

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

ALINSON EDUARDO CIPRIANO

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA NA RECUPERAÇÃO  
METABÓLICA APÓS EXERCÍCIO DE NATAÇÃO EM RATOS

São Carlos – SP  
2024

ALINSON EDUARDO CIPRIANO

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA NA RECUPERAÇÃO  
METABÓLICA APÓS EXERCÍCIO DE NATAÇÃO EM RATOS

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

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck

São Carlos – SP  
2024



**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 Alinson Eduardo Cipriano, realizada em 02/08/2024.

### **Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck (UFSCar)

Prof. Dr. Cleiton Augusto Libardi (UFSCar)

Prof. Dr. Leonardo Henrique Dalcheco Messias (USF)

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 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; 88887.667450/2022-00).

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha mãe, cuja presença e apoio foram fundamentais ao longo desta jornada. Por ser minha fonte inesgotável de amor, sabedoria e encorajamento, sempre acreditando em meu potencial e sacrificando tanto para que eu pudesse alcançar meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, cuja presença e orientação constante me proporcionaram força, sabedoria e resiliência ao longo desta jornada. Sem Sua bênção, este trabalho não teria sido possível.

Ao Professor Doutor Wladimir Rafael Beck, dirijo minha eterna gratidão. Agradeço-lhe profundamente pela oportunidade, dedicação e paciência em me orientar nos primeiros passos da minha trajetória acadêmica. Embora pudesse escrever páginas repletas de agradecimentos, nenhuma palavra seria suficiente para expressar a imensidão da minha gratidão, admiração e respeito. Registro aqui meus sinceros agradecimentos pela exemplar orientação, educação e amizade. Sua inestimável confiança e os valiosos ensinamentos sobre pesquisa científica e vida serão sempre lembrados e apreciados.

Ao Professor Cláudio Alexandre Gobatto, expresse minha profunda gratidão pela generosa disponibilização dos tanques necessários para a condução dos exercícios de natação com os ratos. À Professora Marisa Narciso Fernandes, expresse minha profunda gratidão pela generosa disponibilização de suas instalações, que permitiu a realização das análises de diversos procedimentos relacionados às amostras biológicas desta dissertação. Sua colaboração foi essencial para o progresso deste trabalho.

Ao Professor Leonardo Henrique Dalcheco Messias e à Professora Andréia de Melo Porcari, manifesto meu profundo agradecimento pela valiosa colaboração na análise metabolômica e pela coautoria na redação de dois artigos científicos. A parceria de ambos foi fundamental para o sucesso deste estudo e enriqueceu significativamente a qualidade e a profundidade das pesquisas realizadas.

Aos estimados docentes do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF), expresse minha mais profunda gratidão. A contribuição de cada um de vocês foi indispensável para a realização deste trabalho, e sem o vosso empenho e dedicação, nada disso seria possível.

Expresse minha profunda gratidão aos estimados colegas do LAFEEEx pela colaboração e parceria extraordinárias durante as coletas de dados dos experimentos desta dissertação. Cada interação foi enriquecedora, repleta de aprendizado e solidariedade. Os momentos compartilhados serão lembrados com carinho, pois sem a contribuição inestimável de cada um de vocês, a realização deste experimento não teria sido possível.

À minha querida mãe, à minha amada família, aos amigos leais e a todos que generosamente contribuíram para a realização deste feito. Expresso minha profunda gratidão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por seu valioso apoio e incentivo ao longo deste percurso (processo nº: 88887.667450/2022-00).

## RESUMO

A melatonina tem potencial para atuar no processo de recuperação após exercício físico, porém, não há estudos sobre os efeitos deste composto no metabolismo energético e sobre o dano tecidual após exercício isocarga. No exercício isocarga, os animais são submetidos à mesma carga de trabalho em todas as sessões de exercício, garantindo uma maior uniformidade nos estímulos físicos aplicados. Este estudo teve como objetivo avaliar como a administração de melatonina após o exercício isocarga impacta o metabolismo energético e os marcadores de dano tecidual. Sessenta animais Wistar foram submetidos a exercício de natação de 60 minutos a 90% de sua máxima capacidade aeróbia (iMCA), seguido de administração via intraperitoneal de melatonina (EM; 10 mg.kg<sup>-1</sup>) ou controle (Ex) de mesmo volume e componentes, exceto melatonina, e após isso, os animais foram eutanasiados 1, 3 ou 24 horas. Foi coletado sangue para análise da concentração de lactato desidrogenase, creatina quinase, glicose e triglicérides; tecido muscular esquelético (gastrocnêmio branco e vermelho, e glúteo máximo) e fígado para quantificação do conteúdo de glicogênio; (sóleo, gastrocnêmio branco e vermelho, e glúteo máximo) e fígado para quantificação do conteúdo de triglicérides; tecido muscular esquelético (glúteo máximo) e fígado para a quantificação do pool de aminoácidos e acilcarnitinas. Amostras de tecido foram extraídas e tiveram seus perfis de aminoácidos e acilcarnitinas determinados usando análise de injeção de fluxo (FIA) acoplada à espectrometria de massa direcionada (MS). Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão da média, submetidos ao teste de ANOVA Two-way e post hoc de Newman-Keuls foi empregado para analisar os efeitos da melatonina (dois níveis) e o efeito do tempo (três níveis). A análise do tamanho de efeito e o intervalo de confiança foram utilizados como testes complementares. Um nível de significância de 5% foi adotado para todas as análises, realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.; Tulsa, OK, Estados Unidos). Os resultados foram divididos em dois capítulos. No capítulo 1, os animais tratados com melatonina não apresentaram nenhum resultado significativo no pool de aminoácidos hepáticos, mas no músculo esquelético, a melatonina aumentou o pool de aminoácidos como arginina (F = 13,27; p = 0,001), ácido glutâmico (F = 5,92; p = 0,023), citrulina (F = 10,72; p = 0,003), glutamina (F = 8,15; p = 0,009), ornitina (F = 4,88; p = 0,037), prolina (F = 15,13; p = 0,001) e serina (F = 7,23; p = 0,013) em relação ao controle. A melatonina também aumentou o pool de glicina 3 horas pós exercício em comparação ao grupo controle (EM3>Ex3; p = 0,034) e reduziu o pool de metionina 24 horas pós exercício em comparação ao grupo controle (EM24<Ex24; p = 0,001). No capítulo 2, os animais tratados com melatonina não apresentaram resultados significativos para músculo esquelético e fígado referente à dinâmica do pool de acilcarnitinas. Entretanto nas concentrações séricas, a melatonina reduziu a concentração de lactato desidrogenase (F = 24,03; p = 0,000) e glicose (F = 11,01; p = 0,001), enquanto creatina quinase (F = 2,44; p = 0,124) e triglicérides (F = 1,08; p = 0,304) permaneceram inalterado. A melatonina também aumentou o conteúdo de glicogênio para gastrocnêmio vermelho (F = 82,81; p = 0,000), glúteo máximo (F = 19,55; p = 0,000), fígado (F = 6,24; p = 0,016), e reduzir para o gastrocnêmio branco (F = 4,28; p = 0,044). Quanto ao conteúdo de triglicérides teciduais, na presença de melatonina houve redução para o gastrocnêmio branco (F = 20,79; p = 0,000), gastrocnêmio vermelho (F = 8,76; p = 0,005) e glúteo máximo (F = 4,90; p = 0,032), enquanto aumentou o sóleo (F = 6,00; p = 0,019), sem efeito para o fígado (F = 3,44; p = 0,070). Sendo assim, o presente estudo demonstrou

que na presença de melatonina após exercício isocarga, houve aumento nos níveis de alguns aminoácidos em tecido muscular esquelético. Além disso, a melatonina modulou o metabolismo energético através da redução de glicose, dos níveis de triglicérides muscular e plasmático e acelerou a reposição do conteúdo de glicogênio muscular, como também, diminuiu o dano tecidual quando avaliado por meio da redução de lactato desidrogenase. Dessa maneira, favoreceu-se o ambiente celular para futuros esforços, ao menos do ponto de vista bioenergético.

**Palavras-chave:** Recuperação após Exercício, N-acetil-5-metoxitriptamina, Aminoácidos, Acilcarnitinas, Nutrição, Natação, Fisiologia do Exercício.

## ABSTRACT

Melatonin has the potential to act in the recovery process after physical exercise, however, there are no studies on the effects of this compound on energy metabolism and tissue damage after isoload exercise. In isoload exercise, animals are subjected to the same workload in all exercise sessions, ensuring greater uniformity in the physical stimuli applied. This study aimed to evaluate how melatonin administration after isoload exercise impacts energy metabolism and markers of tissue damage. Sixty Wistar animals were subjected to a 60 min swimming exercise at 90% of their maximum aerobic capacity (iMAC), followed by intraperitoneal administration of melatonin (EM; 10 mg.kg<sup>-1</sup>) or control (Ex) of the same volume and components, except melatonin, and after that, the animals were euthanized 1, 3 or 24 hours. Blood was collected to analyze the concentration of lactate dehydrogenase, creatine kinase, glucose and triglycerides; skeletal muscle tissue (white and red gastrocnemius, and gluteus maximus) and liver for quantification of glycogen content; (soleus, white and red gastrocnemius, and gluteus maximus) and liver for quantification of triglyceride content; skeletal muscle tissue (gluteus maximus) and liver for quantification of the pool of amino acids and acylcarnitines. Tissue samples were extracted and had their amino acid and acylcarnitine profiles determined using flow injection analysis (FIA) coupled to targeted mass spectrometry (MS). Data were presented as mean  $\pm$  standard deviation of the mean, submitted to the Two-way ANOVA test and Newman-Keuls post hoc was used to analyze the effects of melatonin (two levels) and the effect of time (three levels). Effect size analysis and confidence interval were used as complementary tests. A significance level of 5% was adopted for all analyses, performed using Statistics 7.0 software (StatSoft, Inc.; Tulsa, OK, United States). The results were divided into two chapters. In chapter 1, animals treated with melatonin did not show any significant results in the hepatic amino acid pool, but in skeletal muscle, melatonin increased the pool of amino acids such as arginine (F = 13.27; p = 0.001), glutamic acid (F = 5.92; p = 0.023), citrulline (F = 10.72; p = 0.003), glutamine (F = 8.15; p = 0.009), ornithine (F = 4.88; p = 0.037), proline (F = 15.13; p = 0.001) and serine (F = 7.23; p = 0.013) in relation to the control. Melatonin also increased the glycine pool 3 hours post exercise compared to the control group (EM3>Ex3; p = 0.034) and reduced the methionine pool 24 hours post exercise compared to the control group (EM24<Ex24; p = 0.001). In chapter 2, animals treated with melatonin did not show significant results for skeletal muscle and liver regarding the dynamics of the acylcarnitine pool. However, in serum concentrations, melatonin reduced the concentration of lactate dehydrogenase (F = 24.03; p = 0.000) and glucose (F = 11.01; p = 0.001), while creatine kinase (F = 2.44; p = 0.124) and triglycerides (F = 1.08; p = 0.304) remained unchanged. Melatonin also increased glycogen content for red gastrocnemius (F = 82.81; p = 0.000), gluteus maximus (F = 19.55; p = 0.000), liver (F = 6.24; p = 0.016), and reduce to the white gastrocnemius (F = 4.28; p = 0.044). Regarding tissue triglyceride content, in the presence of melatonin there was a reduction in the white gastrocnemius (F = 20.79; p = 0.000), red gastrocnemius (F = 8.76; p = 0.005) and gluteus maximus (F = 4.90; p = 0.032), while it increased the soleus (F = 6.00; p = 0.019), with no effect on the liver (F = 3.44; p = 0.070). Therefore, the present study demonstrated that

in the presence of melatonin after isoload exercise, there was an increase in the levels of some amino acids in skeletal muscle tissue. Furthermore, melatonin modulated energy metabolism through the reduction of glucose, muscle and plasma triglyceride levels and accelerated the replacement of muscle glycogen content, as well as decreasing tissue damage when assessed through the reduction of lactate dehydrogenase. In this way, the cellular environment was favored for future efforts, at least from a bioenergetic point of view.

**Keywords:** Recovery after Exercise, N-acetyl-5-methoxytryptamine, Amino acids, Acylcarnitines, Nutrition, Swimming, Exercise Physiology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Hipótese da Dissertação.....24
- Figura 2** – Desenho experimental da dissertação.....27
- Figura 3** – Protocolo de adaptação ao meio líquido.....28
- Figura 4** – Ilustração da lactacidemia e porcentagem da massa corporal durante o teste incremental.....30
- Figura 5** – Comparação dos níveis de aminoácidos no glúteo máximo em diferentes momentos. As barras pretas representam os animais tratados com controle, enquanto as barras roxas representam os animais tratados com melatonina. Os grupos de tempo são definidos da seguinte forma: 1 hora - animais eutanasiados 1 hora após o exercício; 3 horas - animais eutanasiados 3 horas após o exercício; 24 horas - animais eutanasiados 24 horas após o exercício. As barras vermelhas representam  $p < 0,05$  entre os grupos no mesmo tempo.....38
- Figura 6** – Comparação dos níveis de aminoácidos no fígado em diferentes momentos. As barras pretas representam os animais tratados com controle, enquanto as barras roxas representam os animais tratados com melatonina. Os grupos de tempo são definidos da seguinte forma: 1 hora - animais eutanasiados 1 hora após o exercício; 3 horas - animais eutanasiados 3 horas após o exercício; 24 horas - animais eutanasiados 24 horas após o exercício.....40
- Figura 7** – Comparação dos parâmetros séricos nos diferentes momentos (A) Lactato Desidrogenase, (B) Creatina Quinase, (C) Glicemia e (D) Triglicérides Sanguíneos. Pretos são animais tratados com controle. Azul são animais tratados com melatonina. 1 hora: animais que foram eutanasiados 1 hora após o exercício. 3 horas: animais que foram eutanasiados 3 horas após o exercício. 24 horas: animais que foram eutanasiados 24 horas após o exercício. E.S: Tamanho do Efeito.....50
- Figura 8** – Conteúdo de glicogênio nos músculos, fígado e coração. Os gráficos representam as médias e desvios-padrão do conteúdo de glicogênio na porção branca (A) e vermelha (B) do gastrocnêmio, glúteo máximo (C) e fígado (D) em diferentes momentos. Pretos são animais tratados com controle. Azul são animais tratados com melatonina. 1 hora: animais que foram eutanasiados 1 hora após o exercício. 3 horas: animais que foram eutanasiados 3 horas após o exercício. 24 horas: animais que foram eutanasiados 24 horas após o exercício. As barras vermelhas representam  $p < 0,05$  entre os grupos no mesmo tempo. E.S: Tamanho do Efeito.....51
- Figura 9** – Conteúdo de triglicerídeos nos músculos e no fígado. Os gráficos representam as médias e desvios-padrão do conteúdo de triglicerídeos no músculo sóleo (A), gastrocnêmio branco (B) e vermelho (C), glúteo máximo (D) e fígado (E) em diferentes momentos. Pretos são animais tratados com controle. Azul são animais tratados com melatonina. 1 hora: animais que foram eutanasiados 1 hora após o exercício. 3 horas: animais que foram eutanasiados 3 horas após o exercício. 24 horas: animais que foram

eutanasiados 24 horas após o exercício. As barras vermelhas representam  $p < 0,05$  entre os grupos no mesmo tempo. E.S: Tamanho do Efeito.....52

**Figura 10** – Perfil de acilcarnitina no Glúteo Máximo. Os gráficos representam as médias e desvios-padrão do pool de carnitina de Carnitina Livre (A), C0 (B), C2 (C), C3 (D), C4 (E), C5 (F), C6 (G), C8 (H), C10 (I), C12 (J), C14 (K), C16 (L) e C18 (M) em diferentes momentos. Pretos são animais tratados com controle. Azul são animais tratados com melatonina. 1 hora: animais que foram eutanasiados 1 hora após o exercício. 3 horas: animais que foram eutanasiados 3 horas após o exercício. 24 horas: animais que foram eutanasiados 24 horas após o exercício.....54

**Figura 11** – Perfil de acilcarnitina no fígado. Os gráficos representam as médias e desvios-padrão do pool de carnitina de Carnitina Livre (A), C0 (B), C2 (C), C3 (D), C4 (E), C5 (F), C6 (G), C8 (H), C10 (I), C12 (J), C14 (K), C16 (L) e C18 (M) em diferentes momentos. Pretos são animais tratados com controle. Azul são animais tratados com melatonina. 1 hora: animais que foram eutanasiados 1 hora após o exercício. 3 horas: animais que foram eutanasiados 3 horas após o exercício. 24 horas: animais que foram eutanasiados 24 horas após o exercício.....56

**Figura 12** – Efeito da melatonina sobre tecido muscular esquelético, fígado e sangue após exercício isocarga.....68

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Resultados estatísticos dos aminoácidos do glúteo máximo que não apresentaram significância estatística para ANOVA e análise de Post hoc..... 39
- Tabela 2** – Resultados estatísticos dos aminoácidos do fígado que não apresentaram significância estatística para ANOVA e análise de Post hoc.....41
- Tabela 3** – Tabela Suplementar S1: Aminoácidos investigados em músculo esquelético e fígado de ratos e seus parâmetros experimentais de detecção.....89

## LISTA DE ABREVIATURAS E ABREVIACOES

% MC: Porcentagem da massa corporal

$\mu$ g: Micrograma

$\mu$ L: Microlitros

acil-CoA: Acil-coenzima A

ACN: Acetonitrila

ATP: Adenosina trifosfato

BC: Câncer de mama

BCAAs: Aminoácidos de cadeia ramificada

CACT: Carnitina-acilcarnitina translocase

CI: Intervalo de confiança

cm: Centímetros

CPT1: Carnitina palmitoiltransferase I

CPT2: Carnitina palmitoiltransferase II

CQ: Controle de qualidade

d: Dias

DMIE: Dano muscular induzido pelo exercício

EDTA: cido nitrilotriacético

EM1: Grupo Exercitado, tratado com melatonina e eutanasiados após 1 hora

EM24: Grupo Exercitado, tratado com melatonina e eutanasiados após 24 horas

EM3: Grupo Exercitado, tratado com melatonina e eutanasiados após 3 horas

ES: Tamanho do efeito

ESI+: Ionização positiva

Ex1: Grupo Exercitado, tratado com controle e eutanasiados após 1 hora

Ex24: Grupo Exercitado, tratado com controle e eutanasiados após 24 horas

Ex3: Grupo Exercitado, tratado com controle e eutanasiados após 3 horas

FADH<sub>2</sub>: Flavina adenina dinucleotídeo reduzida

FAT CD36: Transportador de ácido graxo CD36

FIA: Análise por Injeção de Fluxo

g: Gramas

GLUT4: Transportador de glicose tipo 4

h: Hora  
H<sub>2</sub>O: Água  
HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência  
iMCA: Intensidade da máxima capacidade aeróbia  
K: Kelvin  
kg: Quilograma  
LDH: L-lactic dehydrogenase bovine heart  
mg/dL: Miligrama/decilitro  
mg: Miligrama  
min: Minuto  
mL: Mililitro  
mmol: Milimol  
MRM: Monitoramento de múltiplas reações  
mTOR: Mammalian target of rapamycin  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Sulfato de sódio  
NaCl: Cloreto de sódio ou solução salina  
NAD: Beta-nicotinamide dinucleotide  
NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo  
nm: Nanômetros  
N<sub>2</sub>: Nitrogênio  
°C: Graus celsius  
PI: Padrão interno  
PI3K: Fosfoinositídeo 3-quinase  
Prof: Profundidade  
ROS: Espécies reativas de oxigênio  
Rpm: Rotações por minuto  
TCA: Ácido tricloroacético  
TI: Teste incremental  
W: Watts  
ZDF: Ratos machos jovens obesos e diabéticos Zucker  
ZT: Zeitgeber time

## **LISTA DE SIGLAS**

AVMA - American Veterinary Medical Association

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

PIPGCF – Programa Interinstitucional em Ciências Fisiológicas Associação Ampla

UFSCar/UNESP

LAFEEEx – Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico

DCF – Departamento de Ciências Fisiológicas

CCBS – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

## SÚMARIO

<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS</b> .....	3
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	23
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	23
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	23
<b>3 HIPÓTESE</b> .....	23
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	24
4.1 AMOSTRAS E CONDIÇÕES AMBIENTAIS .....	25
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL .....	26
4.4 TESTE INCREMENTAL DE NATAÇÃO .....	29
4.5 EXERCÍCIO DE ENDURANCE .....	30
4.6 ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA.....	31
4.7 EUTANÁSIA, COLETA E ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	31
<b>4.7.1 Eutanásia</b> .....	31
<b>4.7.2 Coleta de sangue</b> .....	31
<b>4.7.3 Coleta de tecidos</b> .....	31
<b>4.7.4 Análise das amostras sanguíneas</b> .....	31
<b>4.7.5 Análise das Amostras do Tecido Muscular Esquelético</b> .....	32
4.7.5.1 Acilcarnitinas e Aminoácidos.....	32
<b>4.7.5.1.1 Perfil de Acilcarnitinas e Aminoácidos</b> .....	32
<b>4.7.5.1.2 Análise MS Tandem</b> .....	33
4.7.5.2 Glicogênio .....	33
4.7.5.3 Triglicérides Muscular.....	34
4.8 ANÁLISE E PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS .....	34
<b>5 RESULTADOS</b> .....	34
5.1 Capítulo 1.....	35
5.2 Capítulo 2.....	48
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	63
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	68
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69
<b>ANEXO</b> .....	88

## 1 INTRODUÇÃO

A melatonina, uma indolamina com características anfífilas (Amaral et al., 2018), desempenha um papel crucial na regulação de uma variedade de processos fisiológicos (Reiter et al., 2010). Produzida primariamente pela glândula pineal (Tan et al., 2018), ela é capaz de atravessar membranas plasmáticas celulares (Kopustinskiene and Bernatoniene 2021), incluindo a barreira hematoencefálica (Marseglia et al., 2017), sendo liberada tanto na corrente sanguínea quanto no líquido cefalorraquidiano (Legros et al., 2014). Sua ação endócrina ocorre ao circular livremente no plasma ou quando se liga à albumina (Tarocco et al., 2019), exercendo influência sobre diversos órgãos e tecidos (Slominski et al., 2012; Silva et al., 2024). Apesar da extensa literatura que sugere que a melatonina é sintetizada em vários órgãos, além da glândula pineal, como o cérebro, a retina, o fígado, o trato gastrointestinal, o coração, e o músculo esquelético (Acuña-Castroviejo et al., 2014), estudos recentes contestam essa produção extra-pineal. Pesquisas atuais indicam que a suposta síntese de melatonina em locais fora da glândula pineal pode ser resultado de erros metodológicos em estudos anteriores, desafiando a aceitação generalizada da melatonina extra-pineal (Kennaway 2023). Além de sua conhecida regulação nos ritmos circadianos e sazonais (Cajochen et al., 2003; Xie et al., 2017; Zisapel 2018; Vasey et al., 2021; Verma et al., 2023; Megha et al., 2024). Ela influencia as funções cronobiológicas ao estabelecer padrões diários de secreção em outras glândulas (Solberg et al., 1999), coordenando assim o ciclo de sono/vigília e outros processos biológicos (Claustrat and Leston 2015). Essa capacidade de regular os ritmos biológicos tem implicações significativas para a saúde e o bem-estar geral (Satyanarayanan et al., 2018; Yousefi and Reiter 2022; Boutin et al., 2023). A melatonina desempenha papéis importantes em outros aspectos fisiológicos.

Adicionalmente, a melatonina é reconhecida por suas propriedades antioxidantes (Tan et al., 2015; Reiter et al., 2016; Reiter et al., 2017; Mayo and Sainz 2019; Joseph et al., 2024; Monteiro et al., 2024), que desempenham um papel crucial na proteção contra o estresse oxidativo e danos celulares (Colin-Gonzalez et al., 2015; Sánchez et al., 2015; Galano and Reiter 2018; Kruk et al., 2021). Essa capacidade antioxidante é fundamental para a manutenção da integridade celular e pode ter importantes implicações na prevenção de doenças relacionadas ao envelhecimento (Cardinali 2021; Bocheva et al., 2022; Tchekalarova and Tzoneva 2023) e ao estresse oxidativo (Mladenov et al., 2023; Makris et al., 2023). Além disso, a melatonina tem sido associada a melhorias no sistema imunológico (Guerrero and Reiter 2002; Gunata et al., 2019; Moslehi et al., 2022), ajudando a modular a resposta imune do organismo a diversos estímulos tais como esclerose múltipla, artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal e diabetes mellitus tipo II (Bondy and Campbell 2020; Aslam et al., 2023). Ela pode influenciar a atividade de diferentes células do sistema imunológico e regular a liberação de citocinas inflamatórias (Mauriz et al., 2013; Carrillo-Vico et al., 2013), contribuindo assim para a regulação da resposta inflamatória e a proteção contra infecções e doenças autoimunes (Esposito and Cuzzocrea 2010; Hardeland 2019; Cho et al., 2021). Portanto, fica claro que a melatonina desempenha uma variedade de papéis importantes no organismo, indo

além de sua função tradicional na regulação dos ritmos circadianos. Seu impacto abrangente em processos fisiológicos fundamentais a torna uma molécula fascinante e alvo de intensa investigação científica.

Os estudos sobre os efeitos da melatonina no exercício físico têm sido uma área de interesse crescente também entre os cientistas da área do exercício. Além dos diversos papéis previamente mencionados, a melatonina também demonstrou influenciar o metabolismo energético, aumentando a oxidação de gordura, preservando o glicogênio muscular e consequentemente aumentando o tempo até a exaustão durante a atividade física em modelo animal (Beck et al., 2015A; Beck et al., 2016; Faria et al., 2021; Faria et al., 2022). O efeito antioxidante da melatonina apresenta naturalmente diversas vantagens no contexto do exercício físico, ajudando a proteger as células contra danos oxidativos induzidos pelo estresse metabólico durante o exercício (Ben Dhia et al., 2022; Cimen et al., 2017; Borges et al., 2015; Canals-Garzón et al., 2022). Além disso, ela pode modular a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico e glicídico (Cipolla-Neto et al., 2014; Garaulet et al., 2020; Hong et al., 2020; Zhu et al., 2021; Hsu and Chien 2023; Lotfy et al., 2024), influenciando a utilização de gordura e glicose como substratos energéticos durante o exercício (Faria et al., 2021; Faria et al., 2022). Estudos recentes sugerem que a melatonina pode aumentar a oxidação de ácidos graxos durante o exercício, promovendo assim uma maior utilização de gordura como fonte de energia (Souissi et al., 2022), o que pode ser especialmente benéfico para atletas de resistência (Bosma 2014; Noland 2015). Além de que, a melatonina também foi associada à preservação das reservas de glicogênio muscular, contribuindo para a manutenção da energia durante o exercício prolongado (Faria et al., 2021; Faria et al., 2022). Esses efeitos combinados podem melhorar o desempenho atlético e facilitar a recuperação pós-exercício, tornando a melatonina uma possível estratégia ergogênica para atletas e praticantes de atividade física.

Além do potencial efeito ergogênico que a melatonina exerce em aumentar a performance durante o exercício de endurance, outra área de interesse que vem ganhando destaque são os promissores efeitos da melatonina no cenário fisiológico após o esforço, auxiliando no processo de recuperação. O processo de recuperação pós-exercício é uma fase crucial que envolve uma gama complexa de fatores fisiológicos. Além de reparar o tecido muscular (Tidball 2011; Shadrin et al., 2016) e restabelecer o equilíbrio redox (He et al., 2016; Margaritelis et al., 2020; Galli et al., 2021), é fundamental regular a resposta inflamatória (Beiter et al., 2015; Allen et al., 2015; Scheffer and Latini 2020) e otimizar o metabolismo energético, melhorando a eficiência e a eficácia com que o corpo produz, utiliza e gerencia energia para realizar diversas funções biológicas (atividade muscular, transporte de moléculas, crescimento e reparo celular e eliminação de resíduos metabólicos). (Bielinski et al., 1985; Sato et al., 2019; Hargreaves and Spriet 2020). Estudos têm destacado que o fígado e o músculo são particularmente cruciais nesse processo (Hu et al., 2020; Cao and Thyfault 2023), pois desempenham papéis essenciais na síntese/armazenamento de nutrientes (Argilés et al., 2016; Kanungo et al., 2018) e oxidação de substratos (Hu et al., 2019; King et al., 2019), bem como na regulação metabólica global, por meio da disponibilidade de nutrientes, manutenção da homeostase metabólica, regulação hormonal e interações sistêmicas (Chakravarthy et al., 2020). No

que diz respeito ao estado redox, as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas durante o exercício podem desempenhar um papel duplo, tanto como sinalizadores celulares para biogênese mitocondrial, angiogênese, além da ativação/expressão das enzimas oxidativas e do sistema de defesa antioxidante (Silva 2022; Powers et al., 2024) quanto como agentes causadores de dano oxidativo (Powers et al., 2020; Bouviere et al., 2021). Portanto, garantir um equilíbrio adequado entre a produção e a neutralização de ROS é essencial para a recuperação eficaz do tecido muscular e a prevenção do estresse oxidativo (Zhou et al., 2024).

O dano muscular induzido pelo exercício (DMIE) é uma ocorrência comum, especialmente em atividades de alta intensidade ou longa duração (Schoenfeld 2012; Markus et al., 2021; Bischof et al., 2024). Esse dano é caracterizado por microlesões nas fibras musculares (Stozer et al., 2020; Wilke and Behringer 2021), que desencadeiam processos de reparo e regeneração (Li et al., 2024). A resposta inflamatória desempenha papel crucial nesse processo, recrutando células imunes e mediadores inflamatórios para o local da lesão e facilitando a remoção de detritos celulares (Fatouros and Jamurtas 2016; Westman et al., 2020; Tu and Li 2023). Além do mais, o metabolismo energético desempenha um papel fundamental na recuperação pós-exercício (Lundsgaard et al., 2020; Bester et al., 2023), com o fornecimento de energia sendo essencial para a síntese de novas proteínas musculares (Marchingo and Cantrell 2022), reposição de glicogênio (Murray and Rosenbloom 2018) e reparo de tecidos danificados (Zhuang et al., 2024). O fígado desempenha um papel central na regulação do metabolismo energético, especialmente no contexto da atividade física. Durante o exercício, ele regula a concentração de glicose no sangue e libera substratos energéticos essenciais para sustentar a atividade muscular (Schweitzer et al., 2023). Após o esforço físico, o fígado continua a desempenhar um papel crucial na recuperação, facilitando a reposição dos estoques de glicogênio e promovendo a restauração do equilíbrio energético (Fuller et al., 2019). Este processo é fundamental para a manutenção da homeostase metabólica e para a otimização da performance e recuperação muscular.

A investigação sobre as respostas fisiológicas ao exercício exaustivo sob influência da melatonina é um campo de estudo vital tanto para atletas de alto rendimento quanto para indivíduos que buscam melhorar sua saúde e condicionamento físico. Os estudos de Beck et al. (2016) e Faria et al. (2022) contribuem significativamente para essa área, fornecendo informações valiosas sobre diferentes aspectos da resposta do organismo ao esforço físico intenso. Beck et al. (2016) concentraram-se em examinar o cenário fisiológico imediatamente após a conclusão do exercício exaustivo. Essa abordagem oferece uma perspectiva única sobre as respostas agudas do corpo ao estresse físico extremo. Durante esse período, uma série de processos metabólicos, hormonais e imunológicos são desencadeados para lidar com a demanda aumentada de energia e a produção de metabólitos resultantes do exercício exaustivo. Compreender essas respostas imediatas é crucial para desenvolver estratégias eficazes de recuperação e maximizar os benefícios do treinamento físico (Reale et al., 2017). Por outro lado, Faria et al. (2022) optaram por estender o período de análise para até três horas após o exercício exaustivo. Essa abordagem permite uma visão mais abrangente da resposta do organismo ao esforço

físico intenso, capturando não apenas as respostas imediatas, mas também as adaptações que ocorrem durante a fase inicial de recuperação.

Durante esse período prolongado, observam-se mudanças significativas nos marcadores metabólicos, hormonais e imunológicos, que refletem os processos de restauração da homeostase e reparação tecidual. Ao comparar os resultados desses dois estudos, podemos destacar a complexidade das respostas fisiológicas ao exercício exaustivo ao longo do tempo. Enquanto Beck et al. oferecem uma visão detalhada das primeiras respostas do corpo, Faria et al. complementam essa perspectiva ao examinar as adaptações que ocorrem nas horas seguintes ao esforço físico intenso. Essa abordagem comparativa é essencial para uma compreensão mais completa dos mecanismos subjacentes à fadiga e recuperação muscular, proporcionando insights importantes para o desenvolvimento de estratégias personalizadas de treinamento e recuperação para atletas e praticantes de exercícios físicos.

A consideração do modelo exaustivo de exercício nos estudos de Beck et al. (2016) e Faria et al. (2022) é fundamental para compreender o papel ergogênico da melatonina. No entanto, essa abordagem pode introduzir variações nos tempos de exercício para os animais e, conseqüentemente, cenários fisiológicos distintos, o que dificulta uma análise precisa do processo de recuperação pós-esforço. Diante desse desafio metodológico, surge a necessidade de implementar um novo modelo de exercício físico que minimize esse viés. Uma abordagem promissora seria adotar um modelo de carga fixa, no qual os animais seriam submetidos à mesma carga de trabalho em todas as sessões de exercício. Isso garantiria uma maior uniformidade nos estímulos físicos aplicados, permitindo uma comparação mais direta entre os diferentes grupos experimentais e uma melhor avaliação das respostas fisiológicas ao exercício e à recuperação subsequente.

Ao padronizar a carga de trabalho, o novo modelo de treinamento proporcionaria uma base mais sólida para investigar os efeitos da melatonina e outras intervenções na resposta do organismo ao exercício. Além disso, permitiria uma análise mais precisa dos mecanismos subjacentes à fadiga muscular e aos processos de recuperação, contribuindo para o avanço do conhecimento científico nessa área. Portanto, a transição para um modelo de carga fixa representa um passo importante na busca por uma compreensão mais aprofundada dos efeitos do exercício físico e das estratégias de recuperação. Essa abordagem metodológica mais rigorosa tem o potencial de fornecer perspectivas valiosas para o desenvolvimento de protocolos de treinamento mais eficazes e para a otimização do desempenho atlético e da saúde física.

A investigação dos diversos cenários fisiológicos após o exercício físico, como mencionado anteriormente é essencial para compreender os mecanismos subjacentes à recuperação e adaptação do organismo. Priorizando o metabolismo energético, pesquisas recentes têm se concentrado no papel emergente da melatonina na regulação dos processos metabólicos de carboidratos e lipídios pós-exercício. Faria et al. (2021) contribuem com compreensões valiosas sobre a influência da melatonina no metabolismo de carboidratos e lipídios após o exercício físico, utilizando um modelo animal. Os pesquisadores observaram evidências promissoras de que a melatonina desempenha um papel na regulação de proteínas-chave, como GLUT4 e FAT/CD36, que estão envolvidas

no transporte de glicose e ácidos graxos para dentro das células musculares, respectivamente. Essas descobertas sugerem um potencial papel da melatonina na modulação do uso de substratos energéticos durante o período de recuperação pós-exercício, o que pode ter implicações significativas para o desempenho físico e a saúde metabólica. No entanto, apesar dos avanços recentes, permanece uma lacuna no conhecimento sobre o impacto da melatonina sobre o pool de acilcarnitinas e aminoácidos após o exercício físico.

O pool de acilcarnitinas é um componente crítico do metabolismo energético (Dambrova et al., 2022), desempenhando um papel fundamental no transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias (Tonazzi et al., 2021), onde ocorre a betaoxidação para finalmente gerar ATP (Kankuri et al., 2023). Durante o exercício físico, há aumento na demanda por ácidos graxos como fonte de energia (Muscella et al., 2020), especialmente em atividades de baixa intensidade e longa duração (Purdom et al., 2018). Além disso, os aminoácidos desempenham papéis multifacetados no metabolismo energético e na síntese proteica (Xiao and Guo 2022). Durante o exercício físico, os aminoácidos podem ser mobilizados a partir de diferentes fontes, incluindo o catabolismo de proteínas musculares e a liberação de aminoácidos a partir do tecido adiposo e do fígado (Hood and Terjung 1990; Posey et al., 2021). Esses aminoácidos podem então ser utilizados como combustível para a produção de energia ou como precursores para a síntese de proteínas reparadoras e de crescimento (Li and Hoppe 2023). Embora não existam evidências sobre os efeitos da melatonina no metabolismo de aminoácidos e acilcarnitinas durante o exercício, os estudos se restringem ao contexto de doenças. Junior et al. (2022) observaram, em um modelo de xenoenxerto de camundongo com câncer de mama triplo negativo (BC) tratado com melatonina, uma redução em algumas moléculas de aminoácidos e acilcarnitinas em animais afetados por BC em comparação com seus respectivos controles. Esse efeito é considerado positivo nesse contexto, pois a redução dessas moléculas pode impactar o metabolismo das células cancerígenas. Há também evidências recentes mostrando que a melatonina está ganhando destaque como um novo regulador do crescimento de plantas (Dey et al., 2023), por aumentar a concentração de aminoácidos em plantas sob estresse ambiental. Nesse contexto, compreender como a melatonina influencia o pool de aminoácidos e acilcarnitinas é crucial, pois pode proporcionar novos entendimentos sobre como essa substância afeta a capacidade do organismo de utilizar aminoácidos e ácidos graxos como substratos energéticos durante a recuperação pós-exercício.

A análise metabolômica permite a identificação e quantificação simultânea de uma variedade de metabólitos, incluindo as acilcarnitinas e aminoácidos, como destacado por Miller et al. (2021). Através da análise metabolômica, é possível explorar as complexas vias metabólicas e as inter-relações entre os metabólitos (McAnn et al., 2021). Uma das vantagens distintivas da metabolômica é sua capacidade de detectar alterações sutis no perfil metabólico que muitas vezes escapam à detecção por técnicas analíticas convencionais, como cromatografia líquida e espectrometria de massa (Alseekh et al., 2021). Essa sensibilidade analítica é fundamental para identificar modificações metabólicas que podem estar associadas a estados fisiopatológicos específicos, bem como para monitorar os efeitos de intervenções terapêuticas ou nutricionais. Além do mais, a avaliação do dano tecidual por meio do extravasamento de enzimas intracelulares emerge

como um potencial alvo terapêutico para a ação da melatonina. A melatonina, conhecida por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, pode desempenhar um papel na atenuação do dano tecidual induzido pelo estresse oxidativo e pela inflamação associada ao exercício físico intenso. A identificação precisa desses biomarcadores de dano tecidual pode facilitar a avaliação do impacto terapêutico da melatonina e de outras intervenções na mitigação do dano muscular e na promoção da recuperação pós-exercício.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar os efeitos da melatonina no processo de recuperação após esforço de ratos submetidos ao exercício de natação em intensidade correspondente a máxima capacidade aeróbia.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

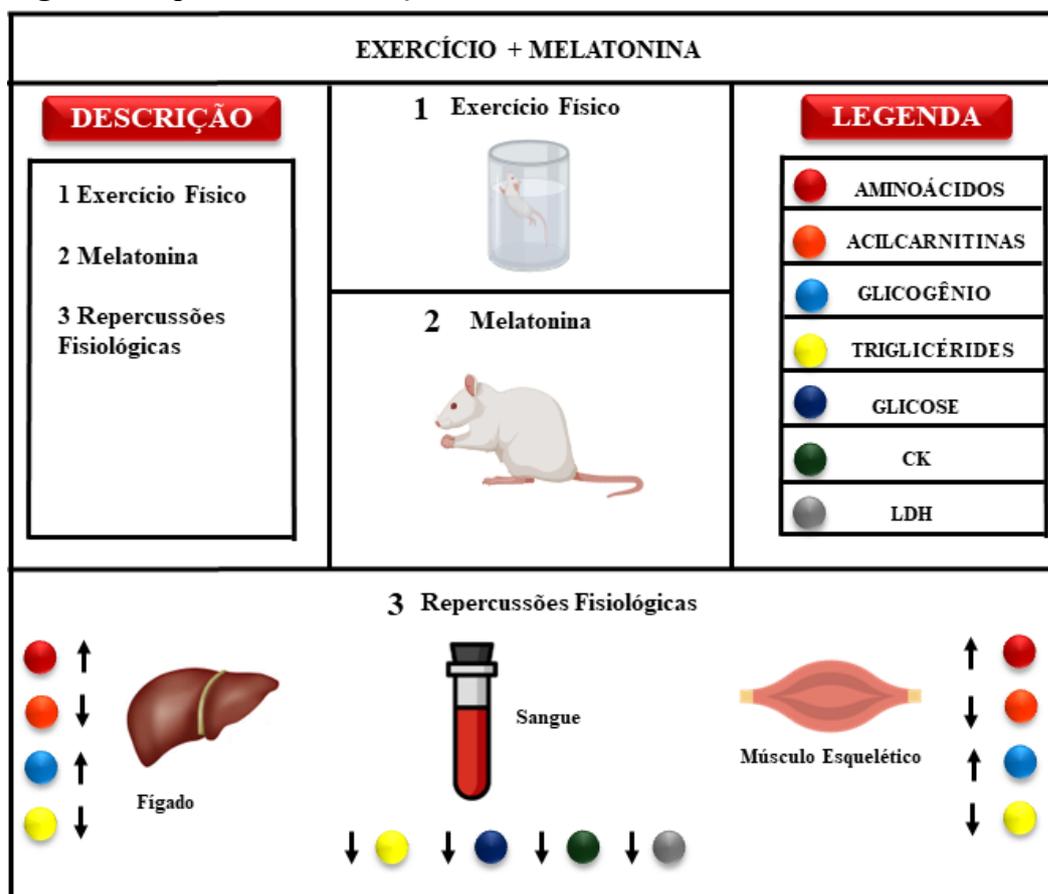
Avaliar os efeitos da administração aguda de melatonina em ratos no processo de recuperação após exercício de natação sobre:

- a) pool de aminoácidos muscular e hepático;
- b) pool de acilcarnitinas muscular e hepática;
- c) concentração de glicose e triglicérides sanguíneo;
- d) concentração de lactato desidrogenase e creatina quinase;
- e) conteúdo de glicogênio em músculo esquelético (gastrocnêmio branco e vermelho, glúteo máximo) e fígado;
- f) conteúdo de triglicérides em músculo esquelético (sóleo, gastrocnêmio branco e vermelho, glúteo máximo) e fígado.

## **3 HIPÓTESE**

A administração aguda de melatonina diminuirá o pool de acilcarnitinas e aumentará o pool de aminoácidos em tecido muscular e hepático, otimizará a utilização de triglicérides musculares e hepáticos e preservará os estoques de glicogênio muscular e hepático, reduzirá os níveis séricos de glicose e lipídios e diminuirá o dano tecidual, melhorando o cenário fisiológico para futuros esforços.

**Figura 1:** Hipótese da dissertação



**Figura 1:** Hipótese. CK: Creatina Quinase; LDH: Lactato Desidrogenase; Seta para cima: Aumento; Seta para baixo: Redução.

#### 4 METODOLOGIA

Para fornecer uma orientação clara ao leitor, esta dissertação estrutura-se no entorno de dois artigos, os quais são apresentados individualmente na seção "Resultados - Capítulos 1 e 2". Nesta seção introdutória, é fornecida uma metodologia geral que abrange os procedimentos adotados em ambos os artigos. A discussão do trabalho é dividida em duas partes: inicialmente, são apresentadas as análises e conclusões de cada artigo separadamente na seção "Resultados - Capítulos 1 e 2", e em seguida, é realizada uma discussão integrativa que aborda ambos os artigos de forma conjunta. Este formato foi escolhido com o intuito de proporcionar uma compreensão clara e sistemática do conteúdo apresentado, permitindo ao leitor uma análise minuciosa e abrangente dos resultados e conclusões obtidos.

#### 4.1 AMOSTRAS E CONDIÇÕES AMBIENTAIS

O estudo empregou ratos albinos da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e alojados no Biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico (LAFEEEx), localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da mesma instituição. A necessidade de um controle rigoroso das condições ambientais, incluindo temperatura, umidade relativa e iluminação, é devido à natureza dos experimentos que envolvem variáveis da cronobiologia. Para garantir as condições adequadas de alojamento, os ratos foram acomodados individualmente em gaiolas de polipropileno, as quais possuíam dimensões padronizadas de comprimento 40 cm, largura 30 cm e altura 15 cm, permitindo um espaço adequado para movimentação. Cada gaiola abrigou até cinco animais, proporcionando condições de convivência social compatíveis com o comportamento natural da espécie (Begni et al., 2020). Essas medidas foram adotadas com o intuito de assegurar o bem-estar e a saúde dos animais utilizados no estudo, bem como a validade e a confiabilidade dos resultados obtidos.

