonin metabolism in cells. **Melatonin Research**, v. 2, n. 1, p. 44-66, 2019.
- TAROCCO, A. et al. Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. **Cell death & disease**, v. 10, n. 4, p. 1-12, 2019.
- VERMA, A. K. et al. Redox homeostasis in a rodent model of circadian disruption: Effect of melatonin supplementation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 280, p. 97-103, 2019.
- VON GALL, C. et al. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. **Cell and Tissue Research**, v. 309, n. 1, p. 151-162, 2002.
- WONG, K. E. et al. Muscle-specific overexpression of PGC-1 $\alpha$  does not augment metabolic improvements in response to exercise and caloric restriction. **Diabetes**, v. 64, n. 5, p. 1532-1543, 2015.
- XIE, Z. et al. A review of sleep disorders and melatonin. **Neurological Research**, v. 39, n. 6, p. 559-565, 2017.
- XU, P. et al. Melatonin prevents obesity through modulation of gut microbiota in mice. **Journal of Pineal Research**, 2017, v. 62, n. 4, p. e12399.
- YELESWARAM, K. et al. Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. **Journal of pineal research**, v. 22, n. 1, p. 45-51, 1997.
- ZAGATTO, A. M. et al. Validity of critical frequency test for measuring table tennis aerobic endurance through specific protocol. **Journal of Sports Science & Medicine**, v. 7, n. 4, p. 461, 2008.
- ZARE, H. et al. Melatonin is a potential inhibitor of ovarian cancer: molecular aspects. **Journal of Ovarian Research**, v. 12, n. 1, p. 26, 2019.

**ANEXO – Certificado CEUA**



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Administração aguda de melatonina e exercício físico aeróbio sobre a capacidade aeróbia, dano tecidual e metabolismo energético de ratos submetidos a exercício de natação", protocolada sob o CEUA nº 9144181218 (00001152), sob a responsabilidade de **Wladimir Rafael Beck** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 18/03/2019.

We certify that the proposal "Acute administration of melatonin and aerobic exercise on aerobic capacity, tissue damage and energetic metabolism of swimming rats", utilizing 120 Heterogenics rats (120 males), protocol number CEUA 9144181218 (00001152), under the responsibility of **Wladimir Rafael Beck** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 03/18/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 04/2019 a 03/2021

Área: [Centro de Ciências Biológicas E da Saúde](#)

Origem: [Biotério Central da UFSCar](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [40 a 45 dias](#)

N: [120](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [120 a 150 g](#)

Local do experimento: [Laboratório de Neuroendocrinologia, Departamento de Ciências Fisiológicas.](#)

São Carlos, 18 de março de 2019

Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho  
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos