

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

NICK ALEXANDRE INFANTE

EFEITO DA MELATONINA SOBRE MARCADORES
TECIDUAIS E SÉRICOS DE DANO MUSCULAR
ESQUELÉTICO INDUZIDO POR EXERCÍCIO FÍSICO

SÃO CARLOS -SP

2021

Nick Alexandre Infante

Efeito da melatonina sobre marcadores teciduais e séricos de dano muscular esquelético induzido por exercício físico

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas PIPGCF da UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck

São Carlos – SP

2021



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 Nick Alexandre Infante, realizada em 08/09/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck (UFSCar)

Prof. Dr. Alessandro Moura Zagatto (USP)

Profa. Dra. Fulvia de Barros Manchado Gobatto (UNICAMP)

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; 88887.634316/2021-00).

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Wladimir Rafael Beck por despertar meu interesse na pesquisa científica, pelo apoio, paciência, confiança, exemplo, e pela oportunidade de realizar o curso de mestrado no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico (LAFEEEx) sob sua valorosa orientação. Serei sempre grato, e levarei eternamente comigo os princípios e valores executados diante das diversas atividades necessárias durante a carreira acadêmica as quais tive o privilégio de acompanhar ao longo destes dois anos.

Aos Professores Doutores Gerson Jhonatan Rodrigues, Fúlvia de Barros Manchado Gobatto e Alessandro Moura Zagatto pelas significativas observações por ocasião da comissão avaliadora no processo de qualificação desta dissertação.

Aos Professores Doutores componentes da comissão avaliadora do processo de defesa da dissertação, por disponibilizar seu precioso tempo com o intuito de promover críticas construtivas ao trabalho.

À Professora Doutora Anabelle Silva Cornachione pelas orientações e por disponibilizar suas instalações e seu tempo, imprescindíveis na realização de grande parte das análises sobre as amostras biológicas desta dissertação.

À professora Doutora Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo pela disponibilidade de seus equipamentos e suas instalações, essenciais em nossas análises histológicas.

Aos colegas do LAFEEEx pelo ótimo convívio e pelo apoio prestado durante as coletas e as análises dos experimentos desta dissertação. Agradecê-los também pelas diversas noites em que privaram seu sono auxiliando quando os experimentos transcorriam durante a madrugada.

Aos colegas de graduação/pós-graduação, e aos demais colegas dos vários laboratórios os quais tive a oportunidade de frequentar na UFSCar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

O exercício físico pode causar dano muscular, comumente chamado de dano muscular induzido por exercício (DMIE), desencadeando diversos eventos os quais darão início ao processo de reparo desse tecido através da ativação das células satélites (CS). O fator de transcrição PAX7 é comumente utilizado como marcador de CS, sendo expresso durante a quiescência, ativação e proliferação dessas células. A literatura apresenta alguns recursos terapêuticos visando reduzir o dano ou mesmo acelerar o processo de reparo muscular, agindo na inflamação ou estresse oxidativo. Com ações anti-inflamatória, anti-apoptóticas e antioxidante, a melatonina poderia ser utilizada como um desses recursos terapêuticos. O experimento I objetivou identificar a melhor prescrição do protocolo de indução ao dano muscular esquelético (PID), utilizando 35 ratos Wistar divididos em 7 grupos: controle (CL), protocolo 1 (P1), protocolo 2 (P2), protocolo 3 (P3), protocolo 4 (P4), protocolo 5 (P5), protocolo 6 (P6). As alterações morfológicas encontradas na porção branca do músculo gastrocnêmio através da técnica de hematoxilina e eosina, a maior depleção no conteúdo de glicogênio do mesmo músculo, 24 horas após exercício (P1 -25,24%) em comparação ao grupo CL e as altas concentrações séricas de creatina quinase MM (CK-MM) ($592,19 \pm 190,23$ U/L) durante o mesmo período, demonstram a eficiência de P1 em provocar dano muscular esquelético e justifica sua escolha para o PID. O experimento II teve como objetivo analisar os efeitos da melatonina nos marcadores teciduais e séricos de dano muscular esquelético induzido por exercício físico, sendo composto por 70 ratos *Wistar* divididos em 7 grupos: grupo controle (CL), o qual recebeu solução veículo (etanol e NaCl) e foram eutanasiados aos 98 dias de idade e seis grupos os quais receberam melatonina ou não imediatamente após o PID e foram eutanasiados, 24, 48 ou 72 horas após a realização do exercício (E24), (E48), (E72), (EM24), (EM48) e (EM72). Foi coletado sangue para análise da concentração de CK-MM e lactato desidrogenase e gastrocnêmio porção branca para a quantificação da expressão de PAX7 por imunofluorescência. Os dados foram apresentados em média e desvio padrão e realizado os testes de ANOVA One-way ou Fatorial de dois níveis com post hoc de Newman-Keuls quando necessário, bem como teste t dependente e independente, admitindo nível de significância de 5%. Houve efeito do tempo nas concentrações séricas de CK-MM nos animais eutanasiados 48 horas ($F=3,27$; $p<0,05$) em comparação aos ratos eutanasiados 24 e 72 horas após o PID. Já o grupo EM48, apresentou uma redução significativa ($p=0,010$) nas concentrações dessa enzima em comparação ao grupo E48. Houve uma redução na expressão de PAX7, nos animais que receberam melatonina em comparação aos animais que receberam solução veículo ($F=13,90$;

p=0,001). A melatonina foi capaz de reduzir o dano muscular comprovado pela diminuição na concentração sérica de CK-MM, acarretando também em uma redução na expressão de PAX7.

Palavras-chave: Dano muscular esquelético. Melatonina. PAX7. CK-MM.

ABSTRACT

Physical exercise can cause muscle damage, commonly called exercise-induced muscle damage (DMIE), triggering several events which will initiate the repair process of this tissue through the activation of satellite cells (CS). The transcription factor PAX7 is used as a CS marker, being expressed during the quiescence, activation and proliferation of these cells. The literature presents some therapeutic resources aimed at reducing damage or even accelerating the muscle repair process, acting on inflammation or oxidative stress. With anti-inflammatory, anti-apoptotic and antioxidant actions, melatonin could be used as one of these therapeutic resources. Experiment I aimed to identify the best prescription for the skeletal muscle damage (PID) induction protocol, using 35 Wistar rats divided into 7 groups: control (CL), protocol 1 (P1), protocol 2 (P2), protocol 3 (P3), protocol 4 (P4), protocol 5 (P5), protocol 6 (P6). The morphological changes found in the white portion of the gastrocnemius muscle through the hematoxylin and eosin technique, the greater depletion in the glycogen content of the same muscle, 24 hours after exercise (P1 -25.24%) compared to the CL group and the high concentrations serum creatine kinase MM (CK-MM) (592.19 ± 190.23 U/L) during the same period demonstrate the efficiency of P1 in causing skeletal muscle damage and justifies its choice for PID. Experiment II aimed to analyze the effects of melatonin on tissue and serum markers of physical exercise-induced skeletal muscle damage, comprising 70 Wistar rats divided into 7 groups: control group (CL), which received vehicle solution (ethanol and NaCl) and were euthanized at 98 days of age and six groups which received melatonin or not immediately after the PID and were euthanized 24, 48 or 72 hours after the exercise (E24), (E48), (E72), (EM24), (EM48) and (EM72). Blood was collected to analyze the concentration of CK-MM and lactate dehydrogenase and white gastrocnemius for quantification of PAX7 expression by immunofluorescence. Data were presented as mean and standard deviation, and the One-way or two-level factorial ANOVA tests were performed with Newman-Keuls post hoc when necessary, as well as the dependent and independent t test, assuming a significance level of 5%. There was an effect of time on serum CK-MM concentrations in animals euthanized 48 hours ($F=3.27$; $p<0.05$) compared to rats euthanized 24 and 72 hours after PID. The EM48 group, on the other hand, showed a significant reduction ($p=0.010$) in the concentrations of this enzyme compared to the E48 group. There was a reduction in PAX7 expression in animals that received melatonin compared to animals that received vehicle solution ($F=13.90$; $p=0.001$). Melatonin was able to reduce muscle damage demonstrated by

the decrease in the serum concentration of CK-MM, also resulting in a reduction in the expression of PAX7.

Keywords: Skeletal muscle damage. Melatonin. PAX7. CK-MM.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AANAT	arilalquilamina N-acetiltransferase
AFE	atividade física espontânea
AFMK	N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina
AMK	N1-acetil-5-metoxiquinuramina
APS	American Physiological Society
ASMT	acetilserotonina O-metiltransferase
AVMA	American Veterinary Medical Association
c3OHM	3-hidroxi-melatonina cíclica
Ca ²⁺	cálcio
cAMP	monofosfato de adenosina cíclica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cGMP	monofosfato de guanosina cíclica
CK-MM	creatina quinase isoforma músculo esquelético
CL	controle
CREB	proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP
CS	célula satélite
DMIE	dano muscular induzido por exercício
DMIT	dor muscular de início tardio
E24	exercitado e eutanasiado 24 horas
E48	exercitado e eutanasiado 48 horas
E72	exercitado e eutanasiado 72 horas
EC	excitação-contração
EM24	exercitado, melatonina e eutanasiado 24 horas
EM48	exercitado, melatonina e eutanasiado 48 horas
EM72	exercitado, melatonina e eutanasiado 72 horas
ERN	espécie reativa de nitrogênio
ERO	espécie reativa de oxigênio
FGF	fator de crescimento de fibroblastos

g	grama
GB	gastrocnêmio porção branca
Gl	glúteo máximo
GPCR	receptor de membrana acoplados à proteína G
GV	gastrocnêmio porção vermelha
h	hora
HE	hematoxilina e eosina
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
HIOMT	hidroxi-indol-O-metiltransferase
HSPs	proteoglicanos de sulfato de heparano
iLAn	limiar anaeróbio lactacidêmico
IP3	inositol trifosfato
JNK	c-Jun N-terminal cinase
kg	quilogramas
Km	quilômetro
LDH	lactato desidrogenase
MC	massa corporal
MF2	mitofusina 2
min	minuto
MMPs	metaloproteinases
MRF4	fator regulatório específico do músculo 4
MRFs	fatores regulatórios miogênicos
mV	milivolts
MYF5	fator miogênico 5
MYOD	proteína de determinação de mioblastos
Na ₂ SO ₄	sulfato de sódio
NaCl	cloreto de sódio
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAS	N-acetilserotonina
NF-κB	fator nuclear kappa B

nNOS	NOS neuronal
NO	óxido nítrico
NPV	núcleo paraventricular
NSQ	núcleo supraquiasmático
P1	protocolo 1
P2	protocolo 2
P3	protocolo 3
P4	protocolo 4
P5	protocolo 5
P6	protocolo 6
PGC-1 α	receptor gamma coactivator 1-alfa ativado pelo peroxissoma
PID	protocolo de indução ao dano muscular esquelético
PKA	proteína quinase A
PLC	fosfolipase C
QR2	quinona redutase 2
ROR	receptor nuclear órfão relacionado ao retinóide
RPM	rotação por minuto
sGC	guanilato ciclase solúvel
Sol	sóleo
TI	teste incremental
TNF α	fator de necrose tumoral
U/L	unidade por litro
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 ESTRUTURA E FUNÇÕES DO MÚSCULO ESQUELÉTICO	17
3.2 DANO MUSCULAR ESQUELÉTICO E CÉLULAS SATÉLITES	18
3.3 MELATONINA: EFEITOS FISIOLÓGICOS E VIAS DE SINALIZAÇÃO	21
4 METODOLOGIA.....	27
4.1. EXPERIMENTO I.....	27
4.1.1 Amostra e Condições Ambientais	27
4.1.2 Desenho Experimental	28
4.1.3 Adaptação ao Ambiente Aquático.....	29
4.1.4 Teste Incremental de Natação (TI).....	29
4.1.5 Protocolos de Natação.....	30
4.1.6 Eutanásia	31
4.1.7 Análise do Material Biológico	31
4.1.8 Resultados Discutidos e Justificativa da Escolha do PID	33
4.2 EXPERIMENTO II	37
4.2.1 Desenho Experimental	37
4.2.2 Análise Gravimétrica.....	39
4.2.3 Protocolo de Indução ao Dano Muscular Esquelético.....	39
4.2.4 Administração de Melatonina	39
4.2.5 Análise do Material Biológico	40
4.2.6 Análise e Processamento Estatístico dos Dados.....	41
4.2.7 Resultados	42
5 DISCUSSÃO	50
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REFERÊNCIAS	55
ANEXO – Certificado CEUA	62

1 INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é um dos tecidos mais plásticos e dinâmicos do corpo humano (FRONTERA e OCHALA, 2015), sendo responsável pela conversão de energia química em energia mecânica afim de gerar força, necessária para a manutenção da postura corporal e realização de movimentos (WOLFE, 2006), os quais são utilizados para locomoção e prática de exercício físico.

O exercício físico frequentemente resulta em dano muscular induzido por exercício (DMIE) (TEE, BOSH e LAMBERT, 2007), caracterizado por deformação dos sarcômeros (TIDBALL, 2011) e lesão nos componentes do sistema de excitação-contração (EC) causado por dano ao sarcolema (PROSKE e MORGAN, 2001). Como consequência desses eventos há o extravasamento plasmático de proteínas musculares específicas, tais como CK isoforma músculo esquelético MM (CK-MM) e lactato desidrogenase (LDH) (WARREN, LOWE e ARMSTRONG, 1999) e aumento no influxo de cálcio com consequente perda da sua homeostase (TIDBALL, 2011). Concentrações elevadas de cálcio intracelular causam ativação de fosfolipase A2 e proteases dependentes de cálcio como a calpaína (TIDBALL, 2011), intensificando o dano tecidual (ORREINUS et al., 2015), além de formarem substâncias as quais promovem a inflamação (FUNK, 2001).

A resposta inflamatória tem como característica aumento na infiltração de neutrófilos, seguido pelos macrófagos CD68(+) M1 (TIDBALL e VILLALTA, 2010), os quais, posteriormente, podem ser convertidos em um fenótipo anti-inflamatório, com a capacidade de reduzir a inflamação e promover a reparação tecidual (ARNOLD 2007). Os neutrófilos têm a responsabilidade de remover os detritos decorrentes da lesão muscular, mas também podem promover dano a membrana celular, por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) como superóxido, ou pela formação de ácido hipocloroso, gerado a partir do peróxido de hidrogênio (TIDBALL, 2011). Além disso, o sistema complemento, ao serem ativados também podem causar dano a membrana, por meio de ação direta ou pelo aumento na quantidade (KAJITA e HUGLI, 1990) ou atividade dos neutrófilos (CAVAILLON, FITTING e HAEFFNER-CAVAILON, 1990).

O cálcio que invade o citoplasma pode ativar as metaloproteinases (MMPs) por meio do aumento na produção de óxido nítrico (NO) (BREDT e SNYDER, 1990 e YAMADA et al., 2008). Essas MMPs por sua vez, causam a liberação do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (DIMARIO et al., 1989) e do fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (NALDINI et

al., 1991), os quais podem estimular a ativação e proliferação das células satélites (CORNELISON e WOLD, 1997).

As células satélites estão localizadas entre a membrana basal e a membrana plasmática da fibra muscular (MAURO 1961), sendo responsáveis pelo crescimento e reparo muscular em resposta à estímulos como exercício, doença ou lesões (CHANG e RUDNICKI, 2014). Durante a homeostase, as células satélites adultas são mantidas em estado quiescente (SCHULTZ, GIBSON e CHAMPION, 1978), expressando o fator de transcrição “*paired box*” PAX7 (CHANG e RUDNICKI, 2014), comumente utilizado como marcador de células satélites (YAMANE et al., 2005; YIN, PRICE e RUDNICKI, 2013).

Após lesão muscular, as células satélites são ativadas, se proliferam e se dividem, originando células progenitoras miogênicas, também conhecida como mioblastos adultos (TIDBALL, 2011; CHARGÉ e RUDINICKI, 2004). Durante a ativação e proliferação, as células satélites continuam a expressar PAX7, co-expressando ainda MYOD, um fator de transcrição essencial na diferenciação miogênica (ZAMMIT et al., 2006). PAX7 regula genes comprometidos com a proliferação e inibição da diferenciação miogênica (SOLEIMANI et al., 2012), além de induzir a expressão de alguns fatores regulatórios miogênicos (MRFs), como MYF5 e MYOD (MCKINNELL et al., 2008). Após proliferação, os mioblastos adultos saem do ciclo celular indo para o estágio de diferenciação, apresentando uma regulação negativa de PAX7, a qual, não exerce mais ativada transcricional (ZAMMIT et al., 2006). Durante a diferenciação, ocorre aumento na expressão de miogenina (TIDBALL, 2011), responsável pela iniciação da diferenciação terminal, juntamente com MRF4 (RUDNICKI et al., 2008).

Uma parte das células satélites ativadas e proliferadas são capazes de resistir à diferenciação durante a lesão muscular, retornando ao estado de quiescência após a regeneração, repondo o *pool* de células satélites, as quais serão utilizadas em uma lesão subsequente (COLLINS et al., 2005). Essas células mantêm a expressão de PAX7 ao mesmo tempo que diminuem a expressão de MYOD (ZAMMIT et al., 2004).

Há vários anos cientistas esportivos têm buscado alternativas para minimizar o dano muscular esquelético, buscando diminuir o intervalo entre as sessões de exercício, otimizando os ganhos adquiridos pelo treinamento. Atualmente utiliza-se o ultrassom como um recurso terapêutico na estimulação do reparo tecidual, contudo alguns estudos não apresentaram melhora na regeneração do músculo esquelético (WILKIN et al., 2004; MARKERT et. al., 2005). Outro recurso terapêutico utilizado no favorecimento do processo de reparo muscular é

a laserterapia de baixa intensidade, porém esse recurso apresenta alguns parâmetros ainda sem definição clara quanto a sua aplicação (PEPLOW et al., 2010). Os anti-inflamatórios não esteroides são comumente utilizados como recurso terapêutico, demonstrando eficácia na ativação de células satélites e na aceleração da regeneração do músculo esquelético (MACKEY et al., 2016). No entanto, esses fármacos demonstraram não serem seletivos, controlando a inflamação local e afetando outras regiões (FOWLER, 2018). Além desses recursos terapêuticos ora citados, a melatonina poderia ser um importante aliado nesse processo, apresentando propriedade anti-inflamatória (LIANG et al., 2009; CHUANG et al., 1996 e HARDELAND, 2018) e anti-apoptótica (STRATOS et al., 2012), além de características antioxidante direta e indireta (GALANO 2011 e HARDELAND, 2005), produzindo efeito redutor no processo pró-inflamatório e de estresse oxidativo (BECK et al., 2015A) induzido pelo exercício. Nesse contexto, a atenuação do estresse oxidativo e resposta inflamatória parecem ser fundamentais para a redução do dano induzido por exercício físico.

Apesar de todas essas referências, a literatura carece de informações a respeito dos possíveis efeitos diretos da melatonina sobre o marcador de células satélites (PAX7) essenciais na regeneração muscular.

Diante dessas informações seria importante investigar os efeitos da melatonina sobre a expressão de PAX7, bem como sua possível influência sobre o dano muscular induzido por exercício físico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da administração aguda de melatonina sobre marcadores teciduais e séricos de dano muscular esquelético induzido por uma sessão de exercício de natação durante período de maior atividade física espontânea em animais noturnos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar o efeito da melatonina sobre a concentração de creatina quinase MM (CK-MM) e lactato desidrogenase (LDH) 24, 48 e 72 horas após a realização do protocolo de indução ao dano muscular esquelético;
- b) Determinar o efeito da melatonina na expressão, de PAX7 24, 48 e 72 horas a realização do protocolo de indução ao dano muscular esquelético.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ESTRUTURA E FUNÇÕES DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

O músculo esquelético consiste em um dos tecidos mais plásticos e dinâmicos do corpo humano, constituindo aproximadamente 40% da massa corporal total, contendo 50 a 75% de todas as proteínas corporais (FRONTERA e OCHALA, 2015), sendo responsável por várias funções. Da perspectiva mecânica, a sua principal função é a conversão de energia química em energia mecânica, para geração de força necessária para a manutenção da postura corporal e realização de movimentos. Do ponto de vista metabólico, os músculos têm como funções, a contribuição ao metabolismo energético basal, armazenamento de substratos, produção de calor e consumo de oxigênio e energia (WOLFE, 2006).

A musculatura esquelética contém um arranjo formado por fibras musculares e tecido conjuntivo. As fibras musculares são constituídas por células multinucleadas e pós-mitóticas, sendo o núcleo de cada célula responsável pelo controle do tipo de proteína sintetizada (FRONTERA e OCHALA, 2015).

O tecido muscular contém algumas camadas de tecido conjuntivo. A camada de tecido que envolve o músculo é chamada de epimísio. Uma outra camada, chamado de perimísio, circunda feixes denominado fascículo. Já o endomísio é uma fina camada de tecido conjuntivo que envolve cada fibra muscular, separando-as das fibras vizinhas. Ainda, abaixo do endomísio e circundando cada fibra muscular está o sarcolema, a qual envolve o conteúdo celular da fibra, constituído por uma membrana plasmática (plasmalema) e uma membrana basal (MCARDLE, KATCH e KATCH, 2015).

As fibras musculares são constituídas de 75% de água, 20% de proteínas divididas em proteína contrátil, proteína reguladora e proteína citoesquelética, além de 5% de sais e outras substâncias. Cada fibra muscular é composta por miofibrilas, que são unidades funcionais menores posicionadas paralelamente ao eixo longitudinal da fibra e miofilamentos, que são subunidades ainda menores, também localizadas paralelamente ao eixo longitudinal a fibra. Os miofilamentos quando reunidos em padrão coordenado formam os sarcômeros, que são unidades contráteis básicas do músculo esquelético. Dois dos miofilamentos mais numerosos presentes nas fibras musculares são a actina e a miosina. Várias outras proteínas são responsáveis ou pela função estrutural ou pela interação dos filamentos proteicos na contração muscular (MCARDLE, KATCH e KATCH, 2015).

3.2 DANO MUSCULAR ESQUELÉTICO E CÉLULAS SATÉLITES

O dano muscular esquelético induzido por exercício (DMIE) difere no tipo, intensidade e duração do treinamento (MALM, 2001), podendo resultar em ruptura do sarcolema, lâmina basal e tecido conjuntivo, ou mesmo lesão às proteínas do citoesqueleto ou contráteis da miofibrila (VIERCK et al., 2000). O DMIE é aumentado em exercícios excêntricos, sendo as fibras de contração rápida mais suscetíveis ao dano (VIJATAN et al., 2001; FRIDÉN, SJOSTROM e EKBLÖM, 1983), provavelmente por sua capacidade oxidativa reduzida ou pelas tensões mais altas geradas por elas durante o exercício (PROSKE e MORGAN, 2001).

Ações musculares excêntricas podem provocar perturbações na estrutura muscular, aumento de proteínas intramusculares específicas e diminuição da capacidade de gerar força (HYLDAHL e HUBAL, 2014; MACKAY e KJAER, 2017). Tais sintomas podem ser causados por diversos tipos de exercícios, dentre eles o exercício intermitente de alta intensidade (LEEDER et al., 2014).

A extensão do dano muscular é comumente avaliada através de marcadores indiretos, como, força muscular reduzida (DAMAS et al., 2016, PAULSEN et al., 2012), dor muscular de início tardio (DMIT) (WARREN, LOWE e ARMSTRONG, 1999) e o extravasamento plasmático de proteínas específicas do músculo, tais como CK isoforma músculo esquelético MM (CK-MM) e lactato desidrogenase (LDH) (WARREN, LOWE e ARMSTRONG, 1999). Essas proteínas musculares demonstram uma relação temporal não muito satisfatória com a função muscular (FRIDÉN e LIEBER, 2001), sendo melhor utilizadas como marcador de confirmação de dano ao invés de um marcador da extensão do dano (OWENS et al., 2019). De fato, o aumento nas concentrações extracelulares de proteínas musculares localizadas no citosol segue uma progressão diária, após aplicação de força excêntrica, indicando que o dano à membrana celular causado pela carga muscular ocorre por meio de outros fatores além do dano mecânico (TIDBALL, 2011).

Os mecanismos relacionados ao DMIE podem ser divididos em duas fases, dano primário ocasionado pelo trabalho mecânico realizado e dano secundário, associado à resposta inflamatória (OWENS et al., 2019). O dano primário ocorre provavelmente pelo carregamento mecânico do músculo durante o exercício, sendo caracterizado por estiramento excessivo dos sarcômeros, causando um aumento de tensão em estruturas passivas, tais como o disco Z, resultando em sua deformação (TIDBALL, 2011), além de lesão nos componentes do sistema de excitação-contração (E-C) acarretado por danos ao sarcolema (PROSKE e MORGAN,

2001). Já o dano secundário é caracterizado por um influxo de Ca^{2+} extracelular para o citoplasma (ARMSTRONG, 1984), causando mais dano à membrana celular, através da ativação de fosfolipase A2 e proteases dependentes de cálcio como a calpaína (TIDBALL, 2011). A calpaína promove a protease de α -actinina e desmina causando danos ao disco Z e filamentos intermediários (TIDBALL, 2011). Já a fosfolipase A2 pode estimular a produção de radicais livres podendo aumentar a lesão na membrana celular (TIDBALL, 2011) além de hidrolisar glicerol formando lisofosfolípídeo e ácido araquidônico. O ácido araquidônico é então metabolizado por ciclooxigenase formando leucotrienos e prostaglandinas (MURAKAMI, 2019) os quais promovem a inflamação (FUNK, 2001).

A resposta inflamatória inicial é caracterizada por aumento na infiltração de células do sistema imune, primeiramente de neutrófilos, seguido pelos macrófagos CD68(+) M1 (TIDBALL e VILLALTA, 2010), os quais, posteriormente, podem ser convertidos em um fenótipo anti-inflamatório, com a capacidade de reduzir a inflamação e promover a reparação tecidual (ARNOLD et al., 2007). Os neutrófilos são responsáveis pela remoção dos detritos produzidos na lesão muscular, além de promover dano a membrana celular, provavelmente através da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) como superóxido, ou pela formação de ácido hipocloroso, mediado pela mieloperoxidase, gerado a partir de outra ERO, o peróxido de hidrogênio (TIDBALL, 2011).

Além disso o sistema complemento, uma grande família de proteínas solúveis, as quais fazem parte do sistema imune, também podem provocar danos a membrana celular, após serem ativadas. De fato, o trauma ativa proteases responsáveis por clivar as proteínas do complemento em fragmentos ativos, os quais podem causar dano a membrana por meio de ação direta ou pelo aumento na quantidade (KAJITA e HUGLI, 1990) ou na atividade de células mieloides, como os neutrófilos (CAVAILLON, FITTING e HAEFFNER-CAVAILON, 1990). Estas células podem aumentar o dano a membrana através de mecanismos induzidos pelos radicais livres, já citados anteriormente.

Após lesão, são liberadas metaloproteinases (MMPs), as quais podem estar armazenadas ou mesmo serem expressadas pelo músculo (KHERIF et al., 1999). Essas MMPs podem clivar os proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPs), localizados no tecido conjuntivo que envolve as fibras musculares, causando a liberação de um fator de crescimento denominado, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o qual permanece normalmente conectado aos HSPs (DIMARIO et al., 1989). Esse FGF liberado após lesão pode ativar as células satélites, essenciais ao reparo muscular (TIDBALL, 2011). Além disso, as MMPs podem causar a

liberação de outro fator de crescimento, denominado, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), os quais também permanecem ligados a HSPs (NALDINI et al., 1991). HGF por sua vez, pode desencadear a ativação e proliferação de células satélites (CORNELISON e WOLD, 1997).

A ativação das células satélites após dano muscular pode ser oriunda do aumento na produção de óxido nítrico (NO). De fato, o cálcio que invade o citoplasma ativa a enzima NOS neuronal (nNOS), localizada no sarcolema, por meio do cálcio e da calmodulina (BREDT e SNYDER, 1990). nNOS, por sua vez, estimula a produção de NO, o qual é capaz de aumentar tanto a expressão quanto a ativação das MMPs (YAMADA et al., 2008), desencadeando todo o processo descrito anteriormente.

As células satélites (CS) foram descritas primeiramente por Alexander Mauro como células mononucleadas localizadas entre a membrana basal e a membrana plasmática da fibra muscular (MAURO, 1961), sendo responsáveis pelo crescimento e reparo muscular em resposta ao exercício físico, doença ou lesões (MAURO, 1961; CHANG e RUDNICKI, 2014; COLLINS, 2005; KUANG et al., 2006).

De fato, no reparo muscular que se inicia após lesão, as células satélites são ativadas e dão início à sua proliferação, passando pelo processo de divisão celular (TIDBALL, 2011), originando células progenitoras miogênicas, também conhecida como mioblastos adultos (CHARGÉ e RUDINICKI, 2004). Após a proliferação, essas células saem do ciclo celular passando para o estágio inicial de diferenciação, onde as células precursoras miogênicas se fundem (TIDBALL, 2011) para reparar o músculo danificado (CHARGÉ e RUDINICKI, 2004) ou formar miotubos multinucleados, seguindo para o estágio de diferenciação terminal, onde os miotubos irão crescer e se diferenciar em fibras musculares maduras (TIDBALL, 2011).

O avanço das CS no decorrer do programa miogênico é minuciosamente regulado por fatores de transcrição, como “*paired box*” PAX7 e os fatores regulatórios miogênicos (MRFs), uma família de fatores de transcrição “*basic helix-loop-helix*”, a qual inclui o fator miogênico 5 (MYF5), a proteína de determinação de mioblastos (MYOD), miogenina e o fator regulatório específico do músculo 4 (MRF4) (CHANG e RUDNICKI, 2014).

Durante a homeostase, as células satélites permanecem quiescentes em seu nicho (SCHULTZ, GIBSON e CHAMPION, 1978). Toda célula satélite, em estado de quiescência ou proliferação expressa PAX7 (SEALE et al., 2000), tornando-o um biomarcador canônico para essa célula (YIN, PRICE e RUDNICKI, 2013) (CHANG e RUDNICKI, 2014), além de

ser um fator de transcrição essencial no controle da expansão e diferenciação de CS durante a miogênese adulta (VON MALTZAHN et al., 2013). No entanto, a presença de um fator de transcrição, não implica necessariamente na capacidade do mesmo em ativar a transcrição, contudo, mesmo em células quiescentes, foi demonstrado que PAX7 é capaz de coordenar a transcrição gênica (ZAMMIT et al., 2006).

Durante os estágios de ativação e proliferação, a célula satélite continua expressando PAX7, mantendo também sua atividade transcricional e co-expressando ainda, MYOD, essencial na diferenciação miogênica (ZAMMIT et al., 2006). PAX7 tem a capacidade de regular genes comprometidos com a proliferação e inibição da diferenciação miogênica (SOLEIMANI et al., 2012), além de regular e induzir a expressão de MYF5 e MYOD, através de alterações de cromatina as quais estimulam a ativação transcricional de genes, responsáveis pelo controle da entrada no programa miogênico (MCKINNELL et al., 2008). Já no estágio de diferenciação celular, PAX7 começa a ser regulada negativamente, não exercendo mais atividade transcricional (ZAMMIT et al., 2006). Durante essa fase há ainda aumento na expressão de miogenina (TIDBALL, 2011), que juntamente com MRF4, são responsáveis pela iniciação da diferenciação terminal (RUDNICKI et al., 2008).

Parte das células satélites que sofreram ativação e proliferação, mantêm a expressão de PAX7 e diminuem a expressão de MYOD (ZAMMIT et al., 2004), tornando-se capazes de resistir à diferenciação durante a lesão muscular e retornar ao estado de quiescência após a regeneração, com o objetivo de repor o *pool* de células satélites, as quais serão utilizadas em uma lesão subsequente (COLLINS et al., 2005).

Assim, PAX7 pode ser utilizado como biomarcador canônico de célula satélite (YAMANE et al., 2005; YIN, PRICE e RUDNICKI, 2013), apresentando expressão durante a quiescência, e os estágios iniciais de reparo muscular, como, ativação e proliferação de CS (SEALE et al., 2000; ZAMMIT et al., 2006). Sabendo que esses estágios são iniciados como resposta a uma lesão muscular esquelética, poderíamos então utilizar esse fator de transcrição como possível indicador de dano após exercício.

3.3 MELATONINA: EFEITOS FISIOLÓGICOS E VIAS DE SINALIZAÇÃO

A melatonina é o principal hormônio secretado principalmente pela glândula pineal sendo isolada e caracterizada pela primeira vez a partir da pineal bovina pelo dermatologista Aaron Lerner em 1958 (LERNER et al., 1958). Outros tecidos como retina, intestino, pele, plaquetas e medula óssea também secretam melatonina, porém sua contribuição é

principalmente local, atuando de forma autócrina, parácrina e intrácrina (CLAUSTRAT e LESTON, 2015).

Os pinealócitos são responsáveis pela síntese desse hormônio, a qual é controlada pelos núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos (NSQ), seguindo até o núcleo paraventricular (NPV) também localizados no hipotálamo. O NPV projeta-se diretamente ou indiretamente até os neurônios simpáticos pré-ganglionares nos primeiros segmentos torácicos da medula espinhal. Por meio de uma projeção do neurônio simpático pós-ganglionar dos gânglios cervicais superiores, as fibras nervosas atingem a glândula pineal (AMARAL E CIPOLLA-NETO, 2018). A síntese de melatonina é inibida pela presença de luz, através de degradação da melanopsina presente nas células ganglionares fotorreceptivas da retina, as quais se projetam, até o hipotálamo, por meio da via retino-hipotalâmica (AMARAL E CIPOLLA-NETO, 2018).

Esse hormônio é sintetizado a partir do triptofano retirado da circulação, transformando-o em 5-hidroxitriptofano. Essa molécula é convertida em serotonina, a qual é transformada em N-acetilserotonina (NAS) pela enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT), enzima limitante da síntese de melatonina. A partir da NAS é que ocorre a conversão em melatonina pela enzima acetilserotonina O-metiltransferase (ASMT), também denominada hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) (AMARAL E CIPOLLA-NETO, 2018). O controle principal desse processo é através do sistema de temporização circadiano, em sincronia com o ciclo claro/escuro, sendo limitado ao período noturno, sem a presença de luz. Isso torna a melatonina um representante interno do fotoperíodo diário e sazonal, controlando a fisiologia do organismo durante o período de 24 horas diárias e durante as estações do ano (AMARAL E CIPOLLA-NETO, 2018).