Ao longo de todo o experimento, os ratos foram mantidos em um ambiente climatizado a uma temperatura constante de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ , com umidade relativa do ar mantida entre 45% e 55%. Os animais foram alimentados com uma ração comercial específica para roedores da marca Presence, linha laboratorial, e tiveram acesso irrestrito a água filtrada. Medidas foram tomadas para controlar os ruídos no biotério, de modo a não excederem 85 decibéis e um ciclo claro/escuro de 12 horas, com as luzes sendo desligadas às 6:00 horas (Zeitgeber 12), visando minimizar qualquer possível interferência nos experimentos conduzidos. Os procedimentos experimentais foram conduzidos em conformidade com a legislação brasileira e as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todo o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) sob o número de protocolo 8038210222, conforme documentação detalhada no anexo da presente dissertação (Certificado CEUA). Essas medidas visam assegurar o cumprimento dos mais elevados padrões éticos e legais no manejo e utilização de animais em experimentação científica.

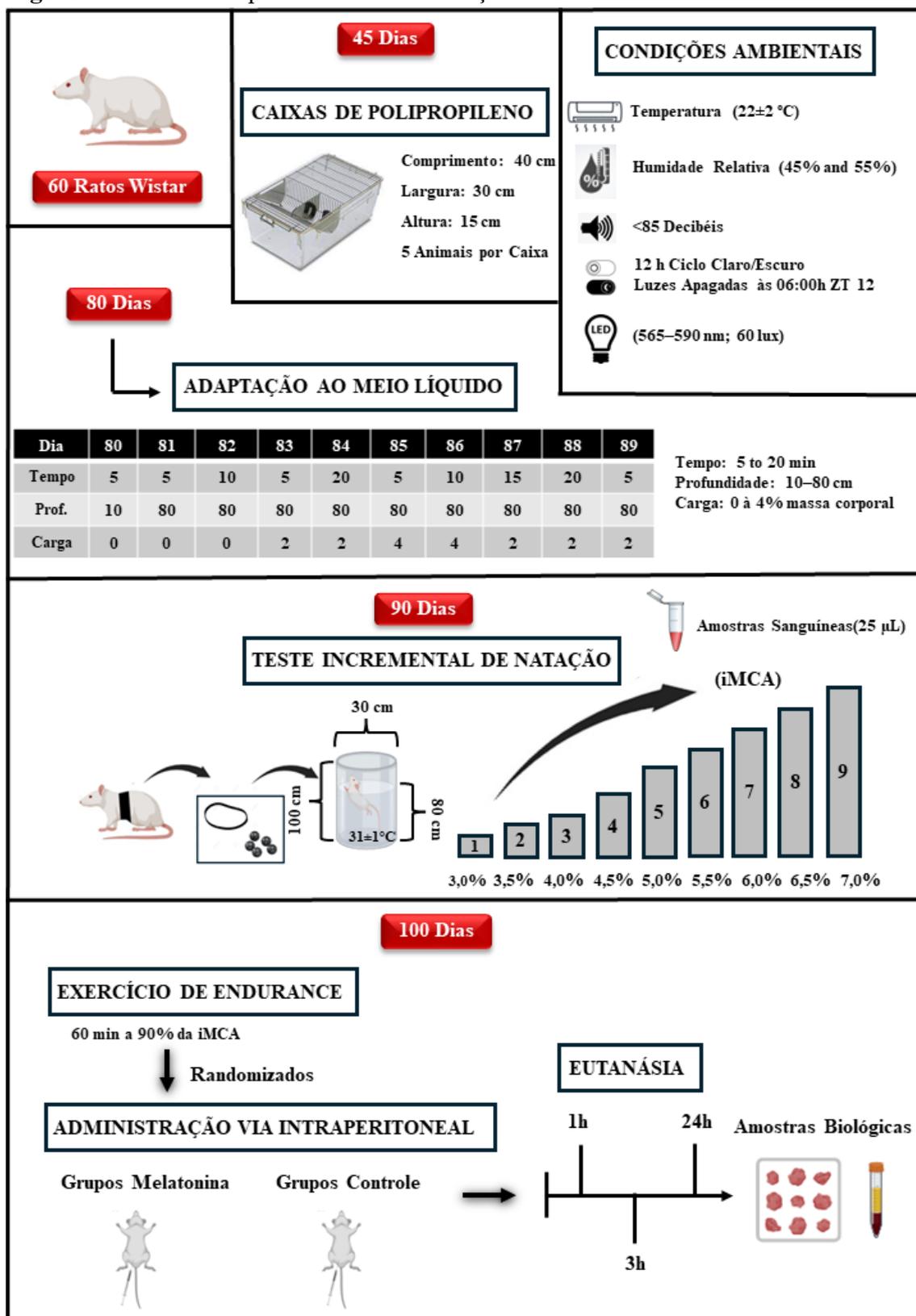
Para prevenir os efeitos adversos da retinopatia fototóxica em animais albinos, uma condição que pode introduzir interferências indesejáveis em experimentos, especialmente aqueles relacionados à melatonina e ao ritmo circadiano, adotou-se uma abordagem metódica. Lâmpadas de led, 2700K, 4.8 W, foram empregadas nos ambientes de alojamento e nos locais de testes físicos. Essas lâmpadas foram controladas por um potenciômetro para assegurar um ajuste preciso da intensidade luminosa. Com uma temperatura de cor de aproximadamente 2700 K e comprimentos de onda entre 565 e 590 nm, essas lâmpadas replicam o espectro da luz natural e foram selecionadas para evitar o estresse visual nos animais. Durante o ciclo claro de 12 horas, a intensidade luminosa dentro das gaiolas foi mantida no máximo a 60 lux, medida com precisão utilizando um luxímetro. Para intervenções experimentais realizadas durante o período de vigília dos ratos (noturno – das 6:00 às 18:00 horas), refletores foram instalados no biotério e na sala de avaliação. Esses refletores foram envoltos por um filtro vermelho da

marca LEE Filters, modelo 019 Fire, que permitiu a emissão de ondas luminosas acima de 600 nm, reduzindo assim a exposição à luz visível. A intensidade luminosa foi rigorosamente controlada para não exceder 15 lux de incidência sobre os animais, conforme determinado por estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisas (Beck e Gobatto, 2013). Essas medidas foram adotadas para garantir a uniformidade das condições experimentais e minimizar potenciais distorções nos resultados decorrentes de variações na exposição à luz.

#### 4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Aos 45 dias de idade, um total de 60 ratos da linhagem Wistar, com pesos variando aproximadamente entre 120 e 150 g, foram introduzidos no biotério, que havia sido previamente preparado para acomodar adequadamente os animais. Os ratos foram então divididos aleatoriamente em seis grupos, cada um composto por 10 animais, sem identificação das intervenções. Após um período de adaptação ao ambiente aquático e a determinação da intensidade da máxima capacidade aeróbia, todos os animais foram submetidos a um protocolo de exercício de endurance de natação. Posteriormente, foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos experimentais, com 10 animais em cada grupo. Os grupos foram delineados da seguinte forma: Grupo Exercitado (E) tratado com melatonina (M, 10 mg.kg<sup>-1</sup>), com os animais eutanasiados após 1 hora (EM1), 3 horas (EM3) ou 24 horas (EM24); ou Grupo Exercitado tratado com controle (Ex, de mesmo volume e componentes, exceto melatonina, com os animais eutanasiados 1 hora (Ex1), 3 horas (Ex3) ou 24 horas (Ex24) após o exercício de endurance.

**Figura 2** – Desenho experimental da dissertação

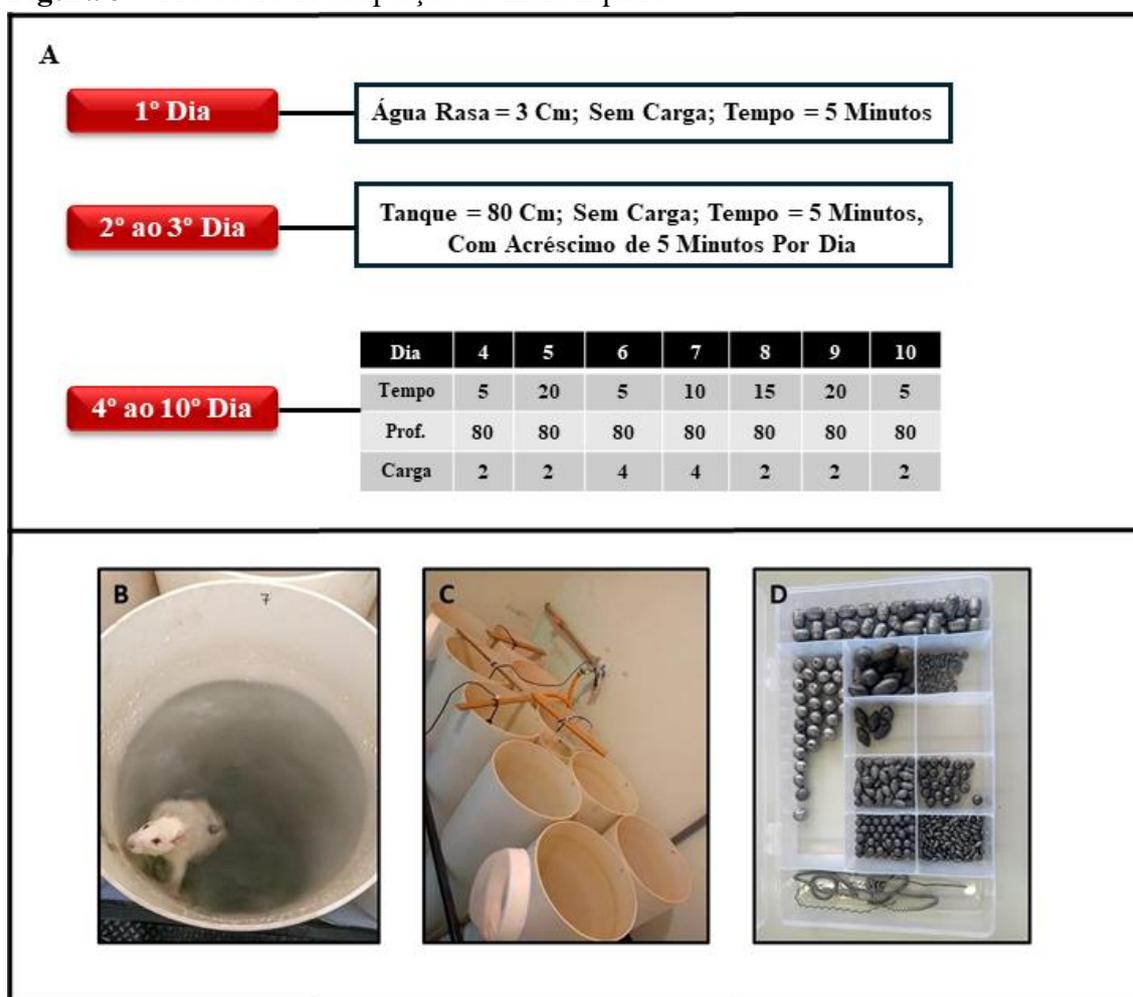


**Figura 2:** Desenho experimental da ilustrando as etapas do início ao fim do experimento. ZT: zeitgeber time; iMCA: intensidade da máxima capacidade aeróbia.

#### 4.3 ADAPTAÇÃO AO MEIO LÍQUIDO

Após o período de alojamento, os ratos foram submetidos a um processo de adaptação ao ambiente aquático e à prática de natação, conforme descrito por Beck et al. (2015A), durante um período de 10 dias, compreendido entre os 80 e 89 dias de idade dos animais. Durante esse período, os animais foram gradualmente introduzidos na água, sendo submetidos a sessões de natação com duração de 5 a 20 minutos, em tanques cilíndricos e opacos. A profundidade da água foi progressivamente ajustada, variando de 10 a 80 cm, e uma carga adicional entre 0 a 4% da massa corporal foi aplicada nos animais durante as sessões de natação. A temperatura da água foi rigorosamente controlada ao longo do experimento, mantendo-se estável a  $31\pm 1$  °C. Esse controle preciso da temperatura foi fundamental para garantir condições ambientais adequadas e consistentes durante todo o período de adaptação e prática de natação dos animais. Essas medidas foram adotadas com o intuito de minimizar o estresse e assegurar a adaptação progressiva dos ratos ao ambiente aquático e à atividade física, contribuindo para a validade e confiabilidade dos resultados obtidos nos experimentos subsequentes.

**Figura 3** – Protocolo de adaptação ao meio líquido



**Figura 3** – Figura representativa do protocolo de adaptação ao meio líquido segundo Beck et al., (2015B), com duração de 10 dias (A). Após a adaptação ao meio líquido, os animais foram submetidos ao protocolo de natação individual (B) em tanques cilíndricos e opacos (C). Para realização do esforço em intensidade equivalente a 100% da máxima

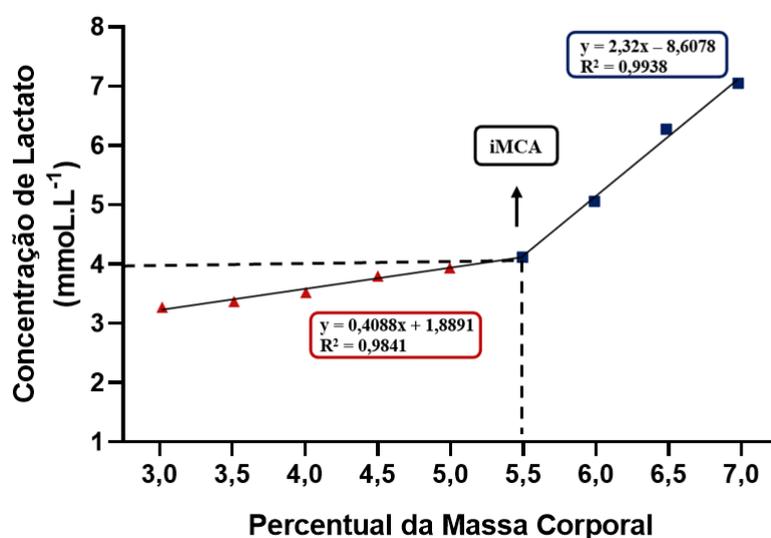
capacidade aeróbia individual, foi utilizada cargas de chumbo atada ao tórax dos animais (D). Cm: centímetros; Prof: profundidade. Tempo: minutos; Profundidade: centímetros; Carga: Percentual da massa corporal.

#### 4.4 TESTE INCREMENTAL DE NATAÇÃO

Aos 90 dias de idade, todos os animais foram submetidos a um teste incremental (TI) com o propósito de determinar a intensidade do esforço correspondente à Máxima Capacidade Aeróbia Individualizada (iMCA). O TI, conforme descrito por Beck et al. (2015B), consistiu em aumentos progressivos da carga ao longo do tempo, visando identificar um aumento desproporcional na concentração de lactato sanguíneo em um determinado ponto frente a capacidade de tamponamento pelo músculo. Durante o teste, os animais foram submetidos a estágios de cinco minutos, nos quais a carga foi progressivamente aumentada em 0,5%, variando de 3,0% a 7,0% da massa corporal (% MC). Essas sobrecargas foram fixadas no tórax dos animais por meio de uma tira elástica. Após cada estágio, com intervalo de 30 segundos entre eles, foram coletadas amostras de sangue (25  $\mu$ L) da parte distal da cauda dos animais. Essas amostras foram armazenadas a 4°C para posterior determinação da concentração de lactato. A relação entre a intensidade do exercício e a concentração de lactato sanguíneo foi representada graficamente, utilizando-se o método bi-segmentado, como previamente descrito por Beck et al. (2015B). Posteriormente, foram ajustadas duas regressões lineares após o ponto de ruptura. A interseção dessas regressões lineares foi interpolada no eixo X, fornecendo a intensidade correspondente à iMCA. A interpolação no eixo Y correspondeu à concentração de lactato sanguíneo na iMCA, definida como o estado estacionário máximo de lactato, conforme detalhado por Beck et al. (2015B).

**Figura 4** – Ilustração da lactacidemia e porcentagem da massa corporal durante o teste incremental.

## Teste Incremental de Natação



**Figura 4** – O teste incremental consiste em aumentos proporcionais da carga (0,5% MC; eixo X), separados por 30 segundos de intervalo na qual amostras de sangue (25  $\mu$ L) são coletadas para determinação da concentração de lactato sanguíneo (eixo y). Em seguida, duas regressões lineares (pontos vermelhos e pontos azuis) são construídas seguindo o ponto de intersecção. A intersecção dessas regressões lineares interpoladas ao eixo X é usada para definir a intensidade correspondente a máxima capacidade aeróbia (Beck et al., 2015A) (linhas tracejadas indicam intensidade no eixo X). A interpolação para a linha y corresponde à concentração de lactato sanguíneo na intensidade da máxima capacidade aeróbia (linhas tracejadas indicam a concentração de lactato no eixo y). Os dados representados no gráfico referem-se ao animal 24 no experimento, onde o iMCA foi de 5,5% do peso corporal e o nível de lactato no iMCA foi de 4,0 mmol.L<sup>-1</sup>.

### 4.5 EXERCÍCIO DE ENDURANCE

Aos 100 dias de idade, todos os animais, com massa corporal média de  $396,07 \pm 4,40$  g, foram submetidos a um protocolo de exercício contínuo de natação com duração de 60 minutos. Este protocolo consistiu em uma intensidade de exercício correspondente a 90% da iMCA, realizado durante o tempo zeitgeber 12 (6:00h). O exercício foi conduzido pelo mesmo pesquisador responsável pelo manejo dos animais durante a execução do exercício e pela administração intraperitoneal da melatonina ou do controle. Essa padronização na condução do exercício e na administração das substâncias testadas é fundamental para garantir a consistência dos resultados e minimizar possíveis fontes de variação experimental.

## 4.6 ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA

A melatonina (Sigma Aldrich Chemical Corporation; St Louis, MO, EUA; M-5250, pureza > 98%) foi solubilizada em etanol (<0,1%) e subsequentemente diluída em solução salina (0,9% NaCl) para administração na dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup> (Beck et al., 2015A, 2016). O preparo da solução foi realizado imediatamente antes do uso e armazenado em frasco âmbar, protegido por papel alumínio para preservar a estabilidade da substância. Os animais do grupo controle receberam um volume equivalente apenas do controle (NaCl 0,9% e etanol <0,1%). A administração foi conduzida por via intraperitoneal imediatamente após o término do exercício de endurance. Essa abordagem permite uma administração precisa da melatonina e do controle, garantindo a uniformidade das condições experimentais e a validade dos resultados obtidos.

## 4.7 EUTANÁSIA, COLETA E ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

### 4.7.1 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados por decapitação 1, 3 ou 24 horas após o término do experimento, conforme permitido pela American Veterinary Medical Association (2020).

### 4.7.2 Coleta de sangue

Durante o teste incremental de natação, amostras de sangue (25 µL) foram coletadas da cauda dos animais em capilares de vidro heparinizados e calibrados. Estas amostras foram transferidas para microtubos plásticos (1,5 mL) contendo 400 µL de ácido tricloroacético (TCA) (4%), visando à preservação das amostras, e posteriormente misturadas e armazenadas à 4°C para análises posteriores.

Após a eutanásia, uma alíquota de aproximadamente 2,0 mL de sangue foi obtida e deixada em repouso por cerca de 20 minutos no ambiente sob um rack com gelo no fundo para permitir a coagulação. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 10 °C. O soro obtido foi cuidadosamente transferido para tubos de armazenamento e armazenado a -20 °C em alíquotas para evitar ciclos de descongelamento, garantindo a integridade das amostras.

### 4.7.3 Coleta de tecidos

Após a eutanásia, glúteo máximo e fígado foram coletados para análise do pool de aminoácidos e acilcarnitinas. Gastrocnêmio branco e vermelho, glúteo máximo e fígado foram coletados para análise de glicogênio. Sóleo, gastrocnêmio branco e vermelho, glúteo máximo e fígado foram coletados para análise de triglicérides.

### 4.7.4 Análise das amostras sanguíneas

Para a análise de lactato, após a etapa de preservação, as amostras foram submetidas a uma série de procedimentos laboratoriais. Primeiramente, foram agitadas e centrifugadas (3.000 rpm por 3 minutos) para a separação do plasma (sobrenadante). Em seguida, 50 µL do sobrenadante foram extraídos e transferidos para uma microplaca de 96 poços. Na sequência, adicionou-se 250 µL de uma solução reativa pré-preparada, composta por glicina, EDTA e hidrazina à 25%, e o pH foi ajustado para 9,45. Posteriormente, foram incorporados dinucleotídeo de β-nicotinamida adenina (NAD) e

L-desidrogenase láctica de coração bovino (LDH) à solução resultante. Após incubação por 20 minutos à 37°C, as amostras foram submetidas a medidas espectrofotométricas (Spectramax i3, Molecular Devices; San José, CA, Estados Unidos) a 340 nm para comparar os valores da amostra com uma curva padrão construída a partir de uma diluição serial de 1–15 mmol.L<sup>-1</sup> de L-Lactato (Engels and Jones 1978). Este procedimento laboratorial permite a determinação precisa da concentração de lactato nas amostras de sangue, fornecendo informações fundamentais para a avaliação do metabolismo durante o exercício físico.

Para a análise dos parâmetros séricos, as alíquotas de soro foram posteriormente utilizadas para determinação da concentração de glicose, triglicérides, creatina quinase e lactato desidrogenase, utilizando kits comerciais disponíveis (LaborLab; Guarulhos, SP, Brasil). As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro (Spectramax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA), seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante para garantir a precisão dos resultados. É importante destacar que apenas as amostras sem evidências de hemólise foram utilizadas para análise, garantindo a confiabilidade dos resultados e minimizando possíveis interferências nos ensaios bioquímicos. Este procedimento laboratorial permite a avaliação precisa dos parâmetros séricos de interesse, fornecendo informações valiosas sobre o perfil metabólico dos animais após os procedimentos experimentais.

#### **4.7.5 Análise das Amostras do Tecido Muscular Esquelético**

##### **4.7.5.1 Acilcarnitinas e Aminoácidos**

###### **4.7.5.1.1 Perfil de Acilcarnitinas e Aminoácidos**

A preparação das amostras seguiu o protocolo descrito por Sarafian et al. (2014), com algumas modificações. Todas as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e randomizadas antes da extração, com o intuito de evitar qualquer viés analítico. Isopropanol frio foi adicionado às amostras de tecido de acordo com o peso de cada uma, utilizando a proporção de 500 µL para cada 50 mg de amostra. As amostras foram então agitadas em vórtex por 30 segundos e submetidas a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido para promover a quebra das membranas celulares e a liberação dos metabólitos intracelulares. Em seguida, as amostras foram colocadas em um banho de ultrassom por 10 minutos para garantir a homogeneização da solução, seguido de nova agitação em vórtex por mais 30 segundos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, a 4 °C, por 10 minutos para separar os componentes sólidos dos líquidos. O sobrenadante (400 µL) foi cuidadosamente coletado e seco sob fluxo de gás N<sub>2</sub> para remover o solvente. Amostras em branco foram preparadas utilizando água ultrapura no lugar do plasma, servindo como controle de possíveis contaminações durante o processo de extração. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em 250 µL de uma solução contendo o padrão interno (PI) L-Leucina (5,5,5-D3) a uma concentração de 0,73 µg mL<sup>-1</sup> em Água (H<sub>2</sub>O) e Acetonitrila (ACN) (8:2 v/v), garantindo a precisão e a consistência das análises. Uma amostra agrupada foi formada após a extração, combinando partes iguais de cada extrato (25 µL), e então dividida em diferentes amostras de controle de qualidade (CQ). Estas amostras de CQ

foram distribuídas a cada 10 injeções para fins de monitoramento instrumental, garantindo a qualidade e a confiabilidade dos resultados obtidos.

#### 4.7.5.1.2 Análise MS Tandem

A aquisição de dados foi conduzida em um espectrômetro de massa triplo quadrupolo Water's® Xevo TQD (Waters Corporation, Milford, EUA), equipado com um controlador Shimadzu® SCL-10A, uma bomba controladora Shimadzu® LC-20AD e um injetor automático Shimadzu® SIL-20A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os procedimentos foram adaptados de Moura et al. (2022) para atender às necessidades específicas deste estudo. A análise foi realizada utilizando a técnica de Análise por Injeção de Fluxo (FIA), sem separação cromatográfica, com um volume de injeção de 10 µL. Um gradiente de fluxo variando de 0,01 a 0,50 mL.min<sup>-1</sup> foi aplicado, iniciando em 0,1 mL.min<sup>-1</sup> e mantido por 3 minutos, após o qual a taxa de fluxo foi reduzida para 0,1 mL.min<sup>-1</sup>, totalizando 4 minutos de tempo de execução. A fase móvel foi composta por uma mistura de água, acetonitrila e ácido fórmico (80:20:0,1, v/v/v). A fonte de ionização por eletrospray foi operada no modo de ionização positiva (ESI+), com os seguintes parâmetros: fluxo de gás de dessolvatação de 850 L/h; temperatura da fonte de 150°C; temperatura de dessolvatação de 500°C; tensões de capilar e cone ajustadas em 3,0 kV e 60,0 V, respectivamente. O instrumento foi operado no modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM), e as transições precursor > fragmento foram otimizadas para cada um dos compostos analisados, incluindo aminoácidos (n = 20) e acilcarnitinas (n = 12), conforme descrito na Tabela Suplementar S1. As áreas de pico das transições MRM foram registradas e integradas utilizando o software TargetLynx (Waters Corporation, Milford, EUA), garantindo uma análise precisa e confiável dos metabólitos alvo. Este meticuloso processo de análise proporciona uma avaliação detalhada do perfil metabólico, fornecendo insights valiosos para a compreensão dos processos bioquímicos subjacentes.

#### 4.7.5.2 Glicogênio

O conteúdo de glicogênio nos músculos esqueléticos, incluindo o glúteo máximo, bem como nas porções vermelha e branca do gastrocnêmio, e no fígado foi determinado de acordo com o método descrito por Dubois et al. (1956), com algumas modificações adaptadas para este estudo. Inicialmente, amostras de músculo esquelético (250 mg) e fígado (500 mg) foram coletadas e imersas em hidróxido de potássio (30%) da marca Êxodo Científica (Sumaré, SP, Brasil). Em seguida, foi adicionada uma solução saturada de sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (100 µL) da marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda (Indaiatuba, SP, Brasil) e etanol (70%) para precipitar o glicogênio presente nas amostras. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas com fenol (10 µL) da marca Êxodo Científica (Sumaré, SP, Brasil) e ácido sulfúrico (2 ml) da marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda (Indaiatuba, SP, Brasil), e aquecidas em banho-maria por 5 minutos a 85°C para promover a extração do glicogênio. Em seguida, a absorbância das amostras foi medida em um espectrofotômetro da Hach Company (Loveland, Colorado, Estados Unidos) a 490 nm. O conteúdo de glicogênio foi então calculado utilizando uma curva de calibração de glicose, proporcionando uma avaliação precisa do teor deste metabólito nos tecidos analisados.

#### 4.7.5.3 Triglicérides Muscular

Para determinar o conteúdo de triglicerídeos, as amostras de fígado e músculo esquelético (com pesos variando entre 100-200 mg, incluindo tecidos como sóleo, glúteo máximo e porções vermelha e branca do gastrocnêmio) foram submetidas a um processo de maceração utilizando nitrogênio líquido. Em seguida, essas amostras foram transferidas para tubos plásticos de 1,5 ml contendo Triton X-100 [1%], na proporção de 200 mg de tecido por 1 ml de Triton. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas durante a noite a 4°C, utilizando barras magnéticas (5 × 3 mm) para garantir uma mistura completa. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos, e 10 µL do sobrenadante foram pipetados para uma microplaca de 96 poços. Estes foram então misturados com o reagente fornecido no kit (200 µL, LaborLab; Guarulhos, SP, Brasil) e incubados por 20 minutos a 25°C. A absorbância dos triglicerídeos foi medida utilizando um espectrofotômetro (SpectraMax i3, Molecular Devices; San José, CA, Estados Unidos) a 505 nm, seguindo as instruções do kit utilizado para a análise. Esse procedimento permite uma avaliação precisa do conteúdo de triglicerídeos nas amostras de tecido, contribuindo para a compreensão dos processos metabólicos em estudo.

#### 4.8 ANÁLISE E PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os dados foram apresentados seguindo o formato de média ± desvio-padrão da média. A normalidade da distribuição foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ). Para analisar os efeitos da melatonina sobre os diferentes parâmetros abordados nos Capítulos 1 e 2, apresentados na seção "Resultados", empregou-se uma ANOVA de duas vias para analisar os efeitos da melatonina (dois níveis: EM1, EM3 e EM24 vs. Ex1, Ex3 e Ex24) e o efeito do tempo (três níveis: EM1 e Ex1 vs EM3 e Ex3 vs EM24 e Ex24). Quando pertinente, o teste post hoc de Newman-Keuls foi aplicado para comparações múltiplas entre grupos. Um nível de significância de 5% foi adotado para todas as análises, realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.; Tulsa, OK, Estados Unidos). Além disso, a análise do tamanho do efeito (ES; Cohen et al., 1988) e a construção de intervalos de confiança (CI) foram empregadas como testes complementares. Para efeitos de interpretação, foram estabelecidos limiares para efeitos pequenos, moderados e grandes, definidos como 0,20, 0,50 e 0,80, respectivamente. O tamanho do efeito (ES) foi calculado utilizando a fórmula:  $(\text{média}_1 - \text{média}_2) / \text{desvio-padrão da média}$ . Todos os tamanhos de efeito grandes foram incluídos na apresentação gráfica dos resultados (Cohen 1988).

### 5 RESULTADOS

Conforme previamente mencionado, a seção de resultados será apresentada na forma de artigo, subdividida em dois capítulos distintos. A metodologia detalhada de ambos os capítulos está descrita na metodologia geral da dissertação e, para evitar redundância, foi omitida nesta seção.

## 5.1 Capítulo 1

O presente artigo está atualmente sob revisão por pares na revista *Journal of Proteome Research* (fator de impacto: 4.4). Além disso, o manuscrito foi traduzido para o idioma original para evitar qualquer ocorrência de autoplágio.

### **O Impacto da Administração Aguda de Melatonina Após o Exercício Físico no Perfil de Aminoácidos do Músculo Esquelético e do Fígado em Ratos**

Alinson Eduardo Cipriano, Alex Aparecido Rosini Silva, Andreia de Melo Porcari, Leonardo Henrique Dalcheco Messias, Wladimir Rafael Beck.

#### **Resumo**

A melatonina tem potencial para atuar no processo de recuperação após exercício físico, porém, poucos estudos observaram os efeitos deste composto nos perfis de aminoácidos dos tecidos. Este estudo teve como objetivo avaliar como a administração de melatonina após o exercício impacta a abundância de aminoácidos nos tecidos e, portanto, seu metabolismo. Sessenta animais Wistar foram submetidos a exercício de natação de 60 minutos a 90% de sua máxima capacidade aeróbia (iMCA), seguido de administração via intraperitoneal de melatonina (EM; 10 mg.kg<sup>-1</sup>) ou controle (Ex) de mesmo volume, e em seguida os animais foram eutanasiados 1, 3 ou 24 horas após tal procedimento, para coleta dos tecidos hepático e muscular esquelético. Amostras de tecido foram extraídas e tiveram seu perfil de aminoácidos determinado usando análise de injeção de fluxo (FIA) acoplada à espectrometria de massa direcionada (MS). Foram utilizados ANOVA Two-way, post-hoc de Newman-Keuls e Effect size (ES), para todas as ocasiões foi estabelecido um nível de significância de 5%. Nenhum resultado significativo foi encontrado para o fígado, mas no músculo esquelético, a melatonina aumentou os níveis de aminoácidos como arginina, ácido glutâmico, glutamina, ornitina, prolina e serina. A melatonina também aumentou os níveis de glicina 3 horas pós exercício em comparação ao grupo controle (EM3>Ex3; p = 0,034) e reduziu os níveis de metionina 24 horas pós exercício em comparação ao grupo controle (EM24<Ex24; p = 0,001). Em conclusão, a melatonina participa do metabolismo muscular de aminoácidos durante o processo de recuperação após o exercício, ajudando a melhorar as condições de recuperação para futuros esforços. Tais aminoácidos possuem uma ampla gama de funções fisiológicas, como aumento de desempenho, atenuação da fadiga, recuperação pós exercício e síntese proteica e/ou substratos.

**Palavras-chave:** Recuperação pós exercício, melatonina, aminoácidos, metabolismo, fisiologia do exercício.

#### **Introdução**

A melatonina, uma indolamina com característica anfifílica (Amaral et al., 2019), possui a capacidade de permear membranas plasmáticas celulares, incluindo a barreira hematoencefálica (Marseglia et al., 2017). Sua produção é primariamente conduzida pela glândula pineal, sendo liberada diretamente no sangue ou no líquido cefalorraquidiano, exercendo ação endócrina ao circular livremente no plasma ou ligada à albumina. Entre suas principais funções, destaca-se sua regulação nos ritmos circadianos e sazonais (Reiter et al., 2010). A melatonina é capaz de influenciar funções cronobiológicas, estabelecendo padrões diários de secreção em outras glândulas (Solberg et al., 1999), de acordo com o ciclo de sono/vigília (Claustrat e Leston, 2015). Além disso, atribui-se a essa indolamina propriedades antioxidantes (Reiter et al., 2016), melhorias no sistema imunológico (Gunata et al., 2019) e efeitos anti-inflamatórios, preservando a integridade das membranas celulares (Ahmad et al., 2023).

Os cientistas da área do exercício têm investigado os potenciais efeitos da melatonina no contexto do exercício físico, especialmente no que diz respeito ao metabolismo energético. Nossa equipe demonstrou os efeitos ergogênicos da administração aguda de melatonina na tolerância ao exercício em intensidade correspondente à Máxima Capacidade Aeróbia Individualizada (iMCA) realizada durante o período de vigília em animais noturnos (Beck, 2015A; Beck et al., 2016; Faria et al., 2021; Faria et al., 2022). Além disso, observou-se que a melatonina induziu uma maior utilização de lipídios como substrato energético, preservando os estoques de glicogênio e acelerando sua ressíntese após o exercício quando administrada antes do esforço físico (Faria et al., 2021; Faria et al., 2022). O processo de recuperação pós-exercício envolve uma variedade de fatores, incluindo o estado redox (Gomez-Cabrera et al., 2021), dano muscular (Markus et al., 2021), inflamação (Bernat-Adell et al., 2017) e metabolismo energético (Jenni-Eiermann, 2016), sendo o fígado e o músculo os tecidos mais críticos (Xu et al., 2016). Focalizando no metabolismo energético, demonstramos evidências de que a melatonina influencia o metabolismo de carboidratos e lipídios após o exercício físico, porém, não há uma sugestão clara de que o mesmo ocorra com o metabolismo de aminoácidos. É amplamente documentado que os aminoácidos desempenham papéis anapleróticos significativos no suporte do metabolismo global (Brooks, 1987). Esses compostos apresentam diversos efeitos benéficos, incluindo efeito ergogênico, redução da inflamação, aceleração da eliminação de amônia, aumento da síntese de proteínas e outras moléculas importantes, além de contribuírem para processos como gliconeogênese e imunocompetência (Tsuda et al., 2020; Kumar et al., 2021; Nogusa et al., 2014; Gleeson, 2008; Mikulski et al., 2015; Sureda e Pons, 2012). Portanto, é plausível que o aumento dos níveis desses aminoácidos possa acelerar a recuperação pós-exercício. Seria interessante observar sua repercussão em diferentes momentos após um exercício isolado sob a influência da melatonina.

Embora os aminoácidos desempenhem um papel crucial nesse contexto, poucos estudos têm se dedicado a investigar sua concentração tanto no músculo quanto no fígado após a prática de exercícios físicos. Para abordar essa lacuna, a metabolômica, baseada na espectrometria de massa (MS), surge como o método padrão-ouro, possibilitando perfis precisos e abrangentes de aminoácidos. Essa ferramenta permite a identificação precisa de milhares de moléculas dentro de uma pequena matriz biológica, como sangue, urina ou tecido, sendo utilizada para compreender os efeitos agudos e crônicos do exercício (Kuehnbaum et al., 2015).

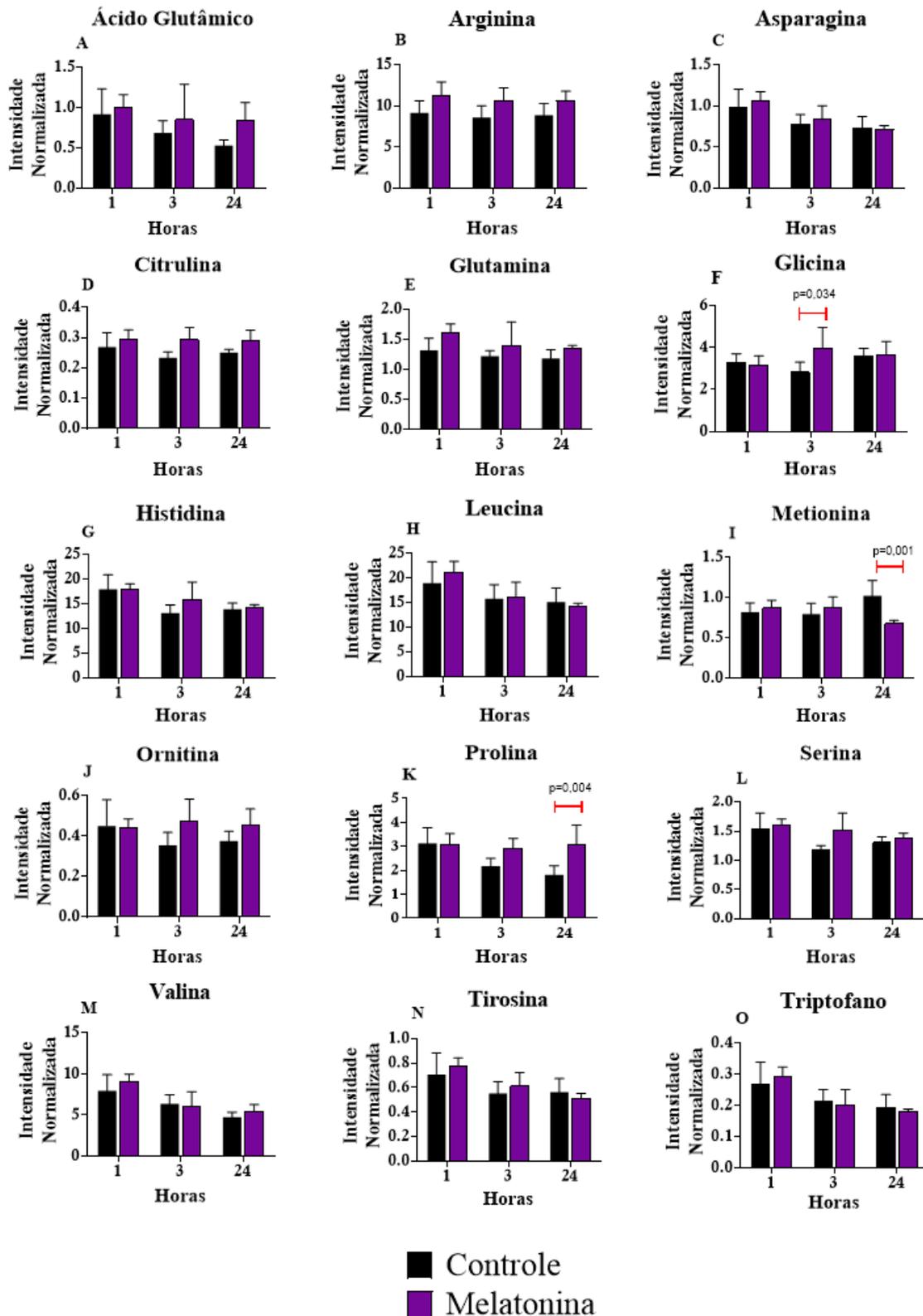
Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo investigar o impacto da melatonina na concentração de aminoácidos no fígado e no tecido muscular durante o período de recuperação após uma sessão de exercício isocarga.

## Resultados

Todos os animais completaram com sucesso o teste incremental de natação, atingindo uma duração média de  $48,25 \pm 27$  minutos, intensidades médias de  $5,1 \pm 0,4\%$  da massa corporal (% MC) e uma concentração média de lactato sanguíneo de  $4,7 \pm 0,6$  mmol.L<sup>-1</sup>. Adicionalmente, todos os animais conseguiram completar o exercício de resistência proposto.

No glúteo máximo, a administração de melatonina resultou em aumentos significativos nos níveis de alguns aminoácidos, incluindo arginina ( $F = 13,27$ ;  $p = 0,001$ ), ácido glutâmico ( $F = 5,92$ ;  $p = 0,023$ ), citrulina ( $F = 10,72$ ;  $p = 0,001$ ), glutamina ( $F = 8,15$ ;  $p = 0,009$ ), ornitina ( $F = 4,88$ ;  $p = 0,037$ ), prolina ( $F = 15,13$ ;  $p < 0,001$ ) e serina ( $F = 7,23$ ;  $p = 0,013$ ). Além disso, a melatonina demonstrou aumentar os níveis de glicina 3 horas após o exercício em comparação com o grupo controle no mesmo período ( $EM3 > Ex3$ ;  $p < 0,05$ ) e reduzir os níveis de metionina 24 horas após o exercício em comparação com o grupo controle no mesmo período ( $EM24 < Ex24$ ;  $p < 0,01$ ).

O efeito do tempo também impactou alguns aminoácidos, demonstrando uma redução nos níveis de aminoácidos como asparagina ( $F = 10,76$ ;  $p = 0,000$ ), ácido glutâmico ( $F = 4,27$ ;  $p = 0,026$ ), histidina ( $F = 9,72$ ;  $p = 0,001$ ), leucina ( $F = 8,71$ ;  $p = 0,001$ ), prolina ( $F = 5,07$ ;  $p = 0,015$ ), serina ( $F = 5,59$ ;  $p = 0,010$ ), triptofano ( $F = 11,71$ ;  $p = 0,000$ ), tirosina ( $F = 9,33$ ;  $p = 0,001$ ) e valina ( $F = 17,82$ ;  $p = 0,000$ ). A interação entre os efeitos ocorreu para glicina ( $F = 3,67$ ;  $p = 0,041$ ) e metionina ( $F = 9,88$ ;  $p = 0,001$ ). Esses resultados são apresentados na Figura 5. A Tabela 1 mostra os resultados sem efeitos significativos da melatonina ou do tempo.



**Figura 5.** Comparação dos níveis de aminoácidos no glúteo máximo em diferentes momentos. As barras pretas representam os animais tratados com controle, enquanto as barras roxas representam os animais tratados com melatonina. Os grupos de tempo são definidos da seguinte forma: 1 hora - animais eutanasiados 1 hora após o exercício; 3

horas - animais eutanasiados 3 horas após o exercício; 24 horas - animais eutanasiados 24 horas após o exercício. As barras vermelhas representam  $p < 0,05$  entre os grupos no mesmo tempo.