Em mamíferos, a melatonina pode exercer seus efeitos por meio de: ligação a receptores de membrana, a proteínas intracelulares e à receptores nucleares órfãos (EMET et al., 2016).

Existem três tipos de receptores de melatonina de membrana e um receptor nuclear:

1. Receptor de melatonina do tipo 1a: Mel1a, M11a, M11, MT1 e MTNR1A.
2. Receptor de melatonina do tipo 2b: Mel1b, M11b, MT2 e MTNR1B.
3. Mel1c e MTNR1C
4. RZR/ROR α : receptor nuclear órfão relacionado ao retinóide

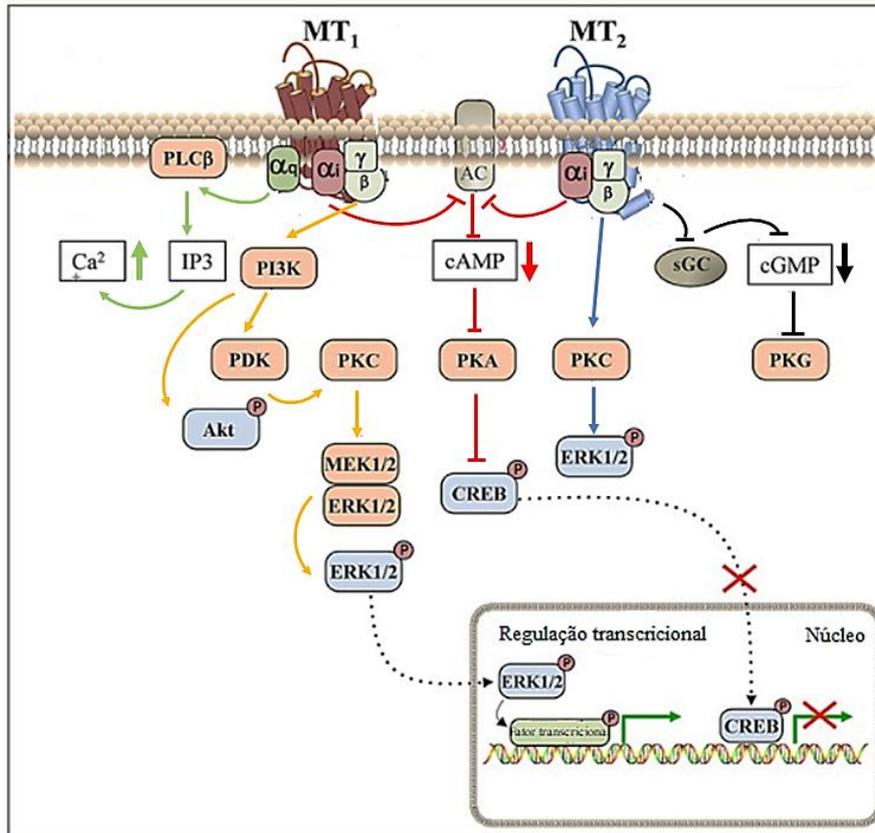
O primeiro receptor de melatonina clonado a partir de melanóforos de *Xenopus laevis*, foi um subtipo de receptor, chamado de Mel1c, sendo expresso somente em espécies não

mamíferas como, peixes, aves e galinhas (EBISAWA et al., 1994). Outros dois subtipos de receptores de melatonina, Mel1a e Mel1b, foram clonados a partir de seres humanos (REPPERT et al., 1994 e REPPERT et al., 1995), sendo suas nomenclaturas internacionais oficiais, MT1 e MT2, respectivamente (MASANA e DUBOCOVICH, 2001).

Ambos os receptores, MT1 e MT2, são pertencentes à superfamília dos receptores de membrana acoplados à proteína G (GPCR), constituídos por 350 e 362 aminoácidos respectivamente, apresentando alta homologia (55% no total e 70% nos domínios transmembranares), além de compartilharem de sequências específicas de aminoácidos, sugerindo a participação de ambos em uma subfamília específica (JOCKERS et al., 2008).

Os receptores de melatonina, MT1 e MT2, possuem alta afinidade pelo ligante natural, sendo ambos acoplados à subunidade inibitória da proteína G. A principal via de sinalização ativada por MT1 e MT2 inclui a redução da atividade da adenilato ciclase levando a uma diminuição nas concentrações intracelulares do segundo mensageiro monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) e consequente inibição da proteína quinase A (PKA) e do fator de transcrição CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP), regulando negativamente a transcrição de genes (CECON, OISHI e JOCKERS, 2018). Os receptores MT1 também estão acoplados às proteínas Gq, a qual ativa fosfolipase C (PLC), que por sua vez ativa inositol trifosfato (IP3), aumentando as concentrações de cálcio intracelular. A interação entre melatonina e os receptores MT1 e MT2 pode resultar na ativação das subunidades G $\beta\gamma$ da proteína Gi, ativando as vias PI3K / AKT através de MT1 e PKC / ERK por meio de ambos os receptores, regulando positivamente a transcrição de genes (OISHI, CECON e JOCKERS, 2018). Já os receptores MT2 além de inibirem a adenilato ciclase como citado anteriormente, também possuem a capacidade de inibir a formação de 3',5' monofosfato de guanosina cíclica (cGMP) por meio da via guanilato ciclase solúvel (sGC) (PETIT et al., 1999) (Figura 1).

Figura 1 – Figura ilustrando as vias de ativação e inibição dos receptores de melatonina (MT1 e MT2).



PLCβ: fosfolipase C β; IP3: inositol trifosfato; Ca²⁺: cálcio; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; AKT: serina-treonina quinase B/proteína quinase B; PDK: piruvato desidrogenase quinase; PKC: proteína quinase C; MEK: proteína ativada por mitógeno; ERK: proteína regulada por sinais extracelulares; AC: adenilato ciclase; cAMP: monofosfato de adenosina cíclica; PKA: proteína quinase A; CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP; sGC: guanilato ciclase solúvel; cGMP: monofosfato de guanosina cíclica; PKG: proteína quinase G. Fonte: Figura adaptada de Cecon, Oishi and Jockers 2017.

Os receptores nucleares fazem parte de superfamília composta por fatores de transcrição ativado por ligantes e receptores órfãos, que tem como função transduzir os sinais hormonais para o núcleo (LARDONE et al., 2011).

A subfamília ROR de receptor nuclear órfão é composta por três membros estruturalmente relacionados ROR α (BECKER-ANDRÉ, ANDRÉ e DEÇAMARTER, 1993), ROR β (CARLBERG et al., 1994) e ROR γ (HIROSE, SMITH e JETTEN, 1994). A ligação direta entre melatonina e receptores nucleares órfãos como ROR α ainda é controversa na literatura (LARDONE et al., 2011).

Existe ainda o MT3 anteriormente chamado de ML2, em humanos quinona redutase 2 (QR2), uma enzima pertencente ao grupo redutase (OISHI, CECON e JOCKERS, 2018), envolvida na prevenção do estresse oxidativo, inibindo as reações de transferências de elétrons

das quinonas (EMET et al., 2016). Contudo, esse sítio de ligação demonstra baixa afinidade para a melatonina, apresentando rápida associação/dissociação de ligante (MOLINARI, NORTH e DUBOCOVICH, 1996).

No músculo esquelético especificamente, a melatonina se acumula nas mitocôndrias (STACCHIOTTI, FAVERO e RODELLA, 2020), exercendo seus efeitos se ligando ao receptor do tipo MT1 (MEHANNA et al., 2017). Um dos efeitos dessa indolamina no músculo esquelético é a sustentação do tamanho e da função adequada das mitocôndrias, provavelmente através da via PGC1-alfa e mitofusina 2 (MF2), indicadores de atividade mitocondrial e fusão (FAVERO et al., 2019). Além disso a melatonina é capaz de melhorar a crista e a forma das mitocôndrias (FAVERO et al., 2017). Ainda no músculo, a melatonina é capaz de reduzir a apoptose por meio de uma diminuição na proporção de proteínas pró e anti-apoptóticas, bem como a quantidade de caspases 3, proteína também responsável por apoptose (STRATOS et al., 2012).

Mais recentemente demonstrou-se a capacidade da melatonina em agir diretamente sobre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênios (ERN) sem ligação a receptores, transferindo elétrons e hidrogênio (GALANO, 2011). Além disso, os metabólitos da melatonina: 3-hidroxi-melatonina cíclica (c3OHM), N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e N1-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) proporcionam uma proteção extra contra os danos oxidativos por meio dos mesmos mecanismos citados acima (REITER, TAN e GALANO, 2014).

A melatonina também pode agir indiretamente estimulando, em condições basais, enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase intracelular, glutatona peroxidase e catalase. Já em condições de alto estresse oxidativo, esse hormônio protege as enzimas citadas acima dos danos causados pelos radicais livres, preservando suas atividades. Além disso, a melatonina inibe as enzimas pró-oxidantes: óxido nítrico sintase, mieloperoxidase e peroxidase eosinofílica (HARDELAND, 2005).

Além dos efeitos citados, a melatonina ainda exerce ação anti-inflamatória inibindo a ativação do NK- κ B ao bloquear a fosforilação de IKK e JNK e suas consecutivas vias em tecido hepático (LIANG et al., 2009), prejudicando a ligação do NK- κ B ao DNA no baço (CHUANG et al., 1996) e reduzindo a expressão de citocinas (HARDELAND, 2018).

Diante de todas essas informações, as evidências mostram a capacidade da melatonina em atuar no músculo esquelético, através de suas ações anti-inflamatórias, antioxidantes e anti-

apoptóticas, apresentando grande potencial para atuar também de maneira positiva na redução do dano muscular esquelético induzido por exercício físico.

4 METODOLOGIA

A dissertação está apresentada em duas etapas. A primeira etapa corresponde ao experimento I, utilizado para determinação do protocolo de indução ao dano muscular esquelético (PID). A segunda etapa corresponde ao experimento II, o qual analisamos o efeito da melatonina em marcadores teciduais e séricos após dano muscular induzido pelo PID.

4.1 EXPERIMENTO I

Abaixo, segue a descrição detalhada da metodologia aplicada no experimento I, o qual teve por objetivo determinar a prescrição adequada do PID.

4.1.1 Amostra e Condições Ambientais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da UFSCar e mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico, Departamento de Ciências Fisiológicas da mesma Instituição. Os experimentos envolvendo variáveis da cronobiologia necessitam de controle rigoroso das condições ambientais, como temperatura ambiente, umidade relativa e condições de luminosidade. Sendo assim, visando o bem-estar dos animais, durante todo o experimento os ratos foram alojados em gaiolas de polipropileno em ambiente climatizado a 22 ± 2 °C, com umidade relativa do ar entre 45 e 55% e alimentados com ração específica para roedores e água sem restrições. Os ruídos no biotério não excederam 85 decibéis e os experimentos foram realizados de acordo com a legislação Brasileira e normas correntes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, iniciando-se apenas após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSCar, número: 6595150419.

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 100W) nos ambientes de alojamento e testes físicos, instaladas em um potenciômetro para controle preciso da intensidade da luz. Tal lâmpada possui temperatura de cor de aproximadamente 2700K e comprimentos de onda entre 565 e 590nm, sendo equiparada ao padrão da luminosidade ambiental natural. Os ratos foram mantidos em ciclo claro/escuro de 10/14 horas respectivamente. A intensidade da luz não ultrapassou 60 lux dentro da gaiola durante o ciclo claro, devidamente aferida por um luxímetro. Para a realização de intervenções experimentais no período de vigília dos ratos (noturno), foram instalados refletores no biotério e sala de

avaliação, envoltos por um filtro vermelho (Marca ROSCO, modelo #fire19) que permitiu a emissão de ondas luminosas apenas acima de 600nm e com intensidade controlada em até 15 lux de incidência sobre os animais (BECK e GOBATTO, 2013).

4.1.2 Desenho Experimental

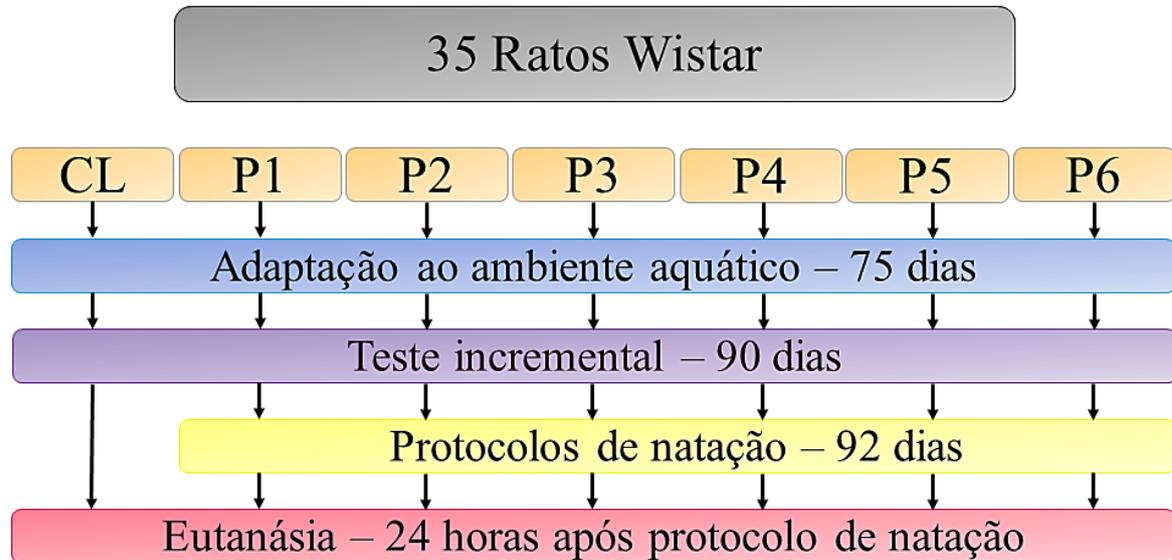
Recebemos em nosso biotério experimental um total de 35 ratos da linhagem Wistar, com 45 dias de idade. A partir dos 75 dias foi realizada a adaptação ao ambiente aquático (descrito a seguir), tendo por objetivo reduzir o estresse dos animais sem promover adaptações de treinamento físico aos mesmos (GOBATTO et al., 2001).

Aos 90 dias de idade os ratos foram submetidos ao teste incremental (TI), descrito adiante, para determinação da intensidade do limiar anaeróbio lactacidêmico (iLAn). No experimento I os ratos foram submetidos ao protocolo de dano aos 92 dias de idade, ou seja, dois dias após o iLAn. Foram realizados 6 protocolos diferentes de natação (detalhados a seguir), afim de selecionarmos o melhor protocolo de indução ao dano muscular esquelético (PID).

O experimento I teve como objetivo, identificar a prescrição adequada do PID no exercício de natação, com intensidade e duração suficientes para promover dano muscular esquelético. As intensidades utilizadas foram prescritas individualmente de acordo com os resultados obtidos no teste incremental (TI). Esse experimento apresentou como desenho experimental a construção de 7 grupos de 5 animais cada, sendo eles: controle (CL), e os grupos P1, P2, P3, P4, P5 e P6, todos os animais foram eutanasiados 24 horas após a realização do exercício (Figura 2).

Imediatamente após a eutanásia foram extraídos e armazenados os músculos: glúteo máximo, gastrocnêmio porção branca, sóleo e gastrocnêmio porção vermelha, além de sangue, para posteriores análises, de acordo com a necessidade particular.

Figura 2 – Esquema representando a idade dos animais em dias e os procedimentos realizados durante esse período.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.3 Adaptação ao Ambiente Aquático

A adaptação ao ambiente aquático teve início aos 75 dias de idade dos animais, durante o período noturno, seguindo o protocolo utilizado por Manchado et al., (2006), com exposição progressiva ao ambiente aquático (tempo, profundidade e carga) por quinze dias ininterruptos. Todos os procedimentos foram conduzidos com natação individual, em tanques com 100cm de altura (80cm de profundidade de água), 30cm de diâmetro e água a $31\pm 1^{\circ}\text{C}$.