**Tabela 1:**

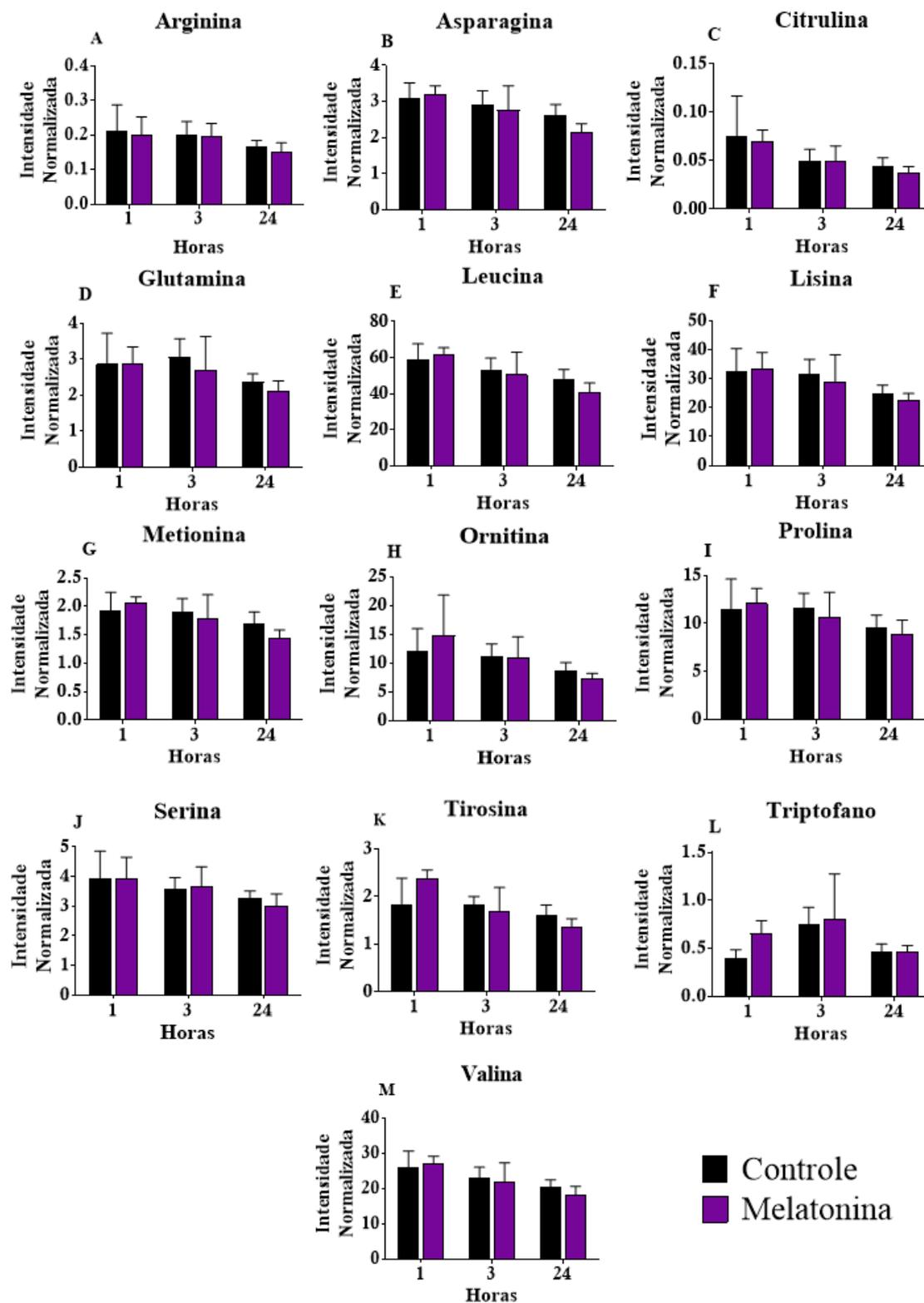
Resultados estatísticos dos aminoácidos do glúteo máximo que não apresentaram significância estatística para ANOVA e análise de Post hoc.

Aminoácidos	média ± desvio padrão da média						Efeito da Melatonina		Efeito do Tempo		Interações entre Efeitos	
	Ex1	Ex3	Ex24	EM1	EM3	EM24	F	p	F	p	F	p
<i>Alanina</i>	5,5 ±1,1	4,8 ±0,6	5,0 ±0,6	5,2 ±0,6	5,6 ±0,4	5,2 ±0,5	1,09	0,30	0,10	0,89	1,39	0,26
<i>Aspartato</i>	0,2± 0,02	0,2± 0,03	0,2± 0,03	1,0 ±0,1	0,8 ±0,1	0,2± 0,02	0,51	0,48	0,36	0,70	1,35	0,27
<i>Cisteína</i>	0,03± 0,004	0,03± 0,004	0,04± 0,005	0,04± 0,009	0,04 ±0,01	0,03± 0,003	2,10	0,16	0,07	0,92	1,99	0,15
<i>Fenilalanina</i>	2,3 ±0,4	2,0 ±0,3	2,1 ±0,4	2,4 ±0,2	2,3 ±0,2	2,0 ±0,2	0,65	0,42	1,43	0,25	0,97	0,39
<i>Lisina</i>	11,1 ±1,8	9,8± 1,8	9,7± 1,8	13,1 ±1,3	11,1 ±3,2	10,6 ±0,7	3,80	0,06	3,13	0,06	0,14	0,86

Ex1: Animais tratados com controle e eutanasiados 1 hora após o exercício. Ex3: Animais tratados com controle e eutanasiados 3 horas após o exercício. Ex24: Animais tratados com controle e eutanasiados 24 horas após o exercício. EM1: Animais tratados com melatonina e eutanasiados 1 hora após o exercício. EM3: Animais tratados com melatonina e eutanasiados 3 horas após o exercício. EM24: Animais tratados com melatonina e eutanasiados 24 horas após o exercício.

<sup>a</sup> Os dados são apresentados como média±S.

No fígado, não foi observado efeito da melatonina, entretanto, alguns aminoácidos apresentaram redução ao longo do tempo. Isso foi evidenciado pela diminuição dos níveis de arginina ( $F = 3,66$ ;  $p = 0,041$ ), asparagina ( $F = 9,62$ ;  $p = 0,001$ ), citrulina ( $F = 10,28$ ;  $p = 0,001$ ), glutamina ( $F = 4,43$ ;  $p = 0,023$ ), leucina ( $F = 11,53$ ;  $p = 0,000$ ), lisina ( $F = 7,30$ ;  $p = 0,003$ ), metionina ( $F = 7,85$ ;  $p = 0,002$ ), ornitina ( $F = 7,18$ ;  $p = 0,004$ ), prolina ( $F = 4,65$ ;  $p = 0,020$ ), serina ( $F = 4,70$ ;  $p = 0,019$ ), tirosina ( $F = 6,77$ ;  $p = 0,005$ ), triptofano ( $F = 11,76$ ;  $p = 0,001$ ) e valina ( $F = 11,76$ ;  $p = 0,000$ ). A interação entre os efeitos foi observada apenas para a tirosina ( $F = 3,71$ ;  $p = 0,039$ ). Esses resultados estão ilustrados na Figura 6. Não foram detectados efeitos da melatonina ou do tempo sobre determinados aminoácidos, conforme apresentado na Tabela 2.



**Figura 6.** Comparação dos níveis de aminoácidos no fígado em diferentes momentos. As barras pretas representam os animais tratados com a controle, enquanto as barras roxas representam os animais tratados com melatonina. Os grupos de tempo são definidos da seguinte forma: 1 hora - animais eutanasiados 1 hora após o exercício; 3 horas - animais

eutanasiados 3 horas após o exercício; 24 horas - animais eutanasiados 24 horas após o exercício.

**Tabela 2:**

Resultados estatísticos dos aminoácidos do fígado que não apresentaram significância estatística para ANOVA e análise de Post hoc.

Aminoácidos	média ± desvio padrão da média						Efeito da Melatonina		Efeito do Tempo		Interações entre Efeitos	
	Ex1	Ex3	Ex24	EM1	EM3	EM24	F	p	F	p	F	p
<i>Ácido</i>	2,2±	2,8±	1,8±	3,3	2,5	2,3±	3,68	0,06	3,15	0,06	3,28	0,05
<i>Glutâmico</i>	0,4	0,7	0,4	±0,3	±1,1	0,3						
<i>Alanina</i>	16,3	15,0	14,9	13,0	14,8	14,7	2,86	0,10	0,12	0,88	1,97	0,16
	±1,5	±1,7	±1,4	±3,3	±2,0	±2,4						
<i>Fenilalanina</i>	5,6	6,6	6,0	5,5	6,2	4,6	2,80	0,10	3,19	0,05	1,57	0,22
	±1,6	±0,8	±0,9	±0,5	±1,4	±0,4						
<i>Glicina</i>	2,8±	2,7±	2,5±	2,8±	2,7±	2,4±	0,10	0,75	1,81	0,18	0,00	0,99
	0,4	0,3	0,3	0,3	0,6	0,1						
<i>Histidina</i>	28,9	31,7±	31,0±	28,0	34,8	32,1	0,25	0,61	2,62	0,09	0,32	0,72
	±5,5	2,6	4,5	±5,6	±6,7	±3,4						

Ex1: Animais tratados com controle e eutanasiados 1 hora após o exercício. Ex3: Animais tratados com controle e eutanasiados 3 horas após o exercício. Ex24: Animais tratados com controle e eutanasiados 24 horas após o exercício. EM1: Animais tratados com melatonina e eutanasiados 1 hora após o exercício. EM3: Animais tratados com melatonina e eutanasiados 3 horas após o exercício. EM24: Animais tratados com melatonina e eutanasiados 24 horas após o exercício.

<sup>a</sup> Os dados são apresentados como média±S.

## Discussão

Os resultados primordiais desse estudo demonstraram uma mitigação da redução ao longo do tempo ou um aumento nos níveis de alguns aminoácidos no músculo esquelético, relacionados à resistência à fadiga, metabolismo energético e síntese proteica, em animais tratados com melatonina em comparação com os controles. No entanto, não houve influência da administração de melatonina no fígado.

Em experimentos que visam avaliar o impacto do exercício físico, a manipulação precisa do volume e da intensidade é um fator de grande importância (Smith et al., 2023). Neste estudo, adotou-se o exercício isocarga em tempo fixo, o qual foi realizado com êxito por todos os animais. A prescrição do exercício baseou-se na intensidade do esforço individual determinada por meio de teste incremental, ressaltando assim os cuidados metodológicos empregados. Outra questão relevante diz respeito à dosagem de aminoácidos. Para tal avaliação, métodos como a análise enzimática (Simpson et al., 1976), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Blum 2014) e bioensaio (Kameya and Asano 2017) são comumente utilizados, apesar de apresentarem limitações (Munjal et al., 2022). Atualmente, com os avanços tecnológicos, a análise de aminoácidos por espectrometria de massas permite a avaliação de uma ampla gama desses compostos em um único ensaio, proporcionando assim uma gama expandida de possibilidades (Khoramipour et al., 2022).

Em nosso estudo, observamos que a melatonina foi capaz de atenuar a queda ou aumentar os níveis teciduais de diversos aminoácidos no músculo esquelético exercitado (Figura 1), uma observação possível devido aos três momentos diferentes de análise. Tais aminoácidos desempenham uma ampla gama de funções fisiológicas, incluindo participação no metabolismo energético para prolina (Nogusa et al., 2014; Alvarez et al., 2022), aumento do desempenho para glicina (Kumar et al., 2021), serina (Tsuda et al., 2020), prolina (Nogusa et al., 2014), arginina (Sureda and Pons, 2012; Nyawose et al., 2022) e glutamina (Trivedi et al., 2022), atenuação da fadiga para serina (Tsuda et al., 2020), glutamina (Coqueiro et al., 2019), recuperação pós-exercício para glicina (Kumar et al., 2021), glutamina (Agostini and Biolo, 2010), ornitina (Mikulski et al., 2015), metionina (Huang et al., 2014) e síntese de proteínas e/ou substratos para glutamina (Gleeson, 2008), arginina (Sureda and Pons, 2012), prolina (Nogusa et al., 2014), glicina (Imenshahidi and Hossenzadeh, 2022), serina (Tsuda et al., 2020).

Considerando os papéis essenciais desses aminoácidos no contexto do exercício físico, podemos inferir que na presença da melatonina, observa-se um cenário favorável, propiciando uma condição fisiológica benéfica para o processo de recuperação e estabelecendo bases metabólicas otimizadas para esforços subsequentes. Não há evidências sobre os efeitos da melatonina no metabolismo de aminoácidos durante o exercício, sendo os estudos restritos ao contexto de doenças. Em contraste com nossos resultados, Junior et al. (2022) constataram que a melatonina reduziu a disponibilidade de aminoácidos plasmáticos em camundongos com câncer de mama, especialmente durante o período diurno. Esse efeito é considerado positivo nesse contexto, uma vez que a redução dessas moléculas durante o dia pode impactar o metabolismo das células cancerígenas. Além disso, a melatonina exerce uma influência significativa nos níveis séricos de aminoácidos em camundongos com colite (Liu et al., 2017). Vale ressaltar que o mecanismo subjacente ao aumento ou à redução na disponibilidade desses aminoácidos mediados pela melatonina ainda não é totalmente compreendido, indicando a necessidade de mais investigações para elucidar esse fenômeno.

Na Figura 1A, D, I e K, o E.S é elevado, indicando uma alta responsividade desses aminoácidos neste momento de análise (24h (2,24), 3h (2,06), 24h (E.S 2,99) e 24h (E.S 2,20), respectivamente). O nível de metionina (Fig. 1I) 24 horas após o esforço foi maior no grupo controle em comparação com o grupo tratado com melatonina. Swaminathan et al. (2021) afirmaram que a restrição de metionina em combinação com o treinamento de resistência pode melhorar o músculo esquelético e a saúde metabólica em camundongos idosos, mesmo em meio à obesidade. Portanto, a redução dos níveis de metionina poderia ser interpretada como um resultado positivo. Da mesma forma, na Figura 1D, o E.S dos níveis de citrulina é significativamente alto (E.S 2,06) 3 horas após o esforço.

Beck et al. (2015) identificaram um efeito ergogênico da administração aguda de melatonina em ratos noturnos, embora não tenham conseguido explicar completamente essa capacidade ergogênica por meio da avaliação de inflamação muscular ou marcadores de dano muscular no sangue, utilizando um modelo de exercício até a exaustão. Em estudos subsequentes realizados por Faria et al. (2021) e Faria et al. (2022), o efeito ergogênico foi corroborado, sugerindo que a melatonina aumentou a disponibilidade de substratos energéticos, influenciando o metabolismo de carboidratos e lipídios em animais noturnos tratados com este composto. Além disso, a melatonina acelerou a recuperação metabólica por meio de uma maior reposição de glicogênio tecidual e otimização do uso de lipídios após o exercício, através do aumento da translocação de

GLUT4 e FAT-CD36. Esses resultados foram cruciais para a compreensão do papel da melatonina na resposta ergogênica. O presente estudo demonstra que a melatonina também exerce influência sobre os níveis de diversos aminoácidos relevantes para o músculo esquelético exercitado, contribuindo, assim, para uma compreensão mais abrangente do efeito fisiológico da melatonina no metabolismo dos aminoácidos.

No presente estudo, adotamos a dosagem de melatonina de 10 mg.kg<sup>-1</sup>, em conformidade com a prática comum na literatura (Beck et al., 2015A); entretanto, outras dosagens poderiam ser submetidas a testes. Embora diferentes intensidades e durações de exercício possam induzir cenários fisiológicos diversos, nossa abordagem visou a individualização precisa das cargas de exercício para cada animal. Além disso, é crucial exercer cautela ao extrapolar para o modelo humano, uma vez que a melatonina geralmente não demonstra tal efeito ergogênico nesse contexto (Drummond et al., 2023; Faria et al., 2023).

### **Conclusão**

A melatonina exerce uma função proeminente no aumento dos aminoácidos relevantes para o músculo esquelético durante o período de recuperação pós-exercício, potencialmente influenciando o processo de regeneração local. No entanto, não foi observado nenhum efeito no fígado. Portanto, são necessárias investigações adicionais para elucidar as vias responsáveis por tais efeitos.

### **Referências**

- Agostini, F., & Biolo, G. (2010). Effect of physical activity on glutamine metabolism. In *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* (Vol. 13, Issue 1). <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328332f946>
- Ahmad, S. B., Ali, A., Bilal, M., Rashid, S. M., Wani, A. B., Bhat, R. R., & Rehman, M. U. (2023). Melatonin and Health: Insights of Melatonin Action, Biological Functions, and Associated Disorders. In *Cellular and Molecular Neurobiology* (Vol. 43, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/s10571-023-01324-w>
- Alvarez, M. E., Savouré, A., & Szabados, L. (2022). Proline metabolism as regulatory hub. In *Trends in Plant Science* (Vol. 27, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.07.009>
- Amaral, F. G. do, Andrade-Silva, J., Kuwabara, W. M. T., & Cipolla-Neto, J. (2019). New insights into the function of melatonin and its role in metabolic disturbances. In *Expert Review of Endocrinology and Metabolism* (Vol. 14, Issue 4). <https://doi.org/10.1080/17446651.2019.1631158>
- Beck, W. F., de Araujo, G. G., Menezes Scariot, P. P., Masselli dos Reis, I. G., & Gobatto, C. A. (2014). Time to exhaustion at anaerobic threshold in swimming rats: Metabolic investigation. *Bratislava Medical Journal*, 115(10). [https://doi.org/10.4149/BLL\\_2014\\_119](https://doi.org/10.4149/BLL_2014_119)

- Beck, W. R., Botezelli, J. D., Pauli, J. R., Ropelle, E. R., & Gobatto, C. A. (2015). Melatonin Has An Ergogenic Effect but Does Not Prevent Inflammation and Damage in Exhaustive Exercise. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep18065>
- Beck, W. R., Campesan, Y. S., & Gobatto, C. A. (2015). Validity and reliability of incremental test to determine the anaerobic threshold in swimming rats. *INTERNATIONAL JOURNAL OF APPLIED EXERCISE PHYSIOLOGY*, 4.
- Beck, W. R., Scariot, P. P. M., & Gobatto, C. A. (2015). Melatonin is an Ergogenic Aid for Exhaustive Aerobic Exercise only during the Wakefulness Period. *International Journal of Sports Medicine*, 37(1). <https://doi.org/10.1055/s-0035-1559698>
- Beck, W., & Gobatto, C. (2013). Effects of maximum intensity aerobic swimming exercise until exhaustion at different times of day on the hematological parameters in rats. *Acta Physiologica Hungarica*, 100(4). <https://doi.org/10.1556/APhysiol.100.2013.013>
- Bernat-Adell, M. D., Collado-Boira, E. J., Moles-Julio, P., Panizo-González, N., Martínez-Navarro, I., Hernando-Fuster, B., & Hernando-Domingo, C. (2021). Recovery of Inflammation, Cardiac, and Muscle Damage Biomarkers after Running a Marathon. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 35(3). <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000003167>
- Bhati, C., Minocha, N., Purohit, D., Kumar, S., Makhija, M., Saini, S., Kaushik, D., & Pandey, P. (2022). High Performance Liquid Chromatography: Recent Patents and Advancement. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 15(2). <https://doi.org/10.13005/bpj/2411>
- Brooks, G. A. (1987). Amino acid and protein metabolism during exercise and recovery. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 19(5). <https://doi.org/10.1249/00005768-198710001-00009>
- Claustrat, B., & Leston, J. (2015). Melatonin: Physiological effects in humans. In *Neurochirurgie* (Vol. 61, Issues 2–3). <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2015.03.002>
- Cohen, P. (1988). Are statistics necessary? In *Biological Psychiatry* (Vol. 23, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(88\)90100-X](https://doi.org/10.1016/0006-3223(88)90100-X)
- Coqueiro, A. Y., Rogero, M. M., & Tirapegui, J. (2019). Glutamine as an anti-fatigue amino acid in sports nutrition. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/nu11040863>
- Davila, C. (2015). American Veterinary Medical Association, 2020, AVMA Guidelines for Euthanasia of Animals. In *Nūbat Ramal al-Māya in Cultural Context*.
- Drummond, F. R., Drummond, L. R., Campos, H. O., Fernandes, J. G. R. P., da Costa Monteiro, M., Lara, H. F. G., de Almeida Mafra, T. C., Lavorato, V. N., Pereira, A. B., Leite, L. H. R., Poletini, M. de O., & Coimbra, C. C. (2024). Is melatonin as an ergogenic hormone a myth? a systematic review and meta-analysis. *Endocrine*, 83(2). <https://doi.org/10.1007/s12020-023-03498-1>
- Engel, P. C., & Jones, J. B. (1978). Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD<sup>+</sup> in alkaline hydrazine buffers: Improved

conditions for the assay of l-glutamate, l-lactate, and other metabolites. *Analytical Biochemistry*, 88(2). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90447-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90447-5)

Faria, V. S., Manchado-Gobatto, F. B., Scariot, P. P. M., Zagatto, A. M., & Beck, W. R. (2022). Melatonin Potentiates Exercise-Induced Increases in Skeletal Muscle PGC-1 $\alpha$  and Optimizes Glycogen Replenishment. *Frontiers in Physiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.803126>

Faria, V. S., Messias, L. H. D., Pejon, T. M. M., & Beck, W. R. (2024). Influence of Acute Melatonin Administration on Human Physical Performance: A Systematic Review. *Sports Health*, 16(1). <https://doi.org/10.1177/19417381231155142>

Faria, V. S., Pejon, T. M. M., Gobatto, C. A., de Araujo, G. G., Cornachione, A. S., & Beck, W. R. (2021). Acute melatonin administration improves exercise tolerance and the metabolic recovery after exhaustive effort. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97364-7>

Gleeson, M. (2008). Dosing and efficacy of glutamine supplementation in human exercise and sport training. *Journal of Nutrition*, 138(10). <https://doi.org/10.1093/jn/138.10.2045s>

Gomez-Cabrera, M. C., Carretero, A., Millan-Domingo, F., Garcia-Dominguez, E., Correias, A. G., Olaso-Gonzalez, G., & Viña, J. (2021). Redox-related biomarkers in physical exercise. *Redox Biology*, 42. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101956>

Gunata, M., Parlakpinar, H., & Acet, H. A. (2020). Melatonin: A review of its potential functions and effects on neurological diseases. In *Revue Neurologique* (Vol. 176, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.07.025>

Huang, T. H., Lewis, J. L., Lin, H. S., Kuo, L. T., Mao, S. W., Tai, Y. S., Chang, M. S., Ables, G. P., Perrone, C. E., & Yang, R. sen. (2014). A methionine-restricted diet and endurance exercise decrease bone mass and extrinsic strength but increase intrinsic strength in growing male rats. *Journal of Nutrition*, 144(5). <https://doi.org/10.3945/jn.113.187922>

Imenshahidi, M., & Hossenzadeh, H. (2022). Effects of glycine on metabolic syndrome components: a review. In *Journal of Endocrinological Investigation* (Vol. 45, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s40618-021-01720-3>

Jenni-Eiermann, S. (2017). Energy metabolism during endurance flight and the post-flight recovery phase. In *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* (Vol. 203, Issues 6–7). <https://doi.org/10.1007/s00359-017-1150-3>

Junior, R. P., Chuffa, L. G. de A., Simão, V. A., Sonehara, N. M., Chammas, R., Reiter, R. J., & Zuccari, D. A. P. de C. (2022). Melatonin Regulates the Daily Levels of Plasma Amino Acids, Acylcarnitines, Biogenic Amines, Sphingomyelins, and Hexoses in a Xenograft Model of Triple Negative Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16). <https://doi.org/10.3390/ijms23169105>

Kameya, M., & Asano, Y. (2017). Translation-dependent bioassay for amino acid quantification using auxotrophic microbes as biocatalysts of protein synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(6). <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8027-1>

- Keshav Trivedi, Sadique Hussain, & Chandan Mohapatra. (2022). Role of Glutamine as an Ergogenic Amino Acid during Fatigue. *Clinical Medical Reviews and Reports*, 4(2)-111(2690–8794).
- Khoramipour, K., Sandbakk, Ø., Keshteli, A. H., Gaeini, A. A., Wishart, D. S., & Chamari, K. (2022). Metabolomics in Exercise and Sports: A Systematic Review. In *Sports Medicine* (Vol. 52, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s40279-021-01582-y>
- Kuehnbaum, N. L., Gillen, J. B., Kormendi, A., Lam, K. P., Dibattista, A., Gibala, M. J., & Britz-Mckibbin, P. (2015). Multiplexed separations for biomarker discovery in metabolomics: Elucidating adaptive responses to exercise training. *Electrophoresis*, 36(18). <https://doi.org/10.1002/elps.201400604>
- Kumar, P., Liu, C., Hsu, J. W., Chacko, S., Minard, C., Jahoor, F., & Sekhar, R. v. (2021). Glycine and N-acetylcysteine (GlyNAC) supplementation in older adults improves glutathione deficiency, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, inflammation, insulin resistance, endothelial dysfunction, genotoxicity, muscle strength, and cognition: Results of a pilot clinical trial. *Clinical and Translational Medicine*, 11(3). <https://doi.org/10.1002/ctm2.372>
- Liu, G., Jiang, Q., Chen, S., Fang, J., Ren, W., Yin, J., Yao, K., & Yin, Y. (2017). Melatonin alters amino acid metabolism and inflammatory responses in colitis mice. *Amino Acids*, 49(12). <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2489-z>
- Markus, I., Constantini, K., Hoffman, J. R., Bartolomei, S., & Gepner, Y. (2021). Exercise-induced muscle damage: mechanism, assessment and nutritional factors to accelerate recovery. In *European Journal of Applied Physiology* (Vol. 121, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s00421-020-04566-4>
- Marseglia, L., D'Angelo, G., Manti, S., Rulli, I., Salvo, V., Buonocore, G., Reiter, R. J., & Gitto, E. (2017). Melatonin secretion is increased in children with severe traumatic brain injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5). <https://doi.org/10.3390/ijms18051053>
- Mikulski, T., Dabrowski, J., Hilgier, W., Ziemia, A., & Krzeminski, K. (2015). Effects of supplementation with branched chain amino acids and ornithine aspartate on plasma ammonia and central fatigue during exercise in healthy men. *Folia Neuropathologica*, 53(4). <https://doi.org/10.5114/fn.2015.56552>
- Moura, A. V., de Oliveira, D. C., Silva, A. A. R., da Rosa, J. R., Garcia, P. H. D., Sanches, P. H. G., Garza, K. Y., Mendes, F. M. M., Lambert, M., Gutierrez, J. M., Granado, N. M., dos Santos, A. C., de Lima, I. L., Negrini, L. D. de O., Antonio, M. A., Eberlin, M. N., Eberlin, L. S., & Porcari, A. M. (2022). Urine Metabolites Enable Fast Detection of COVID-19 Using Mass Spectrometry. *Metabolites*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/metabo12111056>
- Munjal, Y., Tonk, R. K., & Sharma, R. (2022). Analytical Techniques Used in Metabolomics: A Review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 13(5).
- Nogusa, Y., Mizugaki, A., Hirabayashi-Osada, Y., Furuta, C., Ohyama, K., Suzuki, K., & Kobayashi, H. (2014). Combined Supplementation of carbohydrate, alanine, and proline

is effective in maintaining blood glucose and increasing endurance performance during long-term exercise in mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 60(3). <https://doi.org/10.3177/jnsv.60.188>

Nyawose, S., Naidoo, R., Naumovski, N., & McKune, A. J. (2022). Dietary supplements and beverages: Knowledge, attitudes, and practices among semi-professional soccer players in KwaZulu-Natal, South Africa. *South African Journal of Sports Medicine*, 34(1). <https://doi.org/10.17159/2078-516X/2022/v34i1a14018>

Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M., & Qin, L. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. In *Journal of Pineal Research*. <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>

Reiter, R. J., Tan, D. X., & Lorena, F. B. (2010). Melatonin: A multitasking molecule. *Progress in Brain Research*, 181(C). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)81008-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81008-4)

Sarafian, M. H., Gaudin, M., Lewis, M. R., Martin, F. P., Holmes, E., Nicholson, J. K., & Dumas, M. E. (2014). Objective set of criteria for optimization of sample preparation procedures for ultra-high throughput untargeted blood plasma lipid profiling by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 86(12). <https://doi.org/10.1021/ac500317c>

Simpson, R. J., Neuberger, M. R., & Liu, T. Y. (1976). Complete amino acid analysis of proteins from a single hydrolysate. *Journal of Biological Chemistry*, 251(7). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)33637-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)33637-2)

Smith, J. A. B., Murach, K. A., Dyar, K. A., & Zierath, J. R. (2023). Exercise metabolism and adaptation in skeletal muscle. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 24, Issue 9). <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00606-x>

Solberg, E. E., Holen, A., Ekeberg, Ø., Østerud, B., Halvorsen, R., & Sandvik, L. (2004). The effects of long meditation on plasma melatonin and blood serotonin. *Medical Science Monitor*, 10(3).

Sureda, A., & Pons, A. (2013). Arginine and citrulline supplementation in sports and exercise: Ergogenic nutrients? *Medicine and Sport Science*, 59. <https://doi.org/10.1159/000341937>

Swaminathan, A., Fokin, A., Venckūnas, T., & Degens, H. (2021). Methionine restriction plus overload improves skeletal muscle and metabolic health in old mice on a high fat diet. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81037-6>

Tsuda, Y., Murakami, R., Yamaguchi, M., & Seki, T. (2020). Acute supplementation with an amino acid mixture suppressed the exercise-induced cortisol response in recreationally active healthy volunteers: A randomized, double-blinded, placebo-controlled crossover study. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12970-020-00369-2>

Xu, G., Hansen, J. S., Zhao, X. J., Chen, S., Hoene, M., Wang, X. L., Clemmesen, J. O., Secher, N. H., Häring, H. U., Pedersen, B. K., Lehmann, R., Weigert, C., & Plomgaard, P. (2016). Liver and muscle contribute differently to the plasma acylcarnitine pool during

fasting and exercise in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(12). <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1859>

## 5.2 Capítulo 2

### **A Administração de Melatonina na Dinâmica do Pool de Acilcarnitina Muscular e Hepática, Metabolismo Intermediário e Marcadores de Danos Teciduais Durante a Recuperação do Exercício Isocarga em Ratos**

Alinson Eduardo Cipriano, Alex Aparecido Rosini Silva, Andreia de Melo Porcari, Leonardo Henrique Dalcheco Messias, Wladimir Rafael Beck.

#### **Resumo**

Este estudo tem como objetivo elucidar o impacto da melatonina nos perfis metabólicos séricos e teciduais durante a fase de recuperação após exercício isocarga. Sessenta animais Wistar foram submetidos a exercício de natação de 60 minutos a 90% de sua capacidade aeróbia máxima (iMCA), seguido de administração intraperitoneal de melatonina (EM; 10 mg.kg<sup>-1</sup>) ou controle (Ex) de mesmo volume, e em seguida os animais foram eutanasiados 1, 3 ou 24 horas após tal procedimento, para coleta de sangue e tecidos. Foram utilizados ANOVA two-way, teste post-hoc de Newman-Keuls, tamanho do efeito (ES) e intervalo de confiança ( $p < 0,05$ ). Não foram encontrados resultados significativos para músculo esquelético e fígado para a dinâmica do pool de acilcarnitina. Nos níveis séricos, a melatonina reduziu os níveis de lactato desidrogenase ( $F = 24,03$ ;  $p = 0,000$ ) e glicose ( $F = 11,01$ ;  $p = 0,001$ ), enquanto creatina quinase ( $F = 2,44$ ;  $p = 0,124$ ) e triglicérides ( $F = 1,08$ ;  $p = 0,304$ ) permaneceu inalterado. A melatonina também aumentou o conteúdo de glicogênio para gastrocnêmio vermelho ( $F = 82,81$ ;  $p = 0,000$ ), glúteo máximo ( $F = 19,55$ ;  $p = 0,000$ ), fígado ( $F = 6,24$ ;  $p = 0,016$ ). e gastrocnêmio branco reduzido ( $F = 4,28$ ;  $p = 0,044$ ). Portanto, a melatonina reduziu o conteúdo de triglicérides teciduais para gastrocnêmio branco ( $F = 20,79$ ;  $p = 0,000$ ), gastrocnêmio vermelho ( $F = 8,76$ ;  $p = 0,005$ ) e glúteo máximo ( $F = 4,90$ ;  $p = 0,032$ ), enquanto aumentou o sóleo ( $F = 6,00$ ;  $p = 0,019$ ), sem efeito para o fígado ( $F = 3,44$ ;  $p = 0,070$ ). Em conclusão, nosso estudo revelou que a melatonina não teve efeito sobre o pool de acilcarnitina hepática ou muscular pós-exercício isocarga. No entanto, melhorou eficientemente a utilização de lipídios, preservou os estoques de glicogênio e minimizou os danos aos tecidos.

**Palavras-chave:** Exercício de Recuperação, Melatonina, Acilcarnitinas, Metabolismo, Dano Tecidual, Fisiologia do Exercício

#### **Introdução**

A melatonina, uma indolamina anfifílica (Amaral et al., 2019), é produzida principalmente pela glândula pineal e desempenha um papel fundamental na regulação

dos ritmos circadianos e sazonais (Reiter et al., 2016). Atravessa as membranas plasmáticas celulares e a barreira hematoencefálica (Marseglia et al., 2017), exercendo ação endócrina por circular livremente no plasma ou ligar-se à albumina. Além de regular as funções cronobiológicas e o ciclo sono/vigília, a melatonina também apresenta efeitos antioxidantes (Reiter et al., 2016), imunomoduladores e antiinflamatórios, contribuindo para a integridade da membrana celular (Ahmad et al., 2023).

Estudos demonstraram os efeitos de melhoria do desempenho da ingestão imediata de melatonina durante a vigília em exercícios de resistência até a exaustão na máxima capacidade aeróbia individualizada (iMCA) no metabolismo energético (Beck et al., 2015A; Beck et al., 2016; Faria et al., 2021). Além disso, a melatonina aumenta a oxidação da gordura, preserva o glicogênio e acelera a reposição de glicogênio pós-exercício (Faria et al 2021; Faria et al., 2022). No entanto, os estudos têm-se limitado a avaliar cenários nas primeiras 3 horas pós-exercício, sublinhando assim a necessidade de avaliar o processo de recuperação metabólica ao longo de períodos prolongados, como 24 horas, um período típico entre sessões consecutivas de treino.

O processo de recuperação após o exercício físico abrange uma interação complexa de fatores fisiológicos, incluindo homeostase redox, reparação do tecido muscular, modulação inflamatória e metabolismo energético (Peake 2019), com particular ênfase nos tecidos do fígado e do músculo esquelético (Xu et al., 2016).

Os efeitos da melatonina no metabolismo de carboidratos e lipídios pós-exercício, incluindo sua influência regulatória sobre GLUT4 e FAT/CD36, foram observados em modelo animal (Faria et al 2021). No entanto, o seu impacto potencial no conjunto de acilcarnitina permanece inexplorado. As acilcarnitinas, intermediários lipídicos essenciais, têm sido implicadas nas cascatas de sinalização intracelular e na regulação metabólica (Li et al., 2019). Seu acúmulo aberrante nos tecidos musculares hepáticos e esqueléticos frequentemente acompanha estados inflamatórios crônicos e desregulações metabólicas (Kriisa et al., 2017), significando potenciais perturbações no metabolismo mitocondrial (Kankuri et al., 2023). A análise metabolômica é um método crucial para avaliar o pool de acilcarnitina, permitindo a identificação e quantificação simultânea de vários metabólitos, incluindo acilcarnitinas, em amostras biológicas (Miller et al., 2021). Além disso, a metabolômica exibe uma capacidade notável para detectar alterações sutis no perfil metabólico que podem escapar à detecção por técnicas analíticas convencionais (Alseekh et al., 2021). Além disso, avaliar o dano tecidual monitorando o extravasamento de enzimas intracelulares representa um alvo terapêutico promissor para a melatonina.

Considerando que biomarcadores específicos atingem os seus picos de concentração em momentos diferentes, é crucial avaliar os efeitos da melatonina durante períodos prolongados e variados. Reconhecendo que as investigações anteriores se concentraram predominantemente em exercícios sem isolada, o que pode não refletir rotinas de treinamento típicas, é necessário explorar os efeitos da melatonina após um exercício com isolada. Além disso, uma avaliação abrangente dos parâmetros metabólicos em vários intervalos temporais é necessária para fornecer uma compreensão abrangente.

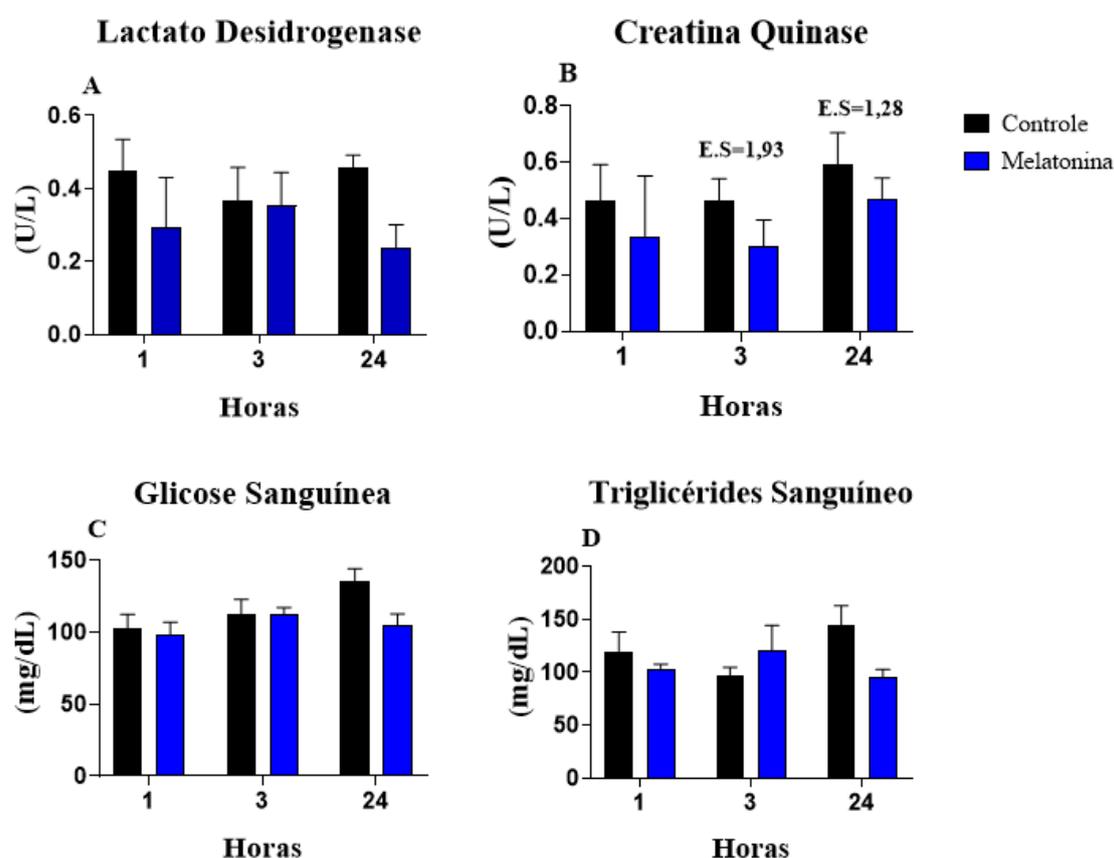
Assim, este estudo visa elucidar o impacto da melatonina nos perfis metabólicos séricos e teciduais durante a fase de recuperação após exercício isocarga, com o objetivo geral de delinear seu potencial terapêutico na recuperação pós-esforço. Nossa hipótese é que a melatonina diminuirá o pool de acilcarnitinas, otimizará a utilização de lipídios musculares e preservará os estoques de glicogênio, reduzirá os níveis séricos de glicose e

lipídios e diminuirá o dano tecidual, melhorando assim o cenário fisiológico para esforços futuros.

## Resultados

Todos os animais completaram o exercício incremental de natação com duração do teste, intensidades e concentração de lactato sanguíneo correspondentes a  $48,25 \pm 27$  minutos,  $5,1 \pm 0,4\%$  mc e  $4,7 \pm 0,6$  mmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Todos os animais completaram o exercício de endurance proposto.

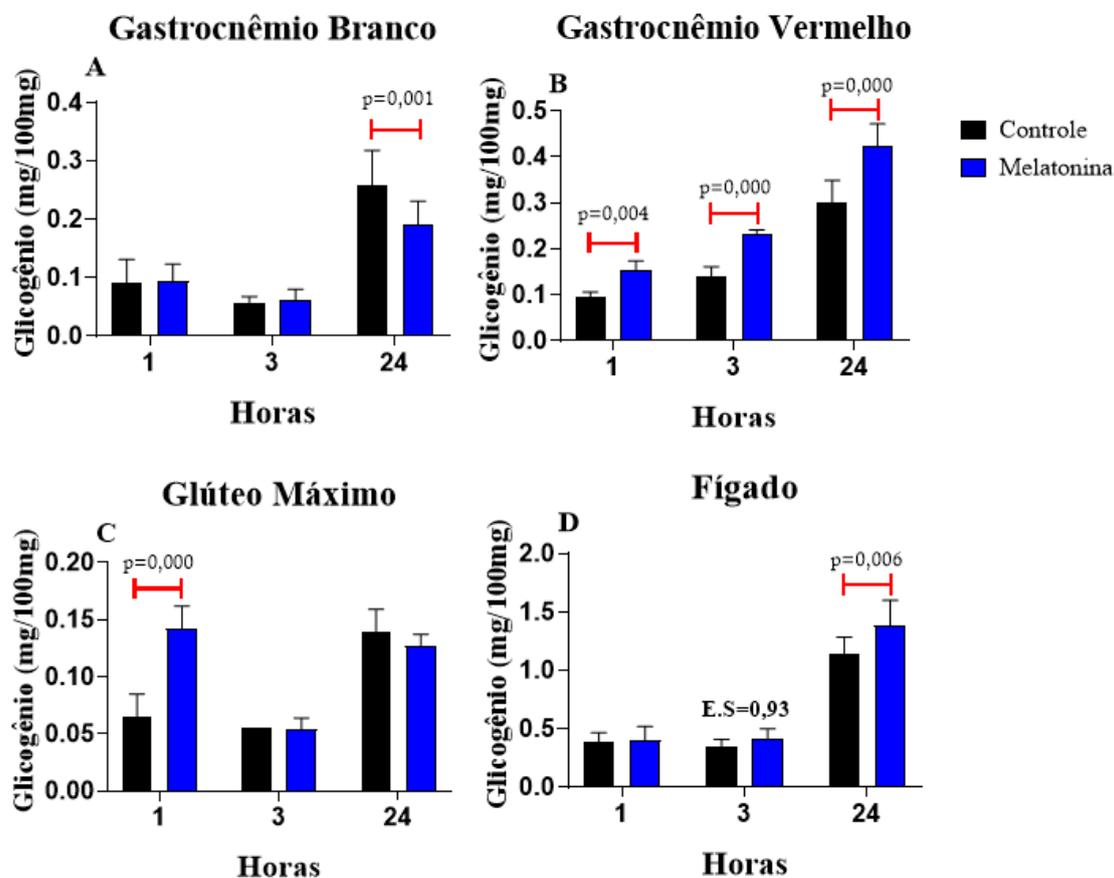
Os resultados dos parâmetros séricos são mostrados na figura 7. A melatonina causou redução nos níveis de lactato desidrogenase ( $F = 24,03$ ;  $p = 0,000$ ) e glicose ( $F = 11,01$ ;  $p = 0,001$ ), enquanto a creatina quinase ( $F = 2,44$ ;  $p = 0,124$ ) e triglicérides ( $F = 1,08$ ;  $p = 0,304$ ) permaneceram inalterados. Notavelmente, a creatina quinase, a glicose e os triglicérides atingiram seus picos 24 horas após o esforço.



**Figura 7:** Comparação dos parâmetros séricos nos diferentes momentos (A) Lactato Desidrogenase, (B) Creatina Quinase, (C) Glicemia e (D) Triglicérides Sanguíneos. Pretos são animais tratados com controle. Azuis são animais tratados com melatonina. 1 hora: animais que foram eutanasiados 1 hora após o exercício. 3 horas: animais que foram eutanasiados 3 horas após o exercício. 24 horas: animais que foram eutanasiados 24 horas após o exercício. E.S: Tamanho do Efeito.