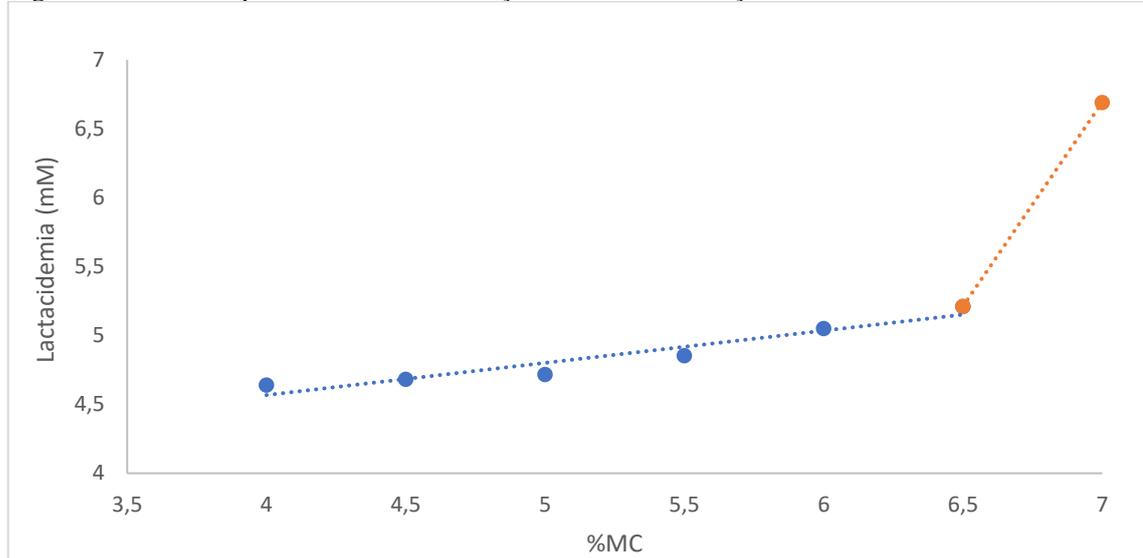
4.1.4 Teste Incremental de Natação (TI)

Aos 90 dias de idade todos os animais foram submetidos ao teste incremental (TI) de natação para determinação da intensidade individual de esforço correspondente à intensidade do limiar anaeróbio (iLAN) (BECK, CAMPESAN e GOBATTO, 2015B).

A exposição dos animais a cargas incrementais proporcionais ao longo do tempo leva a aumentos desproporcionais nas concentrações de lactato sanguíneo em um dado momento. O TI empregado neste experimento seguiu o modelo padronizado por (BECK, CAMPESAN e GOBATTO, 2015) que consistiu de estágios de 5 min com sobrecargas correspondentes a 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5% e 7% da massa corporal (% MC), amostras de sangue capilarizado da parte distal da cauda dos ratos foram coletadas após cada estágio para determinação das concentrações de lactato. As sobrecargas de chumbo foram inseridas no tórax dos animais usando uma cinta elástica. A concentração de lactato sanguíneo em relação à intensidade do exercício foi plotada graficamente. Em seguida, foram construídas duas regressões lineares seguindo o ponto de quebra descrito, definido como a interseção das regressões lineares

interpoladas ao eixo X. A intensidade correspondente a esta interpolação foi definida como a iLAN e utilizada na prescrição do exercício (Figura 3).

Figura 3 – Gráfico representando a concentração de lactato em relação à intensidade do exercício.

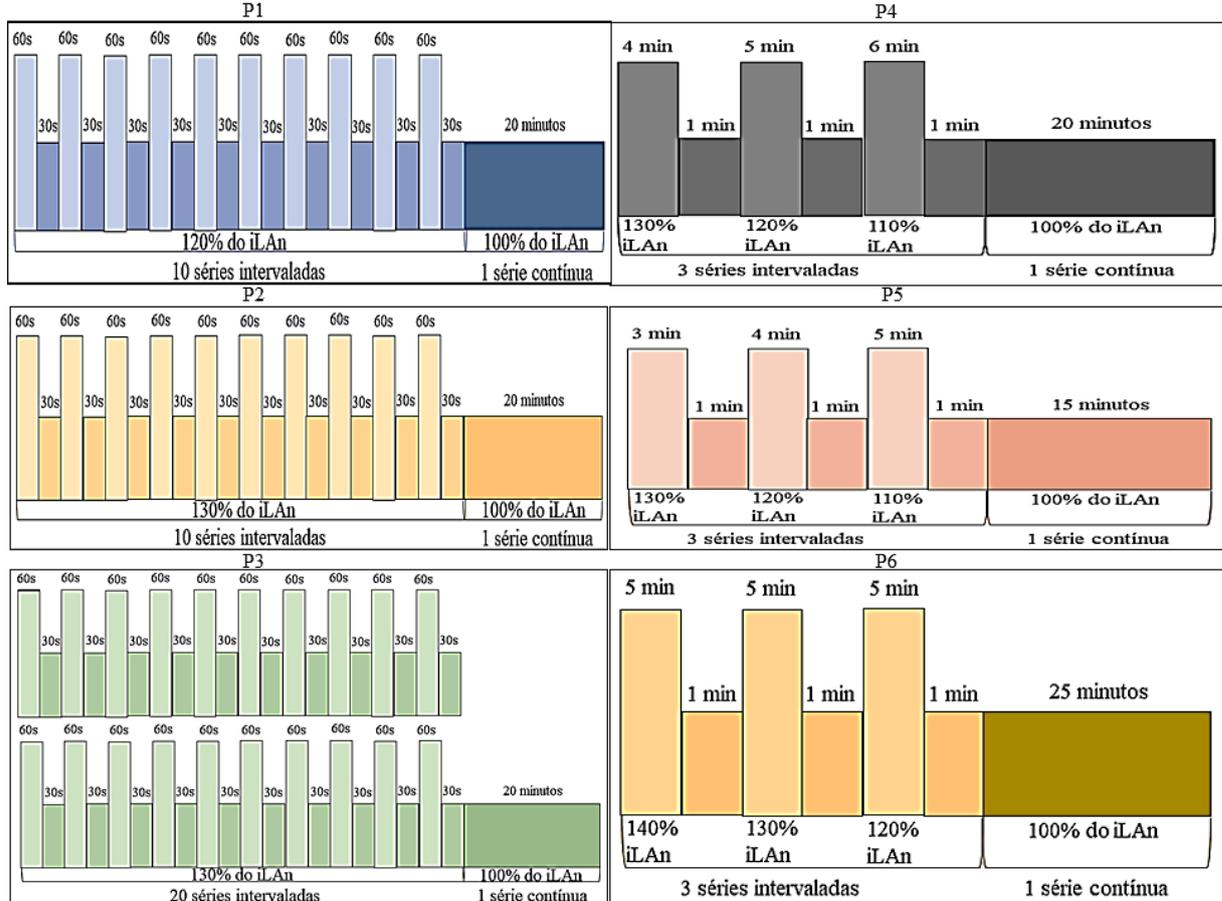


mM: miliMolar; % MC: porcentagem da massa corporal. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.5 Protocolos de Natação

Foram elaborados seis protocolos de natação (Figura 4), descritos detalhadamente a seguir, com duração e intensidades diferentes, com o objetivo de induzir dano muscular esquelético. Os protocolos realizados foram: protocolo 1 (P1), realizou 10 séries de 1 minuto de duração com 30 segundos de intervalo entre elas a 120% da iLAN, seguido de 20 minutos de nado contínuo a 100% da iLAN, totalizando 30 minutos de natação; protocolo 2 (P2), realizou 10 séries de 1 minuto de duração com 30 segundos de intervalo entre elas a 130% da iLAN, seguido de 20 minutos de nado contínuo a 100% da iLAN, totalizando 30 minutos de natação; protocolo 3 (P3), realizou 20 séries de 1 minuto de duração com 30 segundos de intervalo entre elas a 130% da iLAN, seguido de 20 minutos de nado contínuo a 100% da iLAN, totalizando 40 minutos de natação; protocolo 4 (P4), realizou 1 série de 3 minutos a 130% da iLAN, 1 série de 4 minutos a 120% da iLAN, 1 série de 5 minutos a 110% da iLAN com 1 minuto de intervalo entre elas, seguido de 15 minutos de nado contínuo a 100% da iLAN, totalizando 27 minutos de natação; protocolo 5 (P5), realizou 1 série de 4 minutos a 130% da iLAN, 1 série de 5 minutos a 120% da iLAN, 1 série de 6 minutos a 110% da iLAN com 1 minuto de intervalo entre elas, seguido de 20 minutos de nado contínuo a 100% da iLAN, totalizando 35 minutos de natação; protocolo 6 (P6), realizou 3 série de 5 minutos cada a 140, 130 e 120% da iLAN respectivamente com 1 minuto de intervalo entre elas, seguido de 25 minutos de nado contínuo a 100% da iLAN, totalizando 40 minutos de natação.

Figura 4 – Esquema representando a prescrição dos protocolos P1, P2, P3, P4, P5 e P6 de natação.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.6 Eutanásia

A eutanásia foi realizada por decapitação (conforme permitido pela *American Veterinary Medical Association – AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals*, 2013, compatível a este projeto de pesquisa).

4.1.7 Análise do Material Biológico

Descrição detalhada dos procedimentos utilizados nas análises dos materiais biológicos coletados, com o objetivo de determinar as concentrações de lactato sanguíneo para prescrição da intensidade utilizada nos protocolos de natação, comprovar o dano muscular esquelético induzido por exercício físico por meio das concentrações séricas de CK-MM, bem como das amostras de tecido muscular e por fim, analisar os conteúdos de glicogênio muscular.

4.1.7.1 Sangue

Durante o TI foram coletadas amostras de sangue (25µL) da cauda dos animais em tubos capilares heparinizados e calibrados, para determinação da concentração de lactato sanguíneo.

Essas amostras foram imediatamente transferidas para tubos plásticos de 1,5mL contendo 400 μ L de TCA (Ácido tricloroacético - 4%), agitadas e armazenadas a 4°C para posterior análise. Após agitação e centrifugação (3000RPM durante 3 minutos) foram extraídos 50 μ L de sobrenadante e transferido para microplaca de 96 poços, onde foram adicionados 250 μ L de solução reativa preparada para uso imediato (estoque glicina/EDTA e hidrazina-hidrato, NAD - Beta-nicotinamide dinucleotide e LDH - L-lactic dehydrogenase bovine heart), e devidamente ajustada a um pH de 9,45. Após agitação e período adequado de incubação, as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (SpectraMax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA) a 340nm e a concentração de lactato sanguíneo determinada em relação à curva padrão construída a partir de diluição seriada de L-Lactato de 1,5 a 15mmol/L.

Após eutanásia, foi coletada alíquota de aproximadamente 3mL de sangue. Essa alíquota permaneceu em repouso por cerca de 15 minutos em temperatura ambiente e foi centrifugada (15min, 3000RPM, 10°C), sendo o soro alíquotado em tubos plásticos e armazenado a -20°C. Tais alíquotas foram utilizadas para a determinação das concentrações séricas de creatina quinase isoforma músculo esquelética (CK-MM), utilizando kit comercial LaborLab, seguindo as instruções do fabricante. As amostras também foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (SpectraMax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA) a 340nm.

4.1.7.2 Tecido Muscular Esquelético

Descrição detalhada dos procedimentos utilizados nas análises das amostras de tecido muscular esquelético para determinação do dano muscular esquelético por meio da técnica de hematoxilina e eosina, bem como do conteúdo de glicogênio muscular.

4.1.7.2.1 Hematoxilina e Eosina

Os músculos gastrocnêmio porção branca foram excisados, selados em talco e congelados em nitrogênio líquido e, em seguida armazenados em freezer -80°C até seu processamento. Para análise da morfologia básica do tecido, os músculos foram transversalmente seccionados à uma espessura de 6 μ m, com auxílio do Criostato Leica CM 1850 UV à -25°C. Os cortes foram coletados em lâminas histológicas (26x76mm) e, posteriormente coradas através da técnica de hematoxilina eosina (HE). Nesse processo, as lâminas foram mergulhadas em diversas cubas com soluções específicas em cada uma delas, seguindo as etapas de hidratação, hematoxilina, eosina, desidratação e limpeza, determinadas pelas Diretrizes para Coloração de Hematoxilina e eosina de 2001. Após essas etapas, as lâminas

foram montadas com permount e lamínulas 24x50, sendo analisadas posteriormente em microscópio óptico Kasvi em lente objetiva com aumento de 40x.

4.1.7.2.2 Glicogênio

Para determinação do conteúdo de glicogênio foi seguido o protocolo de Dubois et al., (1956). As amostras de tecido muscular esquelético (150 à 250mg) (glúteo máximo, gastrocnêmio porção branca, sóleo e gastrocnêmio porção vermelha) foram armazenadas em tubos de ensaio e mantidos à -20°C. Esses tubos foram, posteriormente, retirados do freezer, distribuídos em estantes de aço inox e condicionados ao banho-maria (85°C, 4 minutos) para completa digestão do tecido. Posteriormente foram levados ao agitador até atingirem uma mistura homogênea e em seguida retornaram ao banho maria, onde foram acrescentados 0,1 mL de solução saturada de sulfato de sódio (Na₂SO₄). Após os tubos de ensaio serem novamente agitados, foram adicionados 3 mL de álcool bidestilado (70%), novamente levado ao banho maria (85°C) e em seguida centrifugado (5min, 2000RPM), causando uma precipitação do glicogênio. Feito isso, foi descartado o sobrenadante, adicionados 1 mL de água destilada quente e retornado ao agitador para diluição do pallet. Posteriormente foram adicionados 3 mL de álcool, condicionado novamente ao banho-maria e à centrífuga. Após o último descarte do sobrenadante, foram adicionados ao glicogênio precipitado 5 mL de água destilada quente, favorecendo assim a obtenção de uma solução homogênea quando agitada em vórtex, denominada volume de diluição final.

A leitura da absorbância da amostra ocorreu a partir da colorimetria, sendo adicionados 10µL de fenol + 800µL de água destilada + 200µL de volume de diluição final e 2mL de ácido sulfúrico. Para finalizar a preparação, os tubos foram levados em banho-maria por 5 minutos e agitados. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro marca Hach (Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico) utilizando cubeta de quartzo e comprimento de onda de 490nm.

4.1.8 Resultados Discutidos e Justificativa da Escolha do PID

Apresentação dos resultados encontrados no experimento I para adoção de um dos protocolos no experimento II e a justificativa, através desses resultados, da escolha do PID.

4.1.8.1 Creatina Quinase MM (CK-MM)

Analisando a concentração sérica de creatina quinase isoforma músculo esquelética (CK-MM) dos animais, foi constatado que todos os seis protocolos promoveram médias elevadas nas

concentrações dessa enzima, como apresentado na Tabela 1, demonstrando a eficácia de todos os protocolos em causar dano muscular esquelético. Contudo, os grupos P1, P3 e P6 apresentaram menor desvio padrão quando comparado aos grupos P2, P4 e P5. Vale ressaltar que o grupo CL também apresentou média elevada na concentração sérica de CK-MM, provavelmente, decorrente do TI. Observando isso, foi alterado para sete dias o período de intervalo entre o TI e a realização do PID no experimento II.

Tabela 1 – Concentração sérica de creatina quinase MM (CK-MM). Os valores estão expressos em média e desvio padrão (U/L).

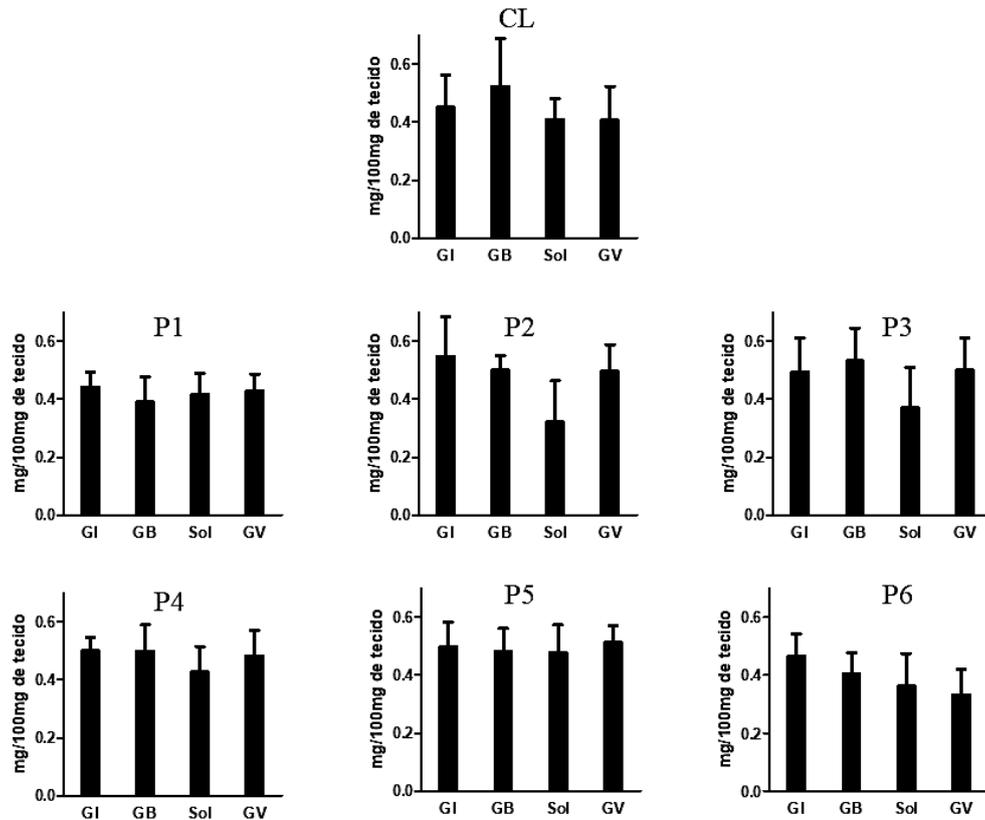
Creatina quinase – CK-MM (U/L)	
CL	687,04± 97,96
P1	592,19±190,23
P2	612,18±244,92
P3	695,25±176,45
P4	461,95±278,16
P5	557,09±244,12
P6	672,73±174,31

Dados relacionados a concentração sérica (U/L) de creatina quinase MM. Valores expressos em média e desvio padrão. CL: controle; P1: protocolo 1; P2: protocolo 2; P3: protocolo 3; P4: protocolo 4; P5: protocolo 5; P6: protocolo 6; U/L: Unidade/Litro

4.1.8.2 Glicogênio Muscular Esquelético

Verificando a média dos conteúdos de glicogênio dos músculos glúteo máximo, gastrocnêmio porção branca, sóleo e gastrocnêmio porção vermelha, apresentados na Figura 5, foi observado que, dentre os músculos com maior predominância de fibras do tipo II, os quais são mais susceptíveis ao dano (FRIDÉN, SJOSTROM e EKBLÖM, 1983), o gastrocnêmio porção branca apresentou maior depleção em seu conteúdo, indicando ser o músculo mais utilizado para esse tipo de exercício prescrito. Esses dados corroboram com um estudo realizado por nosso grupo (BECK et al., 2014), onde seus resultados demonstram que, o gastrocnêmio é um dos músculos com menor concentração de glicogênio após exercício exaustivo de natação. Quando comparado o conteúdo de glicogênio muscular do grupo controle com os demais grupos que realizaram exercício de natação (CL $0,523 \pm 0,164$; P1 $0,391 \pm 0,084$; P2 $0,501 \pm 0,0491$; P3 $0,532 \pm 0,113$; P4 $0,499 \pm 0,090$; P5 $0,482 \pm 0,079$ e P6 $0,403 \pm 0,073$ mg/100mg de tecido), foi demonstrado redução mais acentuada no grupo P1 em relação aos demais grupos (P1 -25,24%; P2 -4,21%; P3 1,72%; P4 -4,59%; P5 -7,84% e P6 -22,94%).

Figura 5 – Média do conteúdo de glicogênio dos músculos glúteo máximo, gastrocnêmio porção branca, sóleo e gastrocnêmio porção vermelha dos grupos P1 ao P6. Os valores estão expressos em média e desvio padrão (mg/100mg de tecido).

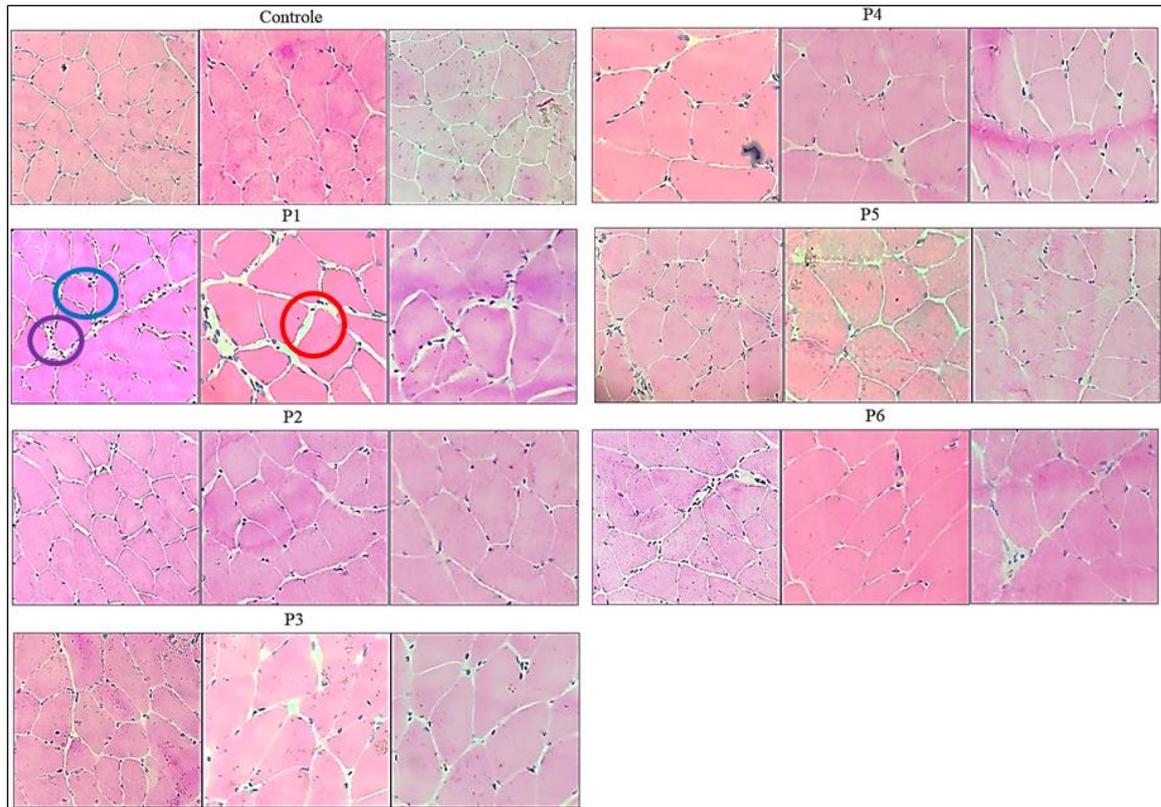


Dados relacionados ao conteúdo de glicogênio (mg/100mg de tecido). Valores expressos em média e desvio padrão. GI: Glúteo máximo; GB: Gastrocnêmio porção branca; Sol: Sóleo; GV: Gastrocnêmio porção vermelha; CL: controle; P1: protocolo 1; P2: protocolo 2; P3: protocolo 3; P4: protocolo 4; P5: protocolo 5 e P6: protocolo 6; mg: miligrama. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.8.3 Hematoxilina e Eosina

Analisando o corte transversal do músculo gastrocnêmio porção branca, corados através da técnica de HE, foi observado fibras musculares poligonais, distribuídas a uma distância equivalente no tecido do grupo Controle, essas características são típicas de fibras musculares normais (BRASILEIRO et al., 2007). Contudo, essas mesmas características não estão presentes no corte tecidual dos demais grupos, principalmente no grupo P1 onde foi encontrado infiltrado de células inflamatórias, edema e grandes quantidades de fibras polimórficas (Figura 6).

Figura 6 – Imagem de corte do músculo gastrocnêmio porção branca de três animais dos grupos controle, P1, P2, P3, P4, P5 e P6.



Círculo roxo: Infiltrado de células inflamatórias; círculo azul: fibra polimórfica e círculo vermelho: edema. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 EXPERIMENTO II

Após análise de todos os resultados encontrados no experimento I, foi definido o protocolo P1 como protocolo de indução ao dano muscular esquelético (PID), para a execução do experimento II, apresentado a seguir.

4.2.1 Desenho Experimental

Chegaram ao nosso biotério experimental, um total de 70 ratos, da linhagem Wistar, com 45 dias de idade, sendo divididos aleatoriamente em 7 grupos de 10 animais cada: 1) grupo controle (CL), o qual recebeu solução veículo (etanol e NaCl) e foram eutanasiados aos 98 dias de idade; três grupos receberam solução veículo (etanol e NaCl) imediatamente após a realização do exercício e foram eutanasiados, 24 (E24), 48 (E48) ou 72 (E72) horas após a realização do mesmo; três grupos receberam melatonina imediatamente após a realização do exercício e foram eutanasiados, 24 (EM24), 48 (EM48) ou 72 (EM72) horas após a realização do mesmo.

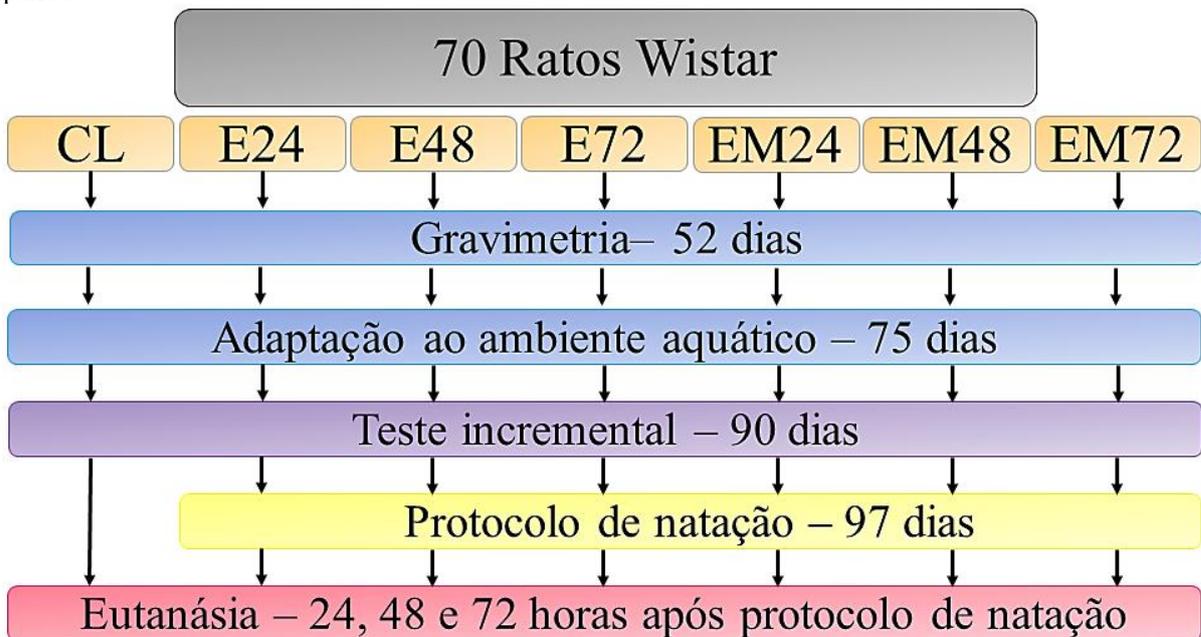
Os ratos foram alocados sobre as mesmas condições ambientais dos animais do experimento I, já descritas previamente de forma detalhada (ver amostra e condições

ambientais). Entre 52 e 75 dias de idade foi realizada análise gravimétrica afim de mensurar a atividade física espontânea para determinação do melhor horário para a realização das intervenções.

Aos 75 dias de idade iniciou-se a familiarização ao meio líquido por 15 dias ininterruptos, adotando o mesmo protocolo (MANCHADO et al., 2006) e padrões descritos anteriormente e utilizados no experimento I. Aos 90 dias de idade os ratos foram submetidos ao TI, seguindo os mesmos parâmetros descritos no experimento I.

Visto que a concentração de CK-MM dos animais do experimento I se encontrava elevada mesmo 72 horas após a realização do TI, os animais do experimento II foram submetidos ao protocolo de indução ao dano muscular esquelético com 97 dias de idade (Figura 7), ou seja, 7 dias após o TI, cumprindo rigorosamente as intensidades e durações do protocolo 1 (P1) do experimento I realizado anteriormente. Imediatamente após a realização do exercício os animais receberam aplicação de melatonina ou solução veículo e foram eutanasiados, 24, 48 ou 72 horas após esse procedimento. Após eutanásia, foi extraído e armazenado o músculo gastrocnêmio porção branca para posteriores análises.

Figura 7 – Esquema representando a idade dos animais em dias e os procedimentos realizados durante esse período.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 Análise Gravimétrica

A análise gravimétrica foi realizada por 3 dias não consecutivos entre 52 e 75 dias de idade por meio de um equipamento de gravimetria (BECK, SCARIOT e GOBATTO, 2016), o qual registra alterações gravitacionais, geradas pela contração muscular, a partir da atividade física espontânea (AFE) dos animais, em quaisquer deslocamentos horizontais e verticais. Esse método permite que a avaliação seja executada no mesmo ambiente que os animais se encontram alojados e sem absolutamente nenhuma percepção dos mesmos. A AFE foi medida por 26 horas ininterruptas, sendo excluído a primeira e a última hora por serem períodos de interferência dos pesquisadores, totalizando 24 horas de análise. As gaiolas foram colocadas sobre duas plataformas de ferro, os quais continham uma célula de carga fixada entre elas. O sinal captado por essa célula de carga era então enviado para um amplificador (MKTC5-10, MK controle e instrumentação), processado por um módulo USB analógico-digital (USB-6001, National Instruments) e por fim, enviado ao computador para registro em ambiente (LabView Signal Express® 2009, National Instruments™, Austin, Texas, EUA) a 30Hz. O aparelho foi brevemente calibrado aplicando massa conhecida. Foi criado então uma regressão linear, convertendo milivolts (mV) em quilogramas (Kg). Os sinais digitais foram tratados usando o MatLab® 7.0 (MathWorks™). Com isso foi possível determinar os períodos de maior e menor atividade física espontânea e definir o melhor horário de realização das intervenções.

4.2.3 Protocolo de Indução ao Dano Muscular Esquelético

O protocolo de indução ao dano muscular esquelético consistiu de 10 séries de 1 minuto de duração com 30 segundos de intervalo entre elas a 120% da iLAn, seguido de 20 minutos de nado contínuo a 100% da iLAn, totalizando 30 minutos de natação.

4.2.4 Administração de Melatonina

Melatonina (Sigma Aldrich Chemical Corporation, M-5250, >98%) foi dissolvida em etanol (<0,1%) e diluída em solução salina (NaCl 0,9%) para administração a $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (BECK et al., 2015A; BECK, SCARIOT e GOBATTO, 2016). A preparação foi realizada anteriormente a sua utilização e a droga armazenada em frasco âmbar, envolto por papel alumínio. A administração foi conduzida via intraperitoneal, imediatamente após a realização do protocolo de indução ao dano muscular esquelético.

4.2.5 Análise do Material Biológico

Descrição detalhada dos procedimentos utilizados nas análises dos materiais biológicos coletados, para determinação das concentrações de lactato sanguíneo para prescrição da intensidade utilizada no PID, das concentrações séricas de CK-MM e LDH para indicação de dano muscular esquelético induzido por exercício físico e da expressão de PAX7 por meio das amostras de tecido muscular esquelético.

4.2.5.1 Sangue

As análises para determinação da concentração de lactato foram realizadas seguindo os mesmos parâmetros descritos e utilizados no experimento I.

Após eutanásia, foi coletada uma alíquota de aproximadamente 3mL de sangue. Essa alíquota permaneceu em repouso por cerca de 15 minutos em temperatura ambiente, sendo centrifugada posteriormente (15min, 3000RPM, 10°C). O soro foi então, aliquotado em tubos plásticos e armazenado à -20°C. Tais alíquotas foram utilizadas para a determinação da concentração sérica de creatina quinase isoforma músculo esquelética (CK-MM) e lactato desidrogenase (LDH), utilizando kit comercial LaborLab, seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (SpectraMax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA) a 340nm.

4.2.5.2 Tecido Muscular Esquelético

Descrição detalhada dos procedimentos utilizados nas análises das amostras de tecido muscular esquelético para determinação da expressão de PAX7.

4.2.5.2.1 Expressão de PAX7 em Células Satélites

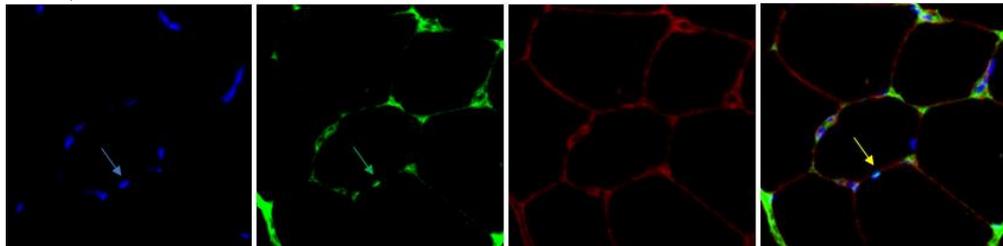
Os músculos gastrocnêmio porção branca também foram excisados, selados em talco e congelados em nitrogênio líquido e, em seguida armazenados em freezer -80°C até seu processamento. Os músculos foram transversamente seccionados à uma espessura de 6µm, com auxílio do Criostato Leica CM 1850 UV à -25°C. Os cortes foram coletados em lâminas histológicas (26x76mm).

Para análise quantitativa das células satélites as lâminas foram submetidas à técnica de imunofluorescência (IF). As lâminas foram incubadas em uma mistura de anticorpos monoclonais primários para PAX7 (diluição 1: 50; Santa Cruz Biotechnology, INC; Dallas, Texas, EUA) conjugado com laminina anti-coelho (diluição 1: 200; Abcam; Ab11575; Cambridge, Reino Unido) diluída em 1% BSA (Bovine Serum Albumin - Sigma Aldrich Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA) por 45 minutos a 37 °C. Em seguida, as lâminas

passaram por ciclos de lavagem (3 ciclos de 5 minutos) em solução PBS e em seguida foram incubadas em uma mistura de anticorpos secundários: Alexa 488 IgG1 para marcar PAX7 na cor verde (diluição 1: 200; Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC.; West Grove, PA, EUA), em combinação com Alexa Fluor 647 IgG (diluição 1: 500; Invitrogen; Carlsbad, Califórnia, EUA) para marcar laminina com cor vermelha; por 35 minutos a 37 °C. Os cortes foram novamente lavados (3 ciclos de 5 minutos) em solução PBS e montados com FluoroQuest™ Mounting Medium with DAPI (AAT Bioquest®, INC, Sunnyvale, CA, USA).