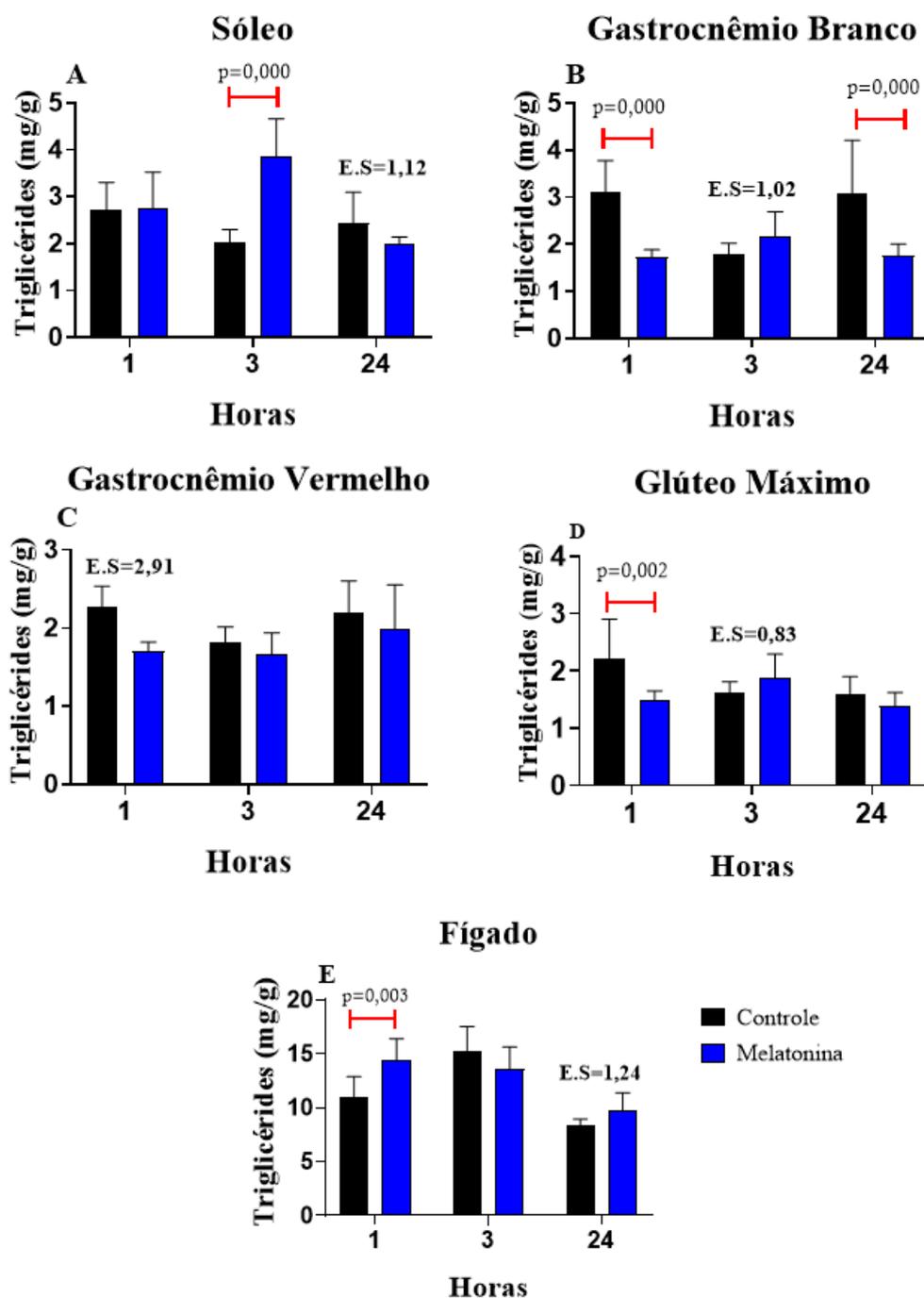
Os dados de glicogênio estão apresentados na figura 8. A melatonina apresentou aumento significativo para gastrocnêmio vermelho ( $F = 82,81$ ;  $p = 0,000$ ), glúteo máximo ( $F = 19,55$ ;  $p = 0,000$ ) e fígado ( $F = 6,24$ ;  $p = 0,016$ ). Por outro lado, resultou em redução do gastrocnêmio branco ( $F = 4,28$ ;  $p = 0,044$ ). Houve um efeito notável do tempo no

conteúdo de glicogênio, com aumento observado no gastrocnêmio branco ( $F = 78,96$ ;  $p = 0,000$ ), gastrocnêmio vermelho ( $F = 215,38$ ;  $p = 0,000$ ), glúteo máximo ( $88,80$ ;  $p = 0,000$ ) e fígado ( $F = 322,69$ ;  $p = 0,000$ ).



**Figura 8:** Conteúdo de glicogênio nos músculos, fígado e coração. Os gráficos representam as médias e desvios-padrão do conteúdo de glicogênio na porção branca (A) e vermelha (B) do gastrocnêmio, glúteo máximo (C) e fígado (D) em diferentes momentos. Pretos são animais tratados com controle. Azul são animais tratados com melatonina. 1 hora: animais que foram eutanasiados 1 hora após o exercício. 3 horas: animais que foram eutanasiados 3 horas após o exercício. 24 horas: animais que foram eutanasiados 24 horas após o exercício. As barras vermelhas representam  $p < 0,05$  entre os grupos no mesmo tempo. E.S: Tamanho do Efeito.

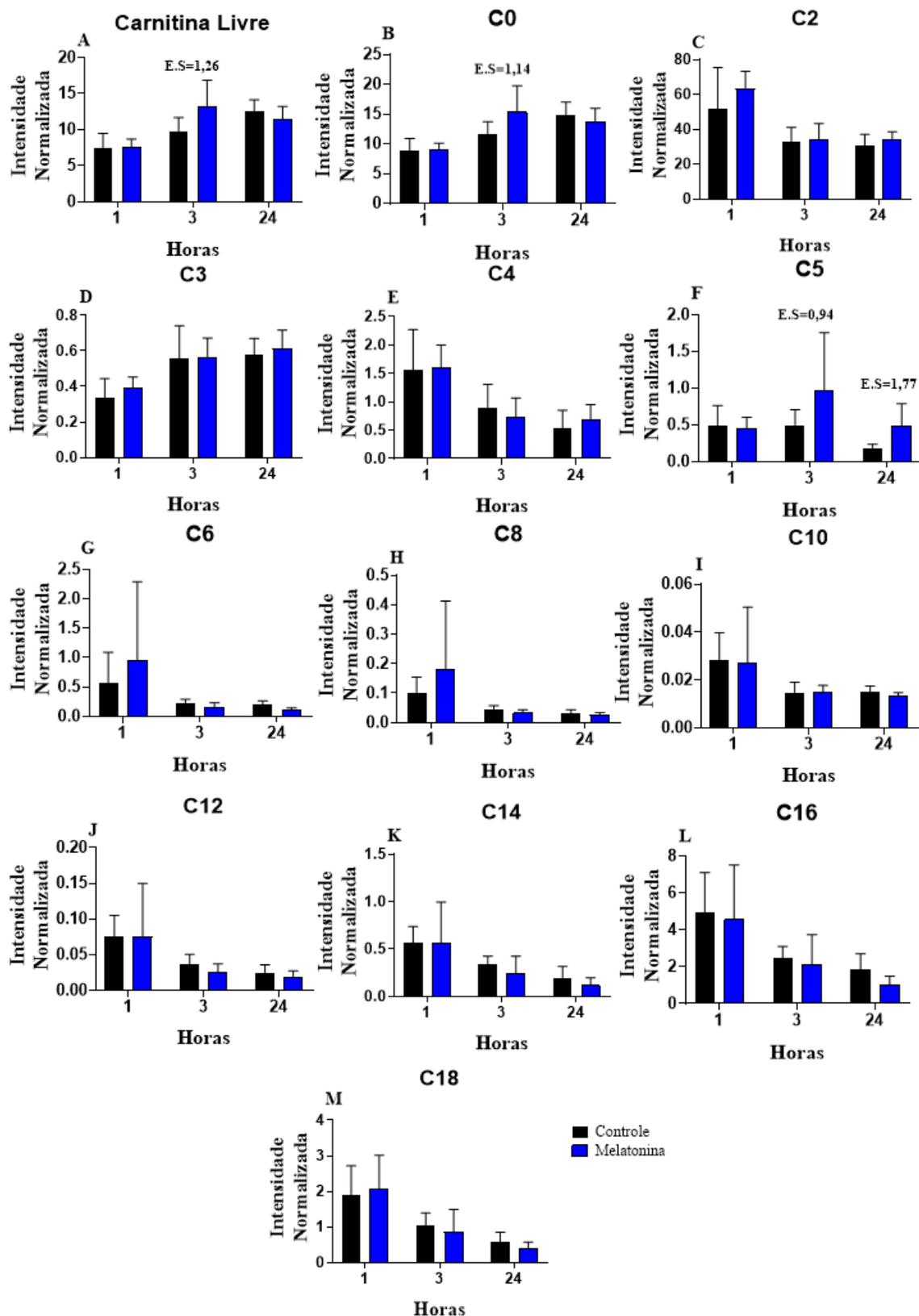
Os dados de triglicerídeos teciduais são exibidos na figura 9. A melatonina provocou uma redução significativa no gastrocnêmio branco ( $F = 20,79$ ;  $p = 0,000$ ), gastrocnêmio vermelho ( $F = 8,76$ ;  $p = 0,005$ ) e glúteo máximo ( $F = 4,90$ ;  $p = 0,032$ ), ao mesmo tempo que demonstra aumento do sóleo ( $F = 6,00$ ;  $p = 0,019$ ), sem efeito para o fígado ( $F = 3,44$ ;  $p = 0,070$ ). Além disso, foi evidente um efeito significativo do tempo no conteúdo de triglicerídeos teciduais, com aumento para gastrocnêmio vermelho ( $F = 3,96$ ;  $p = 0,027$ ) e diminuição para sóleo ( $F = 6,41$ ;  $p = 0,010$ ), glúteo máximo ( $F = 4,21$ ;  $p = 0,021$ ), fígado ( $F = 34,75$ ;  $p = 0,000$ ).



**Figura 9:** Conteúdo de triglicerídeos nos músculos e no fígado. Os gráficos representam as médias e desvio padrão do conteúdo de triglicerídeos no músculo sóleo (A), gastrocnêmio branco (B) e vermelho (C), glúteo máximo (D) e fígado (E) em diferentes momentos. Pretos são animais tratados com controle. Azul são animais tratados com melatonina. 1 hora: animais que foram eutanasiados 1 hora após o exercício. 3 horas: animais que foram eutanasiados 3 horas após o exercício. 24 horas: animais que foram eutanasiados 24 horas após o exercício. As barras vermelhas representam  $p < 0,05$  entre os grupos no mesmo tempo. E.S: Tamanho do Efeito.

Em referência ao conjunto de acilcarnitina muscular, os dados são apresentados na figura 10. A administração de melatonina não produziu impacto significativo. No

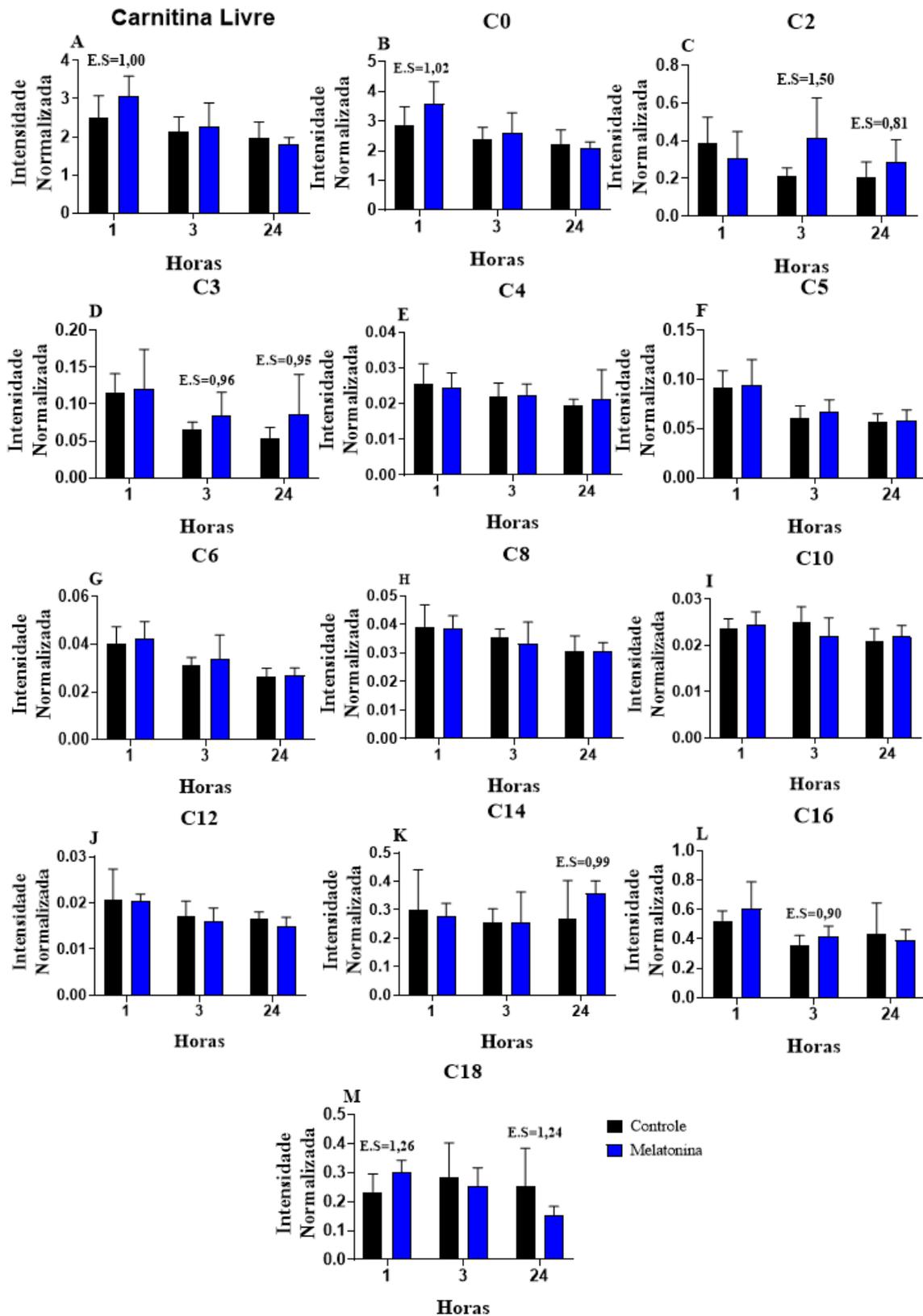
entanto, um efeito de tempo discernível foi observado em várias acilcarnitinas, mais precisamente C2 ( $F = 13,66$ ;  $p = 0,000$ ), C4 ( $F = 13,49$ ;  $p = 0,000$ ), C8 ( $F = 3,97$ ;  $p = 0,032$ ), C10 ( $F = 5,11$ ;  $p = 0,014$ ), C12 ( $F = 6,73$ ;  $p = 0,004$ ), C14 ( $F = 9,21$ ;  $p = 0,001$ ), C16 ( $F = 10,43$ ;  $p = 0,000$ ), e C18 ( $F = 16,16$ ;  $p = 0,000$ ), todos exibindo uma tendência decrescente ao longo do tempo. Por outro lado, carnitina livre ( $F = 12,84$ ;  $p = 0,000$ ); C0 ( $F = 13,05$ ;  $p = 0,000$ ) e C3 ( $F = 11,70$ ;  $p = 0,000$ ) aumentaram com o tempo.



**Figura 10:** Perfil de acilcarnitina no Glúteo Máximo. Os gráficos representam as médias e desvios-padrão do pool de acilcarnitina de Carnitina Livre (A), C0 (B), C2 (C), C3 (D), C4 (E), C5 (F), C6 (G), C8 (H), C10 (I), C12 (J), C14 (K), C16 (L) e C18 (M) em diferentes momentos. Pretos são animais tratados com controle. Azul são animais tratados com melatonina. 1 hora: animais que foram eutanasiados 1 hora após o exercício. 3 horas:

animais que foram eutanasiados 3 horas após o exercício. 24 horas: animais que foram eutanasiados 24 horas após o exercício. E.S: Tamanho do Efeito.

O pool de acilcarnitina hepática é exibido na figura 15. Apesar de não haver efeito da melatonina, o tempo reduziu a carnitina livre ( $F = 8,77$ ;  $p = 0,001$ ), C0 ( $F = 9,60$ ;  $p = 0,000$ ), C3 ( $F = 5,48$ ;  $p = 0,010$ ), C5 ( $F = 14,49$ ;  $p = 0,000$ ), C6 ( $F = 13,61$ ,  $p = 0,000$ ), C8 ( $F = 5,52$ ;  $p = 0,010$ ), C12 ( $F = 5,19$ ;  $p = 0,013$ ) e C16 ( $F = 5,67$ ;  $p = 0,009$ ).



**Figura 11:** Perfil de acilcarnitina no fígado. Os gráficos representam as médias e desvios-padrão do pool de acilcarnitina de Carnitina Livre (A), C0 (B), C2 (C), C3 (D), C4 (E), C5 (F), C6 (G), C8 (H), C10 (I), C12 (J), C14 (K), C16 (L) e C18 (M) em diferentes momentos. Pretos são animais tratados com controle. Azul são animais tratados com melatonina. 1 hora: animais que foram eutanasiados 1 hora após o exercício. 3 horas:

animais que foram eutanasiados 3 horas após o exercício. 24 horas: animais que foram eutanasiados 24 horas após o exercício. E.S: Tamanho do Efeito.

## Discussão

Este estudo é o primeiro a investigar o impacto agudo da administração de melatonina no metabolismo energético em ratos após uma sessão individualizada de exercícios de isocarga em intensidade correspondente a capacidade aeróbia máxima.

Apesar da ausência de diminuição do pool intramuscular de acilcarnitina, a melatonina induziu alterações metabólicas e nos marcadores de dano muscular, refletindo na diminuição dos níveis de glicose e LDH, otimização no uso de lipídios e aumento na reposição de glicogênio, o que corroborou parcialmente nossa hipótese.

Contrariamente às nossas expectativas, a melatonina não conseguiu exercer qualquer influência discernível nos reservatórios de acilcarnitina nos tecidos musculares e hepáticos. Apesar de investigações anteriores sobre os efeitos da melatonina no metabolismo e no estresse oxidativo, pesquisas abrangentes sobre os níveis de acilcarnitina permanecem limitadas (Cipolla Neto 2018; Reiter et al., 2022). Em um modelo de xenoinxerto de camundongo com câncer de mama triplo negativo (BC) submetido ao tratamento com melatonina, foi observada uma redução em 12 moléculas em animais afetados por BC em comparação com seus respectivos controles (Junior et al., 2022). Divergindo das observações feitas por Junior et al. 2022, nosso estudo não detectou diminuição nos níveis de acilcarnitina. Contudo, é fundamental ressaltar que o estudo de Junior et al. (2022) utilizaram um modelo de câncer sem exposição ao exercício físico, complicando as comparações diretas. As evidências mostram que os níveis de acilcarnitina podem variar em resposta ao tipo, intensidade e duração do exercício físico. Nosso estudo priorizou exercícios isocarga; portanto, outros modelos de formação seriam necessários para contribuir para a amplitude das evidências (Pataky et al., 2024). Uma redução nestes níveis, se observada, poderia ter implicado uma otimização na utilização lipídica, potencialmente levando a uma melhor recuperação metabólica, no entanto, avaliamos apenas os momentos 1, 3 e 24 horas pós-exercício. Explorar intervalos de tempo adicionais poderia revelar outras distinções. Gopalan et al. (2016) tiveram como objetivo avaliar os impactos relativos de regimes de exercícios variados (corrida em esteira uma ou duas vezes ao dia (EX1), (EX2) e restrição calórica (redução de 15% (CR1) e 30% (CR2) de calorias) no acúmulo de acilcarnitinas de cadeia longa em ratos Fischer F344 obesos induzidos por dieta, em contraste com controles sedentários (CON), durante um período de 4 semanas. No entanto, os níveis de acilcarnitina de cadeia longa no fígado e nos músculos foram elevados em todas as coortes de intervenção, exceto CR2. Notavelmente, este estudo examinou exclusivamente acilcarnitinas de cadeia longa e envolveu exercício crônico, tornando as comparações diretas um desafio.

A melatonina reduziu efetivamente o conteúdo de triglicérides nos tecidos em vários grupos musculares esqueléticos, consistente com estudos anteriores (Faria et al., 2022). Tais autores atribuíram a redução ao aumento da expressão de FAT CD36, proteína chave envolvida no metabolismo lipídico. Agil et al. (2011) conduziram um estudo em que a melatonina foi administrada por via oral a ratos machos jovens gordurosos diabéticos Zucker (ZDF) durante 6 semanas. Esta intervenção resultou numa redução significativa de 13,5% nos níveis séricos de ácidos graxos livres. É importante ressaltar que, diferentemente do nosso estudo, o exercício não foi incluído no protocolo experimental. Mendes e cols. (2013) examinaram o treinamento em esteira (20 m.min<sup>-1</sup>,

5 dias semana-1, 16 semanas) e tratado com melatonina ( $10 \text{ mg.kg.dia}^{-1}$ , 8 semanas) em ratos Wistar, observando maior eficiência do metabolismo energético, caracterizada pela diminuição do peso corporal e aumento da sensibilidade à insulina. No entanto, é crucial reconhecer que o regime de exercícios no nosso estudo foi agudo. Isto ilustra o papel da melatonina na redução dos níveis séricos de triglicerídeos, provavelmente aumentando a transferência de triglicerídeos da circulação para os músculos esqueléticos para oxidação.

Em relação aos níveis de glicose, a melatonina causou notável redução em seus níveis apenas 24 horas pós-exercício ( $p = 0,000$ ). O envolvimento da melatonina na homeostase da glicose está amplamente documentado, pois aumenta a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (Albreiki et al., 2021), levando conseqüentemente à diminuição dos níveis circulantes. O declínio nos níveis circulantes sugere uma utilização crescente de glicose pelos tecidos, elucidando assim a maior reposição das reservas de glicogênio (Jensen et al., 2011). Um aumento substancial na captação muscular de glicose é indispensável para atender às demandas energéticas durante a recuperação pós-exercício de resistência (Wende et al., 2007). Este fenômeno é facilitado pela difusão facilitada, orquestrada pela translocação do transportador de glicose GLUT4 para o sarcolema e tubos transversos (Richter 2020). Embora o presente estudo não tenha avaliado a expressão do GLUT4, os insights de Faria et al. (2022) sugerem que em tecidos de ratos tratados com melatonina e expostos ao exercício, a expressão aumentada de GLUT4 correspondeu a uma maior reposição dos estoques de glicogênio nesses tecidos.