As lâminas foram analisadas com ImageXpress® Micro (Molecular Devices; San José, CA, EUA) em lente objetiva com aumento de 10x, com filtros específicos para PAX7 (FITC - exposição de 1200 ms), laminina (Cy5 – exposição de 200 ms) e núcleo (DAPI - exposição 200 ms). A quantificação de células satélites através da expressão de PAX7 foi realizada analisando todos os campos da secção tecidual, levando em consideração a sobreposição entre as marcações de PAX7 (FITC) e núcleo (DAPI), bem como sua localização intracelular em relação à laminina (CY5), como apresentado na Figura 8, utilizando o software ImageJ 1.52a (National Institutes of Health, EUA).

Figura 8 - Imagem representativa de um corte transversal, do músculo de rato, marcado com DAPI, PAX7 e laminina.



Detecção de PAX7 no músculo esquelético em uma única secção transversal o rato 5. A seta azul indica o núcleo marcado em azul, a seta verde indica PAX7 marcado em verde, laminina está marcado em vermelho e a seta amarela indica a célula satélite com sobreposição de núcleo e PAX7. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.6 Análise e Processamento Estatístico dos Dados

Os dados foram apresentados em média e desvio padrão. Normalidade e homogeneidade foram verificadas com os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Foi utilizado teste t independente para comparar a diferença entre as médias dos grupos (solução veículo e melatonina) para o tempo de nado executado, bem como teste t dependente para comparar a diferença entre as médias das variáveis (tempo de nado prescrito e tempo de nado executado). Foi empregado o teste ANOVA One-way, afim de comparar os dados do grupo CL, E24, E48 e E72, para as variáveis (CK-MM, LDH e PAX7). Foi utilizado o teste ANOVA Fatorial de duas vias para as análises dos efeitos principais (tempo e melatonina), além das possíveis

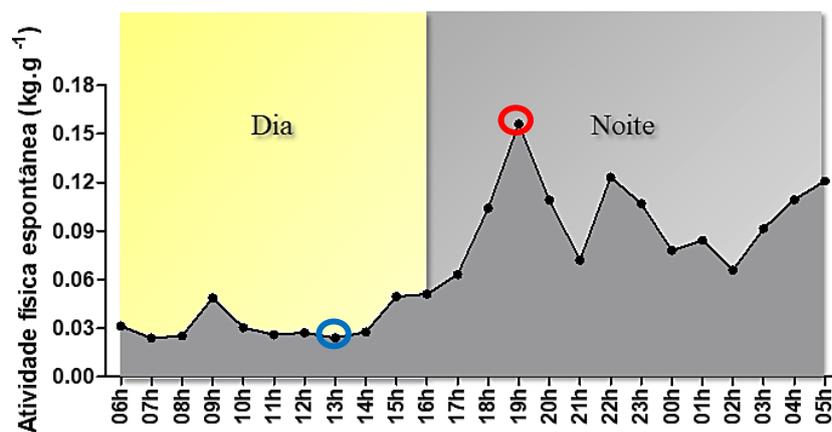
interações entre esses efeitos, utilizando teste post hoc de Newman-Keuls quando necessário. Para todas as ocasiões foi estabelecido um nível de significância de 5%.

4.2.7 Resultados

4.2.7.1 Gravimetria

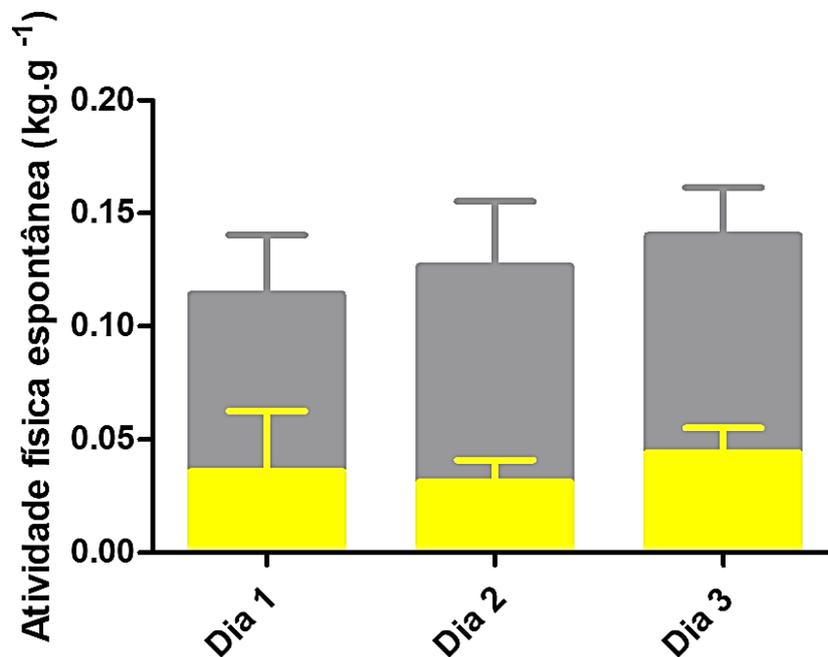
A somatória da atividade física espontânea (AFE), dos três dias analisados, demonstrou que, 77,20% da AFE diária ocorreu durante o ciclo escuro quando comparada ao ciclo claro ($3,776 \pm 0,075 \text{ kg.g}^{-1}$; $1,115 \pm 0,047 \text{ kg.g}^{-1}$; $F=95,49$; $p<0,001$). Considerando que o ciclo escuro foi composto por 4 horas a mais em relação ao ciclo claro, observou-se que a média da AFE durante o ciclo escuro e claro foi de $0,270 \pm 0,075 \text{ kg.g}^{-1}$ e $0,111 \pm 0,047 \text{ kg.g}^{-1}$ respectivamente, apresentando uma diferença de 41,11%. O pico da AFE ocorreu às 19:00 horas ($0,1561 \text{ kg.g}^{-1}$), enquanto o menor valor foi observado às 13:00 horas ($0,0239 \text{ kg.g}^{-1}$), como demonstrado na Figura 9. Vale ressaltar ainda que, como apresentado na Figura 10, não houve diferença significativa na AFE entre os dias analisados, tanto para o ciclo escuro quanto para o ciclo claro ($F=1,93$; $p>0,05$).

Figura 9 – Os valores apresentados abaixo são referentes à somatória da atividade física espontânea (AFE) mensurada no 52º dia de idade dos animais do experimento II, durante um período de 24 horas.



Círculo azul: menor valor de AFE e círculo vermelho: maior valor de AFE; kg: quilograma; g: grama; h: hora(s). Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 – Valores referentes à somatória da atividade física espontânea (AFE) mensurada por três dias não consecutivos, a partir do 52º dia de idade dos animais do experimento II, durante um período de 24 horas.



kg: quilograma; g: grama; h: hora(s). Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.7.2 Tempo Total de Nado Prescrito Versus Tempo Total de Nado Executado

Não houve diferença significativa entre o tempo total de nado prescrito e o tempo total de nado executado ($30,00 \pm 0,00$, $29,56 \pm 2,46$ min; 98,53%; $p=0,17$). Também não foi observada diferença significativa quando comparado o tempo total de nado executado entre os animais que receberam melatonina e os que receberam solução veículo ($29,57 \pm 1,96$; $29,54 \pm 2,89$; $p=0,96$).

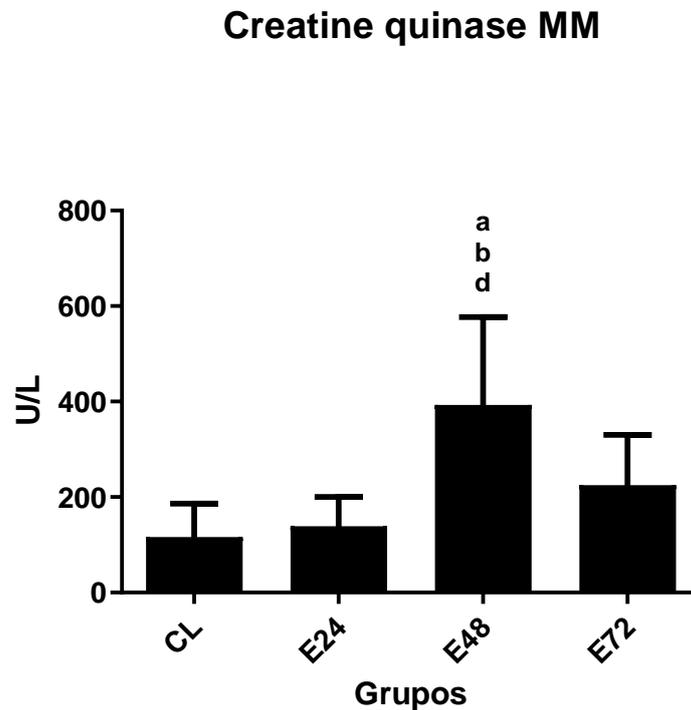
4.2.7.3 Efetividade do Protocolo Indutivo de Dano (PID)

Afim de verificar a efetividade do PID em promover dano muscular esquelético, foi utilizado teste ANOVA One-way para os dados dos grupos CL, E24, E48 e E72 para as variáveis de CK-MM, LDH e PAX7. Foi utilizado também o teste post hoc de Newman-Keuls para todas as variáveis citadas acima.

4.2.7.3.1 Creatina Quinase MM (CK-MM)

Os dados dos grupos CL, E24, E48 e E72 demonstraram efeito significativo nas concentrações séricas de CK-MM ($F=6,07$; $p<0,01$), bem como aumento significativo nos animais do grupo E48 em comparação aos animais do grupo controle, E24 e E72, como apresentado na Figura 11.

Figura 11 – Concentração sérica de creatina quinase MM (CK-MM). Os valores estão expressos em média e desvio padrão (U/L).



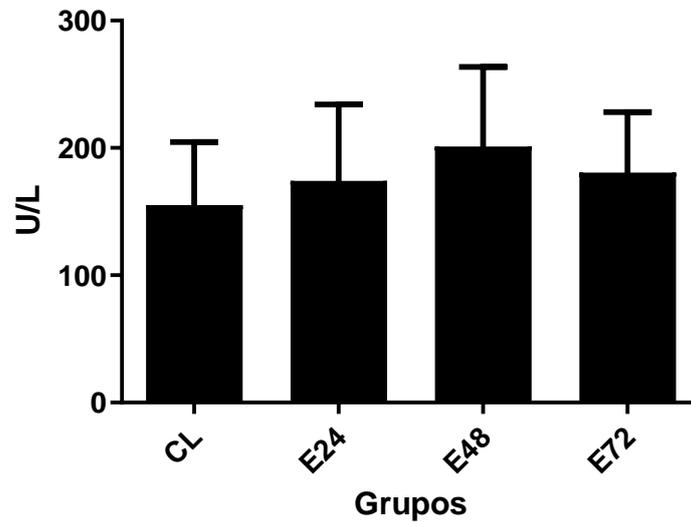
Dados relacionados a concentração sérica (U/L) de creatina quinase MM. Valores expressos em média e desvio padrão. ^a $p < 0,05$ em relação ao CL, ^b $p < 0,05$ em relação ao E24, ^d $p < 0,05$ em relação ao E72. CL: Controle, E24: Exercitado e eutanasiado 24 horas após exercício, E48: Exercitado e eutanasiado 48 horas após exercício, E72: Exercitado e eutanasiado 72 horas após exercício; U/L: Unidade por litro. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.7.3.2 Lactato Desidrogenase (LDH)

Os dados dos grupos CL, E24, E48 e E72, não demonstraram efeito significativo nas concentrações séricas de LDH ($F=0,59$; $p > 0,05$), bem como diferença significativa entre os grupos, como apresentado na Figura 12.

Figura 12 – Concentração sérica de lactato desidrogenase (LDH). Os valores estão expressos em média e desvio padrão (U/L).

Lactato desidrogenase (LDH)

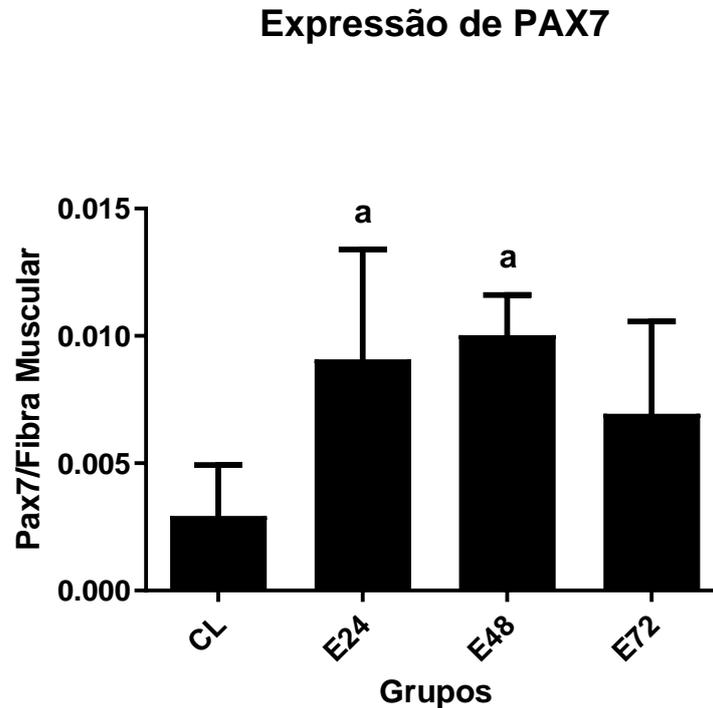


Dados relacionados a concentração sérica (U/L) de lactato desidrogenase. Valores expressos em média e desvio padrão. CL: Controle E24: Exercitado e eutanasiado 24 horas após exercício, E48: Exercitado e eutanasiado 48 horas após exercício, E72: Exercitado e eutanasiado 72 horas após exercício; U/L: Unidade por litro. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.7.3.3 Expressão de PAX7 em Células Satélites

Os dados dos grupos CL, E24, E48 e E72 apresentam efeito significativo na expressão de PAX7 ($F=4,32$; $p=0,02$), tal como aumento significativo na expressão dessa proteína, nos animais do grupo E24 e E48 em comparação ao grupo controle, como demonstrado na Figura 13.

Figura 13 – Expressão de PAX7. Os valores estão expressos em média e desvio padrão.



Dados relacionados a expressão de PAX7. Valores expressos em média e desvio padrão. ^a $p < 0,05$ em relação ao CL. CL: Controle, E24: Exercitado e eutanasiado 24 horas após exercício, E48: Exercitado e eutanasiado 48 horas após exercício, E72: Exercitado e eutanasiado 72 horas após exercício. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.7.4 Efeito da Melatonina e do Tempo

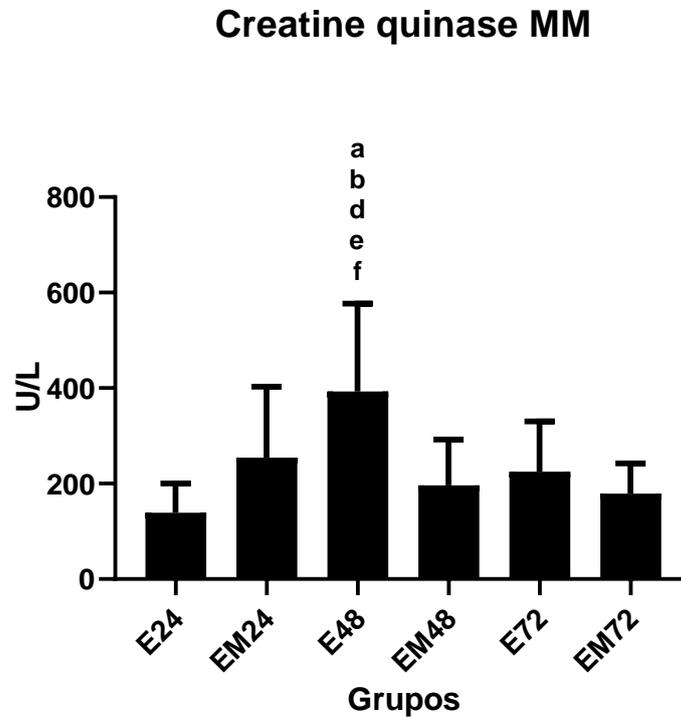
Afim de analisar os efeitos do tempo (24, 48 ou 72 horas) e da melatonina (solução veículo ou melatonina), tal como a interação entre os efeitos principais, nas variáveis de CK-MM, LDH e expressão de PAX7 foi utilizado ANOVA Fatorial de duas vias. Foi empregado também o teste post hoc de Newman-Keuls quando necessário.

4.2.7.4.1 Creatina Quinase MM (CK-MM)

Houve interação entre os efeitos principais nas concentrações de CK-MM, demonstrando que a resposta na atividade dessa enzima em função do tempo foi dependente da melatonina ($F=6,73$; $p=0,003$). Essa interação foi induzida pelo E48, o qual demonstrou ser responsável também pelo efeito do tempo encontrado ($F=3,27$; $p < 0,05$). Não houve efeito da melatonina nas concentrações séricas de CK-MM ($F=1,54$; $p > 0,05$). Além disso, foi demonstrado um aumento significativo às 48 horas, nos animais que receberam solução veículo. Contudo, esse aumento não ocorreu nos ratos que receberam melatonina, ou seja, a atividade de CK-MM, 48 horas após exercício, foi significativamente maior nos animais que receberam

solução veículo quando comparada aos que receberam melatonina ($p=0,010$), como demonstrado na Figura 14.

Figura 14 – Concentração sérica de creatina quinase MM (CK-MM). Os valores estão expressos em média e desvio padrão (U/L).

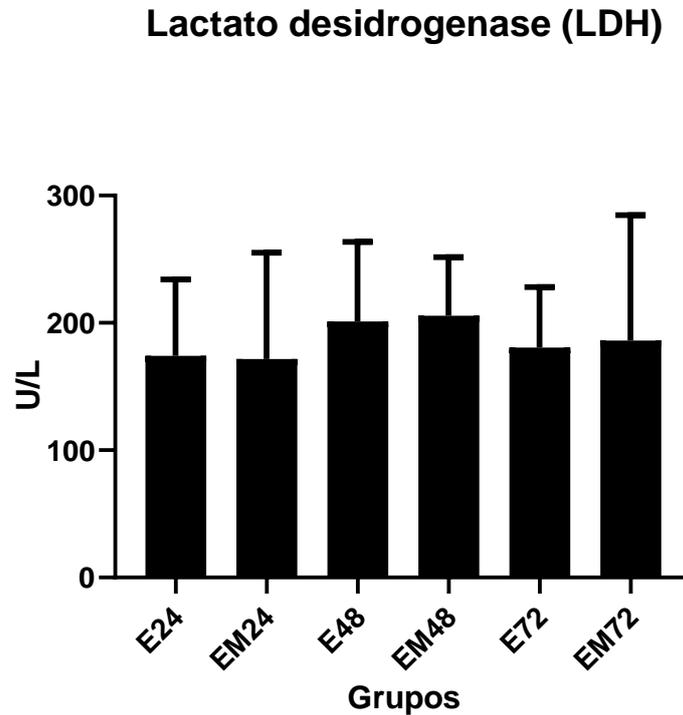


Dados relacionados a concentração sérica (U/L) de creatina quinase MM. Valores expressos em média e desvio padrão. ^a $p<0,05$ em relação ao E24, ^b $p<0,05$ em relação ao EM24, ^d $p<0,05$ em relação ao EM48, ^e $p<0,05$ em relação ao E72 e ^f $p<0,05$ em relação ao EM72. E24: Exercitado e eutanasiado 24 horas após exercício, E48: Exercitado e eutanasiado 48 horas após exercício, E72: Exercitado e eutanasiado 72 horas após exercício, EM24: Exercício, Melatonina e eutanasiados 24 horas após exercício, EM48: Exercício, Melatonina e eutanasiados 48 horas após exercício, EM72: Exercício, Melatonina e eutanasiados 72 horas após exercício; U/L: Unidade por litro. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.7.4.2 Lactato Desidrogenase (LDH)

Através das análises buscando verificar o efeito do tempo ($F=0,59$; $p>0,05$) e da melatonina ($F=0,01$; $p>0,05$) nas concentrações séricas de LDH, não foi encontrado nenhum dos efeitos principais, bem como interação entre eles ($F=0,01$; $p>0,05$). Também não foi identificado diferença significativa entre os grupos, como apresentado na Figura 15.

Figura 15 – Concentração sérica de lactato desidrogenase (LDH). Os valores estão expressos em média e desvio padrão (U/L).

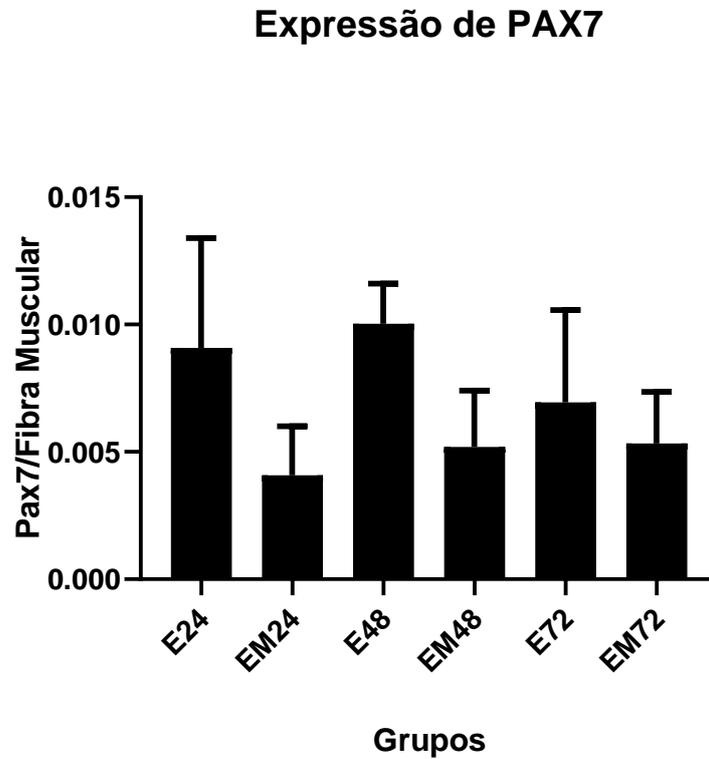


Dados relacionados a concentração sérica (U/L) de lactato desidrogenase. Valores expressos em média e desvio padrão. E24: Exercitado e eutanasiado 24 horas após exercício, E48: Exercitado e eutanasiado 48 horas após exercício, E72: Exercitado e eutanasiado 72 horas após exercício, EM24: Exercício, Melatonina e eutanasiados 24 horas após exercício, EM48: Exercício, Melatonina e eutanasiados 48 horas após exercício, EM72: Exercício, Melatonina e eutanasiados 72 horas após exercício; U/L: Unidade por litro. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.7.4.3 Expressão de PAX7 em Células Satélites

A melatonina reduziu a expressão de PAX7 ($F=13,90$; $p=0,001$), porém, sem efeito do tempo ($F=0,73$; $p>0,05$), bem como interação entre os efeitos principais ($F=1,15$; $p>0,05$), em comparação aos animais que receberam solução veículo, como apresentado na Figura 16. Há também uma tendência de aumento na expressão de PAX7 48 horas após exercício, assim como as concentrações séricas de CK.

Figura 16 – Expressão de PAX7. Os valores estão expressos em média e desvio padrão.



Dados relacionados a expressão de PAX7. Valores expressos em média e desvio padrão. E24: Exercitado e eutanasiado 24 horas após exercício, E48: Exercitado e eutanasiado 48 horas após exercício, E72: Exercitado e eutanasiado 72 horas após exercício, EM24: Exercício, Melatonina e eutanasiados 24 horas após exercício, EM48: Exercício, Melatonina e eutanasiados 48 horas após exercício, EM72: Exercício, Melatonina e eutanasiados 72 horas após exercício. Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi a diminuição na expressão de PAX7 nos animais que receberam melatonina em comparação aos animais que receberam solução veículo após a realização do protocolo de indução ao dano muscular esquelético (PID), demonstrando um efeito da melatonina em atenuar o dano muscular.

São escassos os estudos na literatura que avaliam a expressão de PAX7 em músculo esquelético após aplicação de melatonina. No melhor de nossa busca, foi encontrado somente um estudo para tal comparação, porém, com significativas diferenças quando se comparam os desenhos metodológicos. No estudo realizado por Stratos et al., (2012), foi demonstrado aumento na expressão de PAX7 1 dia após lesão, no grupo que recebeu tratamento com melatonina em comparação ao grupo que recebeu tratamento com solução veículo. Entretanto, esse aumento na expressão de PAX7 não ocorreu nos animais eutanasiados aos 4, 7 e 14 dias após lesão. Cabe ressaltar que esse estudo analisou o músculo sóleo, enquanto que em nosso estudo o gastrocnêmio porção branca foi o músculo avaliado. Além disso, o tipo de lesão aplicada nesse estudo citado foi por esmagamento, enquanto em nosso trabalho o dano muscular esquelético foi induzido por exercício físico e finalmente, a quantidade de melatonina aplicada também difere entre os dois estudos, uma vez que, Stratos et al., (2012) utilizou tratamento crônico enquanto que, em nosso estudo foi utilizado uma única aplicação de melatonina.

A melatonina aplicada via intraperitoneal, possui rápida biodisponibilidade, demonstrada por um estudo realizado por Yeleswaram et al., (1997), em que a aplicação de 10 mg/kg dessa indolamina atingiu uma biodisponibilidade de 74%. Após aplicação, a melatonina segue para a corrente sanguínea, chegando até o músculo esquelético. Alguns dados indicam que no músculo esquelético, a melatonina se acumula na mitocôndria (STACCHIOTTI, FAVERO e RODELLA, 2020), exercendo seus efeitos na forma, tamanho e função mitocondrial (FAVERO et al., 2017; FAVERO et al., 2019), através da sua ligação aos receptores do tipo MT1 (MEHANNA et al., 2017). Ainda no músculo esquelético, a melatonina pode exercer suas ações anti-apoptóticas (STRATOS et al., 2012), anti-inflamatórias e antioxidantes (GALANO, 2011; REITER, TAN e GALANO, 2014; HARDELAND, 2005; CHUANG et al., 1996; HARDELAND, 2018). De fato, essas ações da melatonina, poderiam prevenir uma exacerbação do dano muscular, como demonstrado por Ostjen et al., (2019), o qual evidenciou uma redução na atividade de SOD, TBARS e glutathiona, além de diminuição na expressão de TNF α e NF- κ B e nos danos teciduais, avaliado por técnica de HE.

Através dos dados de CK-MM analisados em nosso estudo, vimos que a melatonina foi capaz de inibir o pico nas concentrações séricas dessa enzima encontrado no grupo E48. Esse achado corrobora com o estudo realizado por Hibaoui et al., (2011), o qual demonstrou diminuição nas concentrações de CK, em camundongos MDX, 24 horas após tratamento com melatonina. O autor sugere uma melhora na integridade da membrana plasmática, por meio da redução de peroxidação lipídica, ocasionado por essa indolamina, fenômenos que possivelmente ocorreram em nossa amostra.

O PID comprovou ser um protocolo de indução ao dano muscular executável ao não demonstrar diferença significativa entre os tempos de nado prescrito e tempo de nado executável, isso ocorreu graças ao controle rigoroso da intensidade do exercício realizado por meio do TI. O objetivo desse protocolo foi gerar dano muscular através do exercício físico, sendo esse tipo de lesão a mais próxima da realidade em comparação as demais encontradas na literatura. Além disso, o PID mostrou ser efetivo visto o aumento nas concentrações séricas de CK-MM nos animais do grupo E48 em comparação aos grupos CL, E24 e E72, corroborando com estudos encontrados na literatura, onde demonstram pico na atividade dessa enzima entre 24 e 96 horas após sessão inicial de exercício (KOCH, PEREIRA e MACHADO, 2014; TOTSUKA et al., 2002). Também encontramos aumento na expressão de PAX7 nos animais dos grupos E24 e E48 em comparação aos grupos CL e E72, semelhante ao resultado encontrado por Jacobs et al., (1995), o qual evidencia um aumento mais consistente na quantidade total de célula satélite no músculo sóleo de ratos, dois e sete dias após exercício em esteira. O autor relaciona esse aumento à liberação e extravasamento de fatores mitogênicos liberados através de pequenas interrupções na membrana ocasionadas pelo exercício físico. Segundo o autor esses fatores são responsáveis pela ativação das células satélite.

De fato, o dano à membrana celular causa extravasamento ao meio extracelular de proteínas citosólicas como CK-MM e LDH (WARREN, LOWE e ARMSTRONG, 1999), além de influxo desregulado de Ca^{2+} (ARMSTRONG, 1984). Esse aumento citosólico nas concentrações de Ca^{2+} , ativa nNOS (BREDT e SNYDER, 1990), estimulando a produção de NO, responsável por ativar as MMPs (YAMADA et al., 2008). Uma vez ativadas, as MMPs causam liberação de fatores de crescimento, os quais ativam as células satélites (TIDBALL, 2011; CORNELISON e WOLD, 1997), expressando PAX7 (ZAMMIT et al., 2004). A melatonina atuaria reduzindo a inflamação e o estresse oxidativo (GALANO, 2011; REITER, TAN e GALANO, 2014; HARDELAND, 2005; CHUANG et al., 1996; HARDELAND, 2018), o que conseqüentemente diminuiria o dano a membrana celular e o extravasamento de CK-MM

(HIBAOUÏ et al., 2011). Essa redução no dano muscular diminuiria a liberação de alguns fatores de crescimento os quais ativam as células satélites (CORNELISON e WOLD, 1997; TIDBALL, 2011). Sendo, PAX7 expressa em células satélites nos estágios de quiescência, ativação e proliferação celular, todos essenciais no processo de reparo muscular após lesão, essa diminuição na liberação dos fatores de crescimento reduziria a quantidade de células satélites ativadas, e conseqüentemente a expressão de PAX7, o que explicaria nossos resultados.

Nossos resultados de LDH não demonstram diferença significativa entre nenhum dos grupos. Achados semelhantes foram encontrados em um estudo realizado por Fridén, Sfakianos e Hargens, (1989), em humanos, onde houve aumento nas concentrações séricas de CK, porém, sem aumento nas concentrações de LDH, 48 horas após diferentes protocolos de exercício. O autor justifica essa diferença nas concentrações das duas enzimas, ao tempo para o pico de LDH (8 a 16 horas pós-exercício). Já Overgaard et al., (2004) identificou pico na atividade dessa enzima, em homens, imediatamente após corrida de 20 km, enquanto da Silva et al., (2020) identificaram o pico imediatamente após uma partida de rúgbi, retornando a concentrações basais em um período menor que 24 horas após sessão de exercício. A explicação para nossos resultados de LDH poderia ser o tempo em que foram coletadas as amostras sanguíneas dos animais, interferindo diretamente nos valores obtidos.

Vale ressaltar ainda que, através das análises gravimétricas foi comprovado a robustez nas condições ambientais, demonstrado através da ausência de diferença significativa na AFE dos animais, nos três dias analisados.

Considerando todos os nossos resultados, foi observado um efeito da melatonina em reduzir o dano muscular esquelético, para esse tipo de exercício. Contudo, seria interessante avaliarmos futuramente os efeitos de um tratamento crônico com essa indolamina, em outros fatores de transcrição presentes em fases mais avançadas do processo de reparo, afim de, aprofundarmos os conhecimentos sobre a influência da melatonina no processo de reparo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos em nosso estudo, podemos concluir que:

O PID foi efetivo em causar dano muscular, comprovado pelas concentrações elevadas de CK-MM no grupo E48 em comparação ao grupo CL, o que comprovaria dano à membrana celular provocando o extravasamento dessa enzima citosólica. Além disso, houve aumento na expressão de PAX7 no grupo E24 e E48 em comparação ao grupo CL, provavelmente decorrente do aumento nas concentrações de Ca^{2+} intracelular, o que causaria a liberação de fatores de crescimento (FGF e HGF) responsáveis pela ativação das células satélites, aumentando a expressão de PAX7.

O dano foi mais pronunciado nos animais exercitados que receberam solução veículo e foram eutanasiados 48 horas após o exercício, comprovado pelo aumento na concentração de CK-MM neste grupo. Contudo, os animais que passaram pelo mesmo procedimento, porém foram eutanasiados 72 horas após, não evidenciaram diferença significativa na concentração dessa enzima, demonstrando que, para esse tipo de exercício, em um intervalo de 72 horas, os animais já estariam aptos a uma nova sessão de treino.

Os animais que receberam melatonina apresentaram redução nas concentrações de CK-MM, demonstrando uma possível diminuição no dano à membrana celular, o que poderia acarretar em menor influxo de cálcio para o citoplasma, causando menor liberação de alguns fatores de crescimento (FGF e HGF), diminuindo a ativação das células satélites e conseqüentemente reduzindo a expressão de PAX7. De fato, em nosso estudo esses mesmos animais demonstraram uma redução na expressão desse fator de transcrição, comprovando o efeito desse hormônio em reduzir o dano muscular esquelético.

Como aplicação prática, a melatonina foi efetiva em reduzir o dano muscular, diminuindo o tempo de intervalo necessário para a realização de uma nova sessão de exercício, com as mesmas características do protocolo utilizado em nosso estudo. Isso provavelmente otimizaria os ganhos obtidos no treinamento, uma vez que, uma quantidade maior de sessões de exercício poderia ser realizada durante um programa de treino, provavelmente melhorando a performance. Assim, futuros estudos poderiam explorar os efeitos da melatonina no processo de reparo muscular ao longo de um período de treinamento físico de diferentes características, analisando os demais fatores de transcrição envolvidos nos estágios de proliferação e diferenciação celular, além de parâmetros de performance física afim de identificar os efeitos

diretos dessa indolamina na recuperação muscular após exercício e suas relações com a performance.

REFERÊNCIAS

- Amaral, F. G. D., & Cipolla-Neto, J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Archives of endocrinology and metabolism*, v. 62, n. 4, p. 472-479., 2018.
- Armstrong, R. B. Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. *Medicine and science in sports and exercise*, v. 16, n. 6, p. 529-538, 1984.
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., Van Rooijen, N., Plonquet, A., ... & Chazaud, B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, v. 204, n. 5, p. 1057-1069, 2007.
- 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 Physiologica Hungarica*, v. 100, n. 4, p. 427-434, 2013.
- Beck, W. F., De Araujo, G. G., PP, M. S., Masselli dos Reis, I. G., & Gobatto, C. A. Time to exhaustion at anaerobic threshold in swimming rats: metabolic investigation. *Bratislavské lekárske listy*, v. 115, n. 10, p. 617-621, 2014.
- Beck, W. R., Botezelli, 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. *Scientific reports*, v. 5, p. 18065, 2015A.
- Beck, W. R., Campesan, Y. S., & Gobatto, C. A. Validity and reliability of incremental test to determine the anaerobic threshold in swimming rats. *International Journal of Applied Exercise Physiology*, v. 4, n. 1, p. 25-33, 2015B.
- Beck, W. R., Scariot, P. P. M., & Gobatto, C. A. Melatonin is an ergogenic aid for exhaustive aerobic exercise only during the wakefulness period. *International journal of sports medicine*, v. 37, n. 1, p. 71-76, 2016.
- Beckerandre, M., Andre, E., & DeLamarter, J. F. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 194, n. 3, p. 1371-1379, 1993.
- Brasileiro, J. L., Fagundes, D. J., Miiji, L. O. N., Oshima, C. T. F., Teruya, R., Marks, G., ... & Santos, M. A. Isquemia e reperfusão de músculo sóleo de ratos sob ação da pentoxifilina. *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 6, p. 50-63, 2007.
- Bredt, D. S., & Snyder, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, n. 2, p. 682-685, 1990.
- Carlberg, C., Hooft van Huijsduijnen, R., Staple, J. K., DeLamarter, J. F., & Becker-André, M. RZR, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Molecular Endocrinology*, v. 8, n. 6, p. 757-770, 1994.
- Cavaillon, J. M., Fitting, C., & Haeffner-Cavaillon, N. Recombinant C5a enhances interleukin 1 and tumor necrosis factor release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes and macrophages. *European journal of immunology*, v. 20, n. 2, p. 253-257, 1990.
- Cecon, E., Oishi, A., & Jockers, R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. *British journal of pharmacology*, v. 175, n. 16, p. 3263-3280, 2018.

- Chang, N. C., & Rudnicki, M. A. Satellite cells: the architects of skeletal muscle. *Current topics in developmental biology*, v. 107, p. 161-181, 2014.
- Chargé, S. B., & Rudnicki, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews*, v. 84, n. 1, p. 209-238, 2004.
- Chuang, J. I., Mohan, N., Meltz, M. L., & Reiter, R. J. Effect of melatonin on NF- κ B DNA-binding activity in the rat spleen. *Cell biology international*, v. 20, n. 10, p. 687-692, 1996.
- Claustrat, B., & Leston, J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*, v. 61, n. 2-3, p. 77-84, 2015.
- Collins, C. A., Olsen, I., Zammit, P. S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T. A., & Morgan, J. E. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*, v. 122, n. 2, p. 289-301, 2005.
- Cornelison, D. D. W., & Wold, B. J. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Developmental biology*, v. 191, n. 2, p. 270-283, 1997.
- Damas, F., Nosaka, K., Libardi, C. A., Chen, T. C., & Ugrinowitsch, C. Susceptibility to exercise-induced muscle damage: a cluster analysis with a large sample. *International journal of sports medicine*, v. 37, n. 8, p. 633-640, 2016.
- da Silva, B. V. C., Simim, M. A. D. M., da Silva, R. B., Mendes, E. L., Ide, B. N., Marocolo, M., ... & Mota, G. R. Time course of recovery for performance attributes and circulating markers of muscle damage following a rugby union match in amateur athletes. *Sports*, v. 8, n. 5, p. 64, 2020.
- Dimario, J. X., Buffinger, N., Yamada, S., & Strohman, R. C. Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science*, v. 244, n. 4905, p. 688-690, 1989.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M. R., & Reppert, S. M. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 91, n. 13, p. 6133-6137, 1994.
- Emet, M., Ozcan, H., Yayla, M., Halici, Z., & Hacimuftuoglu, A. A review of melatonin, its receptors and drugs. *The Eurasian journal of medicine*, v. 48, n. 2, p.135, 2016.
- Favero, G., Trapletti, V., Bonomini, F., Stacchiotti, A., Lavazza, A., Rodella, L. F., & Rezzani, R. Oral supplementation of melatonin protects against fibromyalgia-related skeletal muscle alterations in reserpine-induced myalgia rats. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 7, p. 1389, 2017.
- Favero, G., Bonomini, F., Franco, C., & Rezzani, R. Mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of a fibromyalgia model: the potential benefits of melatonin. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 3, p. 765, 2019.
- Fowler, C. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs impair tissue healing?. *Journal of the American Academy of PAs*, v. 31, n. 8, p. 1-5, 2018.

- Friden, J., Sjöström, M., & Ekblom, B. Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *International journal of sports medicine*, v. 4, n. 3, p. 170-176, 1983.
- Friden, J., Sfakianos, P. N., & Hargens, A. R. Blood indices of muscle injury associated with eccentric muscle contractions. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 7, n. 1, p. 142-145, 1989.
- Fridén, J., & Lieber, R. L. Serum creatine kinase level is a poor predictor of muscle function after injury. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports: Short communication*, v. 11, n. 2, p. 126-127, 2001.
- Frontera, W. R., & Ochala, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international*, v. 96, n. 3, p. 183-195, 2015.
- Funk, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *science*, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, 2001.
- Galano, A. On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 13, n. 15, p. 7178-7188, 2011.
- Gobatto, C. A., De Mello, M. A. R., Sibuya, C. Y., De Azevedo, J. R. M., Dos Santos, L. A., & Kokubun, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 130, n. 1, p. 21-27, 2001.
- Hardeland, R. Antioxidative protection by melatonin. *Endocrine*, v. 27, n. 2, p. 119-130, 2005.
- Hardeland, R. Melatonin and inflammation—Story of a double-edged blade. *Journal of pineal research*, v. 65, n. 4, p. e12525, 2018.
- Hibaoui, Y., Reutenauer-Patte, J., Patthey-Vuadens, O., Ruegg, U. T., & Dorchies, O. M. Melatonin improves muscle function of the dystrophic mdx5Cv mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of pineal research*, v. 51, n. 2, p. 163-171, 2011.
- Hirose, T., Smith, R.J., & Jetten, A.M. ROR- γ : the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 205, n. 3, p. 1976-1983, 1994.
- Hyldahl, R. D., & Hubal, M. J. Lengthening our perspective: morphological, cellular, and molecular responses to eccentric exercise. *Muscle & nerve*, v. 49, n. 2, p. 155-170, 2014.
- Jacobs, S. C. J. M., Wokke, J. H. J., Bär, P. R., & Bootsma, A. L. Satellite cell activation after muscle damage in young and adult rats. *The Anatomical Record*, v. 242, n. 3, p. 329-336, 1995.
- Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J. A., & Delagrèze, P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new?. *British journal of pharmacology*, v. 154, n. 6, p. 1182-1195, 2008.
- Kajita, T., & Hugli, T. E. C5a-induced neutrophilia. A primary humoral mechanism for recruitment of neutrophils. *The American journal of pathology*, v. 137, n. 2, p. 467, 1990.
- Kherif, S., Lafuma, C., Dehaupas, M., Lachkar, S., Fournier, J. G., Verdière-Sahuqué, M., ... & Alameddine, H. S. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Developmental biology*, v. 205, n. 1, p. 158-170, 1999.
- Koch, A. J., Pereira, R., & Machado, M. The creatine kinase response to resistance exercise. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, v. 14, n. 1, p. 68-77, 2014.

- Kuang, S., Chargé, S. B., Seale, P., Huh, M., & Rudnicki, M. A. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *Journal of Cell Biology*, v. 172, n. 1, p. 103-113, 2006.
- Lardone, P. J., Guerrero, J. M., Fernández-Santos, J. M., Rubio, A., Martín-Lacave, I., & Carrillo-Vico, A. Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *Journal of pineal research*, v. 51, n. 4, p. 454-462, 2011.
- Leeder, J. D., van Someren, K. A., Gaze, D., Jewell, A., Deshmukh, N. I., Shah, I., ... & Howatson, G. Recovery and adaptation from repeated intermittent-sprint exercise. *International journal of sports physiology and performance*, v. 9, n. 3, p. 489-496, 2014.
- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., & Mori, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. *Journal of the American Chemical Society*, v. 80, n. 10, p. 2587-2587, 1958.
- Liang, R., Nickkholgh, A., Hoffmann, K., Kern, M., Schneider, H., Sobirey, M., ... & Schemmer, P. Melatonin protects from hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and modification of cell proliferation. *Journal of pineal research*, v. 46, n. 1, p. 8-14, 2009.
- Mackey, A. L., Rasmussen, L. K., Kadi, F., Schjerling, P., Helmark, I. C., Ponsot, E., ... & Kjaer, M. Activation of satellite cells and the regeneration of human skeletal muscle are expedited by ingestion of nonsteroidal anti-inflammatory medication. *The FASEB Journal*, v. 30, n. 6, p. 2266-2281, 2016.
- Mackey, A. L., & Kjaer, M. The breaking and making of healthy adult human skeletal muscle in vivo. *Skeletal muscle*, v. 7, n. 1, p. 1-18, 2017.
- Malm, C. J. A. P. S. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction?. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 171, n. 3, p. 233-239, 2001.
- Manchado, F. D. B., Gobatto, C. A., Voltarelli, F. A., & Rostom de Mello, M. A. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*, v. 31, n. 6, p. 731-736, 2006.
- Markert, C. D., Merrick, M. A., Kirby, T. E., & Devor, S. T. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, v. 86, n. 7, p. 1304-1310, 2005.
- Masana, M. I., & Dubocovich, M. L. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Science's STKE*, n.107, pe39-pe39, 2001.
- Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of Cell Biology*, v. 9, n. 2, p. 493-495, 1961.
- McArdle, W. D., Katch, F. I., & Katch, V. L. Exercise physiology: energy, nutrition, and human performance, 2015.
- McKinnell, I. W., Ishibashi, J., Le Grand, F., Punch, V. G., Addicks, G. C., Greenblatt, J. F., ... & Rudnicki, M. A. Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex. *Nature cell biology*, v. 10, n. 1, p. 77-84, 2008.
- Mehanna, R. A., Soliman, G. Y., Hassaan, P. S., Sharara, G. M., & Abdel-Moneim, R. A. Protective role of melatonin on skeletal muscle injury in rats. *Int. J. Clin. Exp. Med*, v. 10, n. 1, p. 1490-1501, 2017.

- Molinari, E. J., North, P. C., & Dubocovich, M. L. 2-[125I] iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *European journal of pharmacology*, v. 301, n. 1-3, p. 159-168, 1996.
- Naldini, L., Weidner, K. M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., ... & Michalopoulos, G. K. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *The EMBO journal*, v. 10, n. 10, p. 2867-2878, 1991.
- National Society for Histotechnology (U.S.). Guidelines for hematoxylin and eosin staining, <http://bit.ly/SQWR0>, 2001.
- Oishi, A., Cecon, E., & Jockers, R. Melatonin receptor signaling: impact of receptor oligomerization on receptor function. *International review of cell and molecular biology*, v. 338, p. 59-77, 2018.
- Ostjen, C. A., Rosa, C. G. S., Hartmann, R. M., Schemitt, E. G., Colares, J. R., & Marroni, N. P. Anti-inflammatory and antioxidant effect of melatonin on recovery from muscular trauma induced in rats. *Experimental and molecular pathology*, v. 106, p. 52-59, 2019.
- Overgaard, K., Fredsted, A., Hyldal, A., Ingemann-Hansen, T., Gissel, H., & Clausen, T. Effects of running distance and training on Ca²⁺ content and damage in human muscle. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 36, n. 5, p. 821-829, 2004.
- Owens, D. J., Twist, C., Cogley, J. N., Howatson, G., & Close, G. L. Exercise-induced muscle damage: What is it, what causes it and what are the nutritional solutions?. *European journal of sport science*, v. 19, n. 1, p. 71-85, 2019.
- Paulsen, G., Ramer Mikkelsen, U., Raastad, T., & Peake, J. M. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise?. *Exercise immunology review*, v. 18, 2012.
- Peplow, P. V., Chung, T. Y., & Baxter, G. D. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 28, n. S1, p. S-3, 2010.
- Petit, L., Lacroix, I., de Coppet, P., Strosberg, A. D., & Jockers, R. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochemical pharmacology*, v. 58, n. 4, p. 633-639, 1999.
- Proske, U., & Morgan, D. L. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *The Journal of physiology*, v. 537, n. 2, p. 333-345, 2001.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., & Galano, A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology*, v. 29, n. 5, p. 325-333, 2014.
- Reppert, S. M., Tsai, T., Roca, A. L., & Saumant, I. Cloning of a structural and functional homolog of the circadian clock gene period from the giant silkworm *Antheraea pernyi*. *Neuron*, v. 13, n. 5, p. 1167-1176, 1994.
- Reppert, S. M., Godson, C., Mahle, C. D., Weaver, D. R., Slaugenhaupt, S. A., & Gusella, J. F. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 92, n. 19, p. 8734-8738, 1995.

- Schultz, E., Gibson, M. C., & Champion, T. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *Journal of Experimental Zoology*, v. 206, n. 3, p. 451-456, 1978.
- Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., & Rudnicki, M. A. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, v. 102, n. 6, p. 777-786, 2000.
- Soleimani, V. D., Punch, V. G., Kawabe, Y. I., Jones, A. E., Palidwor, G. A., Porter, C. J., ... & Rudnicki, M. A. Transcriptional dominance of Pax7 in adult myogenesis is due to high-affinity recognition of homeodomain motifs. *Developmental cell*, v. 22, n. 6, p. 1208-1220, 2012.
- Stacchiotti, A., Favero, G., & Rodella, L. F. Impact of melatonin on skeletal muscle and exercise. *Cells*, v. 9, n. 2, p. 288, 2020.
- Stratos, I., Richter, N., Rotter, R., Li, Z., Zechner, D., Mittlmeier, T., & Vollmar, B. Melatonin restores muscle regeneration and enhances muscle function after crush injury in rats. *Journal of pineal research*, v. 52, n. 1, p. 62-70, 2012.
- Tee, J. C., Bosch, A. N., & Lambert, M. I. Metabolic consequences of exercise-induced muscle damage. *Sports medicine*, v. 37, n. 10, p. 827-836, 2007.
- Tidball, J. G., & Villalta, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 298, n. 5, p. R1173-R1187, 2010.
- Tidball, J. G. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Comprehensive Physiology*, v. 1, n. 4, p. 2029-2062, 2011.
- Vierck, J., O'Reilly, B., Hossner, K., Antonio, J., Byrne, K., Bucci, L., & Dodson, M. Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. *Cell biology international*, v. 24, n. 5, p.263-272, 2000.
- von Maltzahn, J., Jones, A. E., Parks, R. J., & Rudnicki, M. A. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 41, p. 16474-16479, 2013.
- Warren, G. L., Lowe, D. A., & Armstrong, R. B. Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports medicine*, v. 27, n. 1, p. 43-59, 1999.
- Wilkin, L. D., Merrick, M. A., Kirby, T. E., & Devor, S. T. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *International journal of sports medicine*, v. 25, n. 1, p. 73-77, 2004.
- Wolfe, R. R. The underappreciated role of muscle in health and disease. *The American journal of clinical nutrition*, v. 84, n. 3, p. 475-482, 2006.
- Yamada, M., Sankoda, Y., Tatsumi, R., Mizunoya, W., Ikeuchi, Y., Sunagawa, K., & Allen, R. E. Matrix metalloproteinase-2 mediates stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells in a nitric oxide-dependent manner. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 40, n. 10, p. 2183-2191, 2008.
- Yamane, A., Akutsu, S., Diekwisch, T. G., & Matsuda, R. Satellite cells and utrophin are not directly correlated with the degree of skeletal muscle damage in mdx mice. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 289, n. 1, p. C42-C48, 2005.

Yeleswaram, K., McLaughlin, L. G., Knipe, J. O., & Schabdach, D. 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.

Zammit, P. S., Golding, J. P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T. A., & Beauchamp, J. R. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?. *The Journal of cell biology*, v. 166, n. 3, p. 347-357, 2004.

Zammit, P. S., Relaix, F., Nagata, Y., Ruiz, A. P., Collins, C. A., Partridge, T. A., & Beauchamp, J. R. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of cell science*, v. 119, n. 9, p. 1824-1832, 2006.

ANEXO – Certificado CEUA



COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PROPOSTA À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CPF: 036.942.969-99

Título do projeto: EFEITO DA MELATONINA E DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NO REPARO MUSCULOESQUELÉTICO PÓS-DANO INDUZIDO POR EXERCÍCIO FÍSICO

Responsável: Wladimir Rafael Beck

Equipe:

Telefone: 19 981302203 e-mail: beckwr@ufscar.br

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos, avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema (<http://www.sistemaceua.ufscar.br/index.php>) por meio da sua senha de acesso.

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

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