O glicogênio é vital para o desempenho do exercício, especialmente em atividades prolongadas e de alta intensidade (Bergstrom et al. 1967). Estudos demonstraram sua depleção após exercícios de natação em ratos, principalmente em músculos como o glúteo máximo (Beck et al., 2013). A rápida reposição de glicogênio é crucial para preparar os músculos para atividades subsequentes (Wende et al., 2007). Após o exercício, a administração de melatonina produziu aumentos significativos no conteúdo de glicogênio no gastrocnêmio vermelho ( $p = 0,000$ ), glúteo máximo ( $p = 0,000$ ) e fígado ( $p = 0,016$ ), promovendo supercompensação no gastrocnêmio vermelho ( $p = 0,000$ ). Estes resultados sugerem que a melatonina acelera a restauração de substratos energéticos, aumentando potencialmente as reservas de glicogênio, conforme documentado por Mazepa et al. (2000). Esses resultados corroboram os achados elucidados por Mendes et al. (2013), delineando uma regulação positiva em PI3K, GLUT4 e armazenamento de glicogênio no músculo esquelético de ratos submetidos a treinamento em esteira. Curiosamente, os resultados parecem ser dependentes do tecido, uma vez que o gastrocnêmio branco exibiu conteúdo reduzido de glicogênio 24 horas pós-exercício no grupo da melatonina.

No contexto da recuperação pós-exercício, o dano muscular emerge como um fator determinante (Mielgo-Ayuso e Fernández-Lázaro, 2021). A melatonina demonstrou redução seletiva nos níveis de LDH, enquanto a CK permaneceu inalterada entre os grupos experimentais. Vários estudos propõem vários mecanismos pelos quais a melatonina poderia potencialmente influenciar os marcadores relacionados ao dano muscular induzido pelo exercício (Rahman e yang 2023; Stacchiotti et al., 2020; Cheikh et al., 2019). Esses mecanismos envolvem a redução do dano muscular por meio de propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, regulando a resposta inflamatória ao impactar citocinas e quimiocinas, protegendo contra a apoptose celular e melhorando a função mitocondrial por meio da promoção da biogênese e da preservação da integridade (Muñoz-Jurado et al., 2022). Na literatura, existem discrepâncias quanto à dinâmica da concentração de lactato desidrogenase após o exercício (Fridén et al., 1989). Diferentes

estudos relataram picos de LDH ocorrendo em vários momentos pós-exercício (Overgaard et al., 2004). Além disso, o momento da coleta da amostra pós-exercício impacta significativamente os resultados da CK e da LDH. Nosso estudo descobriu que os níveis de CK permaneceram inalterados sob a influência da melatonina, enquanto os níveis de LDH variaram em diferentes momentos pós-exercício. Dada a natureza isocarga do exercício em nosso estudo, é crucial explorar marcadores e pontos de tempos adicionais para compreender completamente sua sensibilidade temporal. Além disso, a recuperação melhorada pós-exercício, caracterizada pelo aumento das reservas de glicogênio e pela utilização otimizada dos lipídios, está associada à redução dos danos nos tecidos e à fuga de biomarcadores (Nédélec et al., 2013).

Embora seja pioneiro no foco nos efeitos da melatonina na recuperação pós-exercício isocarga, o estudo tem limitações. Investigar dosagens mais elevadas de melatonina é necessário para compreender seus efeitos em parâmetros como o pool de acilcarnitinas, que permaneceu inalterado. Além disso, a exploração de vias moleculares que regem o metabolismo intermediário e marcadores de danos teciduais forneceria informações valiosas. Apesar disso, este estudo utilizou um exercício de isocarga com intensidade determinada individualmente, realizado com sucesso por todos os animais, destacando a robustez do método. Em experiências que avaliam o impacto do exercício físico, o controle preciso do volume e da intensidade é crucial (Smith et al., 2023). Estas descobertas enfatizam a necessidade de mais pesquisas para aprofundar nossa compreensão nesta área crítica.

## Conclusão

Nossa pesquisa conclui que a administração de melatonina não induziu modificações discerníveis no pool de acilcarnitina em tecidos hepáticos ou musculares após a realização de exercícios isocarga. Contudo, demonstrou-se eficaz na otimização da utilização de lipídios, na preservação dos estoques de glicogênio e na mitigação do dano tecidual associado. Estes achados realçam a promissora eficácia terapêutica da melatonina, especialmente no que diz respeito à melhoria bioenergética.

## Referências

- Agil, A., Rosado, I., Ruiz, R., Figueroa, A., Zen, N., & Fernández-Vázquez, G. (2012). Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Pineal Research*, *52*(2), 203–210. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00928.x>
- Ahmad, S. B., Ali, A., Bilal, M., Rashid, S. M., Wani, A. B., Bhat, R. R., & Rehman, M. U. (2023). Melatonin and Health: Insights of Melatonin Action, Biological Functions, and Associated Disorders. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *43*(6), 2437–2458. <https://doi.org/10.1007/s10571-023-01324-w>
- Albreiki, M. S., Middleton, B., & Hampton, S. M. (2021). The effect of melatonin on glucose tolerance, insulin sensitivity and lipid profiles after a late evening meal in healthy young males. *Journal of Pineal Research*, *71*(4). <https://doi.org/10.1111/jpi.12770>
- Alseekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y., Contrepolis, K., D'Auria, J., Ewald, J., C. Ewald, J., Fraser, P. D., Giavalisco, P., Hall, R. D., Heinemann, M., Link, H., Luo, J., Neumann, S., Nielsen, J., Perez de Souza, L., Saito, K., Sauer, U., Schroeder, F. C., ... Fernie, A. R. (2021). Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification

- and best reporting practices. *Nature Methods*, 18(7), 747–756. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01197-1>
- Amaral, F. G. do, Andrade-Silva, J., Kuwabara, W. M. T., & Cipolla-Neto, J. (2019). New insights into the function of melatonin and its role in metabolic disturbances. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 14(4), 293–300. <https://doi.org/10.1080/17446651.2019.1631158>
- Beck, W. F., De, G. G., Menezes Scariot, P. P., Masselli dos Reis, I. G., & Gobatto, C. A. (2014). Time to exhaustion at anaerobic threshold in swimming rats: metabolic investigation. *Bratislava Medical Journal*, 115(10), 617–621. [https://doi.org/10.4149/BLL\\_2014\\_119](https://doi.org/10.4149/BLL_2014_119)
- Beck, W. R., Botezelli, J. D., Pauli, J. R., Ropelle, E. R., & Gobatto, C. A. (2015). Melatonin Has An Ergogenic Effect But Does Not Prevent Inflammation and Damage In Exhaustive Exercise. *Scientific Reports*, 5(1), 18065. <https://doi.org/10.1038/srep18065>
- Beck, W., & Gobatto, C. (2013). Effects of maximum intensity aerobic swimming exercise until exhaustion at different times of day on the hematological parameters in rats. *Acta Physiologica Hungarica*, 100(4), 427–434. <https://doi.org/10.1556/APhysiol.100.2013.013>
- Beck, W., Scariot, P., & Gobatto, C. (2015). Melatonin is an Ergogenic Aid for Exhaustive Aerobic Exercise only during the Wakefulness Period. *International Journal of Sports Medicine*, 37(01), 71–76. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1559698>
- Bergström, J., Hermansen, L., Hultman, E., & Saltin, B. (1967). Diet, Muscle Glycogen and Physical Performance. *Acta Physiologica Scandinavica*, 71(2–3), 140–150. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1967.tb03720.x>
- Cheikh, M., Makhlof, K., Ghattassi, K., Graja, A., Ferchichi, S., Kallel, C., Houda, M., Souissi, N., & Hammouda, O. (2020). Melatonin ingestion after exhaustive late-evening exercise attenuate muscle damage, oxidative stress, and inflammation during intense short term effort in the following day in teenage athletes. *Chronobiology International*, 37(2), 236–247. <https://doi.org/10.1080/07420528.2019.1692348>
- Cipolla-Neto, J., & Amaral, F. G. do. (2018). Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocrine Reviews*, 39(6), 990–1028. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00084>
- DuBois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, Fred. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Engel, P. C., & Jones, J. B. (1978). Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD<sup>+</sup> in alkaline hydrazine buffers: Improved conditions for the assay of l-glutamate, l-lactate, and other metabolites. *Analytical Biochemistry*, 88(2), 475–484. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90447-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90447-5)
- Faria, V. S., Machado-Gobatto, F. B., Scariot, P. P. M., Zagatto, A. M., & Beck, W. R. (2022). Melatonin Potentiates Exercise-Induced Increases in Skeletal Muscle PGC-1 $\alpha$  and Optimizes Glycogen Replenishment. *Frontiers in Physiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.803126>

- Faria, V. S., Pejon, T. M. M., Gobatto, C. A., de Araujo, G. G., Cornachione, A. S., & Beck, W. R. (2021). Acute melatonin administration improves exercise tolerance and the metabolic recovery after exhaustive effort. *Scientific Reports*, *11*(1), 19228. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97364-7>
- Fridén, J., Sfakianos, P. N., & Hargens, A. R. (1989). Blood indices of muscle injury associated with eccentric muscle contractions. *Journal of Orthopaedic Research*, *7*(1), 142–145. <https://doi.org/10.1002/jor.1100070120>
- Gopalan, V., Michael, N., Ishino, S., Lee, S. S., Yang, A. Y., Bhanu Prakash, K. N., Yaligar, J., Sadananthan, S. A., Kaneko, M., Zhou, Z., Satomi, Y., Hirayama, M., Kamiguchi, H., Zhu, B., Horiguchi, T., Nishimoto, T., & Velan, S. S. (2016). Effect of Exercise and Calorie Restriction on Tissue Acylcarnitines, Tissue Desaturase Indices, and Fat Accumulation in Diet-Induced Obese Rats. *Scientific Reports*, *6*(1), 26445. <https://doi.org/10.1038/srep26445>
- Jensen, T. E., & Richter, E. A. (2012). Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. *The Journal of Physiology*, *590*(5), 1069–1076. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224972>
- Junior, R. P., Chuffa, L. G. de A., Simão, V. A., Sonehara, N. M., Chammas, R., Reiter, R. J., & Zuccari, D. A. P. de C. (2022). Melatonin Regulates the Daily Levels of Plasma Amino Acids, Acylcarnitines, Biogenic Amines, Sphingomyelins, and Hexoses in a Xenograft Model of Triple Negative Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(16), 9105. <https://doi.org/10.3390/ijms23169105>
- Kankuri, E., Finckenberg, P., Leinonen, J., Tarkia, M., Björk, S., Purhonen, J., Kallijärvi, J., Kankainen, M., Soliymani, R., Lalowski, M., & Mervaala, E. (2023). Altered acylcarnitine metabolism and inflexible mitochondrial fuel utilization characterize the loss of neonatal myocardial regeneration capacity. *Experimental & Molecular Medicine*, *55*(4), 806–817. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-00967-5>
- Kriisa, K., Leppik, L., Balõtshev, R., Ottas, A., Soomets, U., Koido, K., Volke, V., Innos, J., Haring, L., Vasar, E., & Zilmer, M. (2017). Profiling of Acylcarnitines in First Episode Psychosis before and after Antipsychotic Treatment. *Journal of Proteome Research*, *16*(10), 3558–3566. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00279>
- Kumar Jha, P., Challet, E., & Kalsbeek, A. (2015). Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *418*, 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.024>
- Li, S., Gao, D., Song, C., Tan, C., & Jiang, Y. (2019). Isotope Labeling Strategies for Acylcarnitines Profile in Biological Samples by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, *91*(3), 1701–1705. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05120>
- Marseglia, L., D'Angelo, G., Manti, S., Rulli, I., Salvo, V., Buonocore, G., Reiter, R., & Gitto, E. (2017). Melatonin Secretion Is Increased in Children with Severe Traumatic Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(5), 1053. <https://doi.org/10.3390/ijms18051053>
- Mazepa, R. C., Cuevas, M. J., Collado, P. S., & González-Gallego, J. (1999). Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Sciences*, *66*(2), 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00573-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00573-1)

- Mendes, C., Lopes, A. M. de S., do Amaral, F. G., Peliciari-Garcia, R. A., Turati, A. de O., Hirabara, S. M., Scialfa Falcão, J. H., & Cipolla-Neto, J. (2013). Adaptations of the aging animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin. *Journal of Pineal Research*, 55(3), 229–239. <https://doi.org/10.1111/jpi.12065>
- Mielgo-Ayuso, J., & Fernández-Lázaro, D. (2021). Nutrition and Muscle Recovery. *Nutrients*, 13(2), 294. <https://doi.org/10.3390/nu13020294>
- Miller, M. J., Cusmano-Ozog, K., Oglesbee, D., & Young, S. (2021). Laboratory analysis of acylcarnitines, 2020 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*, 23(2), 249–258. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-00990-1>
- Muñoz-Jurado, A., Escribano, B. M., Caballero-Villarraso, J., Galván, A., Agüera, E., Santamaría, A., & Túnez, I. (2022). Melatonin and multiple sclerosis: antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulator mechanism of action. *Inflammopharmacology*, 30(5), 1569–1596. <https://doi.org/10.1007/s10787-022-01011-0>
- Nédélec, M., McCall, A., Carling, C., Legall, F., Berthoin, S., & Dupont, G. (2013). Recovery in Soccer. *Sports Medicine*, 43(1), 9–22. <https://doi.org/10.1007/s40279-012-0002-0>
- OVERGAARD, K., FREDSTED, A., HYLDAL, A., INGEMANN-HANSEN, T., GISSEL, H., & CLAUSEN, T. (2004). Effects of Running Distance and Training on Ca<sup>2+</sup> Content and Damage in Human Muscle. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 36(7), 821–829. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000126468.65714.60>
- Pataky, M. W., Kumar, A. P., Gaul, D. A., Moore, S. G., Dasari, S., Robinson, M. M., Klaus, K. A., Kumar, A. A., Fernandez, F. M., & Nair, K. S. (2024). Divergent Skeletal Muscle Metabolomic Signatures of Different Exercise Training Modes Independently Predict Cardiometabolic Risk Factors. *Diabetes*, 73(1), 23–37. <https://doi.org/10.2337/db23-0142>
- Peake, J. M. (2019). Recovery after exercise: what is the current state of play? *Current Opinion in Physiology*, 10, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.03.007>
- Rahman, Md. M., & Yang, D. K. (2023). Melatonin Supplement Plus Exercise Effectively Counteracts the Challenges of Isoproterenol-Induced Cardiac Injury in Rats. *Biomedicines*, 11(2), 428. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020428>
- Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M., & Qin, L. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *Journal of Pineal Research*, 61(3), 253–278. <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>
- Reiter, R. J., Sharma, R., Rosales-Corral, S., de Campos Zuccari, D. A. P., & de Almeida Chuffa, L. G. (2022). Melatonin: A mitochondrial resident with a diverse skill set. *Life Sciences*, 301, 120612. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120612>
- Richter, E. A. (2021). Is GLUT4 translocation the answer to exercise-stimulated muscle glucose uptake? *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 320(2), E240–E243. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00503.2020>
- Smith, J. A. B., Murach, K. A., Dyar, K. A., & Zierath, J. R. (2023). Exercise metabolism and adaptation in skeletal muscle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(9), 607–632. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00606-x>

Stacchiotti, A., Favero, G., & Rodella, L. F. (2020). Impact of Melatonin on Skeletal Muscle and Exercise. *Cells*, 9(2), 288. <https://doi.org/10.3390/cells9020288>

Wende, A. R., Schaeffer, P. J., Parker, G. J., Zechner, C., Han, D.-H., Chen, M. M., Hancock, C. R., Lehman, J. J., Huss, J. M., McClain, D. A., Holloszy, J. O., & Kelly, D. P. (2007). A Role for the Transcriptional Coactivator PGC-1 $\alpha$  in Muscle Refueling. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36642–36651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707006200>

Xu, G., Hansen, J. S., Zhao, X. J., Chen, S., Hoene, M., Wang, X. L., Clemmesen, J. O., Secher, N. H., Häring, H. U., Pedersen, B. K., Lehmann, R., Weigert, C., & Plomgaard, P. (2016). Liver and Muscle Contribute Differently to the Plasma Acylcarnitine Pool During Fasting and Exercise in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(12), 5044–5052. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1859>

## 6 DISCUSSÃO

A presente análise discute de forma integrada os resultados apresentados tanto no capítulo 1 quanto no capítulo 2.

Os principais achados deste estudo destacam a capacidade da melatonina de elevar ou atenuar a queda dos níveis de certos aminoácidos no músculo, reduzir o dano tecidual nos parâmetros séricos e modular a reposição de substratos energéticos no tecido muscular esquelético após exercício isocarga. Esses efeitos favorecem o ambiente celular para futuros esforços, evidenciados pela redução nos níveis de glicose e triglicérides tanto musculares quanto plasmáticos, além do aumento no conteúdo de glicogênio muscular e hepático. Apesar disso, a melatonina não foi eficaz na redução dos níveis de acilcarnitinas musculares e hepáticas, corroborando parcialmente nossa hipótese (Figura 1). Este é o primeiro estudo a destacar o efeito agudo da administração de melatonina após o exercício no contexto da recuperação pós-esforço, abordando sua influência no metabolismo intermediário e na reposição de substratos energéticos. Além disso, a melatonina demonstrou uma redução significativa no dano tecidual após um exercício de isocarga realizado em intensidade correspondente à capacidade aeróbia máxima individual.

Os aminoácidos são essenciais para o exercício físico e a recuperação pós-esforço (Pasiakos et al., 2014; Salem et al., 2024), desempenhando funções críticas no metabolismo energético (Suzuki et al., 2020; Ling et al., 2023) e na integridade muscular (Hsu et al., 2021). Durante o exercício, especialmente quando os estoques de glicogênio estão baixos, o corpo utiliza aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) como fontes alternativas de energia (Shimomura et al., 2004), ajudando a sustentar a intensidade do exercício e retardar a fadiga muscular (Kim et al., 2013). Após o exercício, a necessidade de aminoácidos é ainda maior para a recuperação e reparação dos tecidos musculares danificados (Aguirre et al., 2013), promovendo a síntese proteica e o crescimento muscular (Reidy and Rasmussen 2016). Aminoácidos como a glutamina auxiliam na recuperação do sistema imunológico (Cruzat et al., 2018; Leone et al., 2019), enquanto a leucina ativa a via mTOR (mammalian target of rapamycin), crucial para a síntese proteica muscular (Jewell et al., 2013; Duan et al., 2016). Os dados sugerem que a melatonina desempenha um papel significativo no aumento do pool de aminoácidos musculares, incluindo arginina ( $F = 13,27$ ;  $p = 0,001$ ), ácido glutâmico ( $F = 5,92$ ;  $p = 0,023$ ), citrulina ( $F = 10,72$ ;  $p = 0,001$ ), glutamina ( $F = 8,15$ ;  $p = 0,009$ ), ornitina ( $F =$

4,88;  $p = 0,037$ ), prolina ( $F = 15,13$ ;  $p < 0,001$ ) e serina ( $F = 7,23$ ;  $p = 0,013$ ) (Capítulo 1). Embora os mecanismos específicos e as vias não tenham sido avaliados neste estudo, a literatura fornece uma base sólida sobre a ação da melatonina no metabolismo dos aminoácidos. Estudos indicam que a melatonina exerce suas funções no metabolismo dos aminoácidos principalmente por meio de suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Song et al., 2021). Como um potente antioxidante, a melatonina neutraliza os radicais livres gerados durante o exercício intenso, protegendo as células musculares do estresse oxidativo e preservando a integridade das proteínas e aminoácidos (Kim et al., 2000; Albendea et al., 2007; Colares et al., 2022). Ao reduzir a inflamação e o dano celular, a melatonina cria um ambiente celular propício à síntese proteica e à recuperação muscular (Tiong et al., 2019). Evidências também indicam que a melatonina modula a expressão gênica (Sharman et al., 2007; Monayo et al., 2024), influenciando genes envolvidos na síntese e degradação de proteínas, como o mTOR (Kandemir et al., 2017; Silva et al., 2024), um regulador chave do crescimento celular e da síntese de proteínas (Morita et al., 2015). Além disso, a melatonina regula o transporte de aminoácidos, associando-se à modulação de transportadores de aminoácidos na membrana celular (Tain et al., 2013), o que facilita a entrada de aminoácidos essenciais no músculo para síntese proteica e reparo tecidual. A melatonina promove a síntese proteica ao aumentar a disponibilidade de aminoácidos no músculo (Rondanelli et al., 2019), o que é crucial para a reparação e crescimento muscular, especialmente após o desgaste causado pelo exercício (Vliet et al., 2018). Ademais, a melatonina interage com hormônios anabólicos, como a insulina e o hormônio do crescimento (Vriend et al., 1990; Chowdhury et al., 2008; Peschke et al., 2013), que são conhecidos por suas funções na promoção da síntese proteica e no aumento da captação de aminoácidos pelos músculos (Fujita et al., 2006; Moller et al., 2009). Esses múltiplos mecanismos através dos quais a melatonina influencia o metabolismo dos aminoácidos ilustram sua importância potencial na otimização da recuperação muscular e na manutenção da saúde muscular em contextos de exercício intenso e recuperação pós-esforço.

No que concerne ao metabolismo lipídico, a capacidade mitocondrial de oxidação de substratos no músculo esquelético é amplamente reconhecida na literatura como um dos principais determinantes da performance atlética (Halling et al., 2019). Além disso, essa capacidade desempenha um papel crucial na recuperação metabólica após o exercício, facilitando a reposição do glicogênio (Jensen et al., 2018; Hasani et al., 2023). As acilcarnitinas desempenham um papel fundamental no metabolismo lipídico, facilitando o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para dentro das mitocôndrias (Indiveri et al., 2011; Dambrova et al., 2022), onde são oxidados para produzir energia (Liew et al., 2020). Este processo começa com a formação de acilcarnitinas pela carnitina palmitoiltransferase I (CPT1) na membrana mitocondrial externa (Schlaepfer and Joshi 2020). As acilcarnitinas são então translocadas para a matriz mitocondrial pela carnitina-acilcarnitina translocase (CACT) (Habib et al., 2023), onde a carnitina palmitoiltransferase II (CPT2) converte as acilcarnitinas de volta em acil-CoA, permitindo a  $\beta$ -oxidação (Merritt II et al., 2018). Este ciclo gera NADH e FADH<sub>2</sub>, que alimentam a cadeia de transporte de elétrons para a produção de ATP (Park et al., 2021). Além de sua função energética, as acilcarnitinas são cruciais para a homeostase metabólica, especialmente durante o exercício prolongado e em estados de jejum (Xu et al., 2016). Deficiências nas enzimas do metabolismo da carnitina, como CPT1 e CPT2, podem resultar em miopatias e distúrbios metabólicos (Jshi and Zierz 2020), com os

níveis de acilcarnitinas servindo como biomarcadores para estas condições (McCann et al., 2021). No contexto do desempenho atlético, a eficiente mobilização e oxidação de ácidos graxos sustentam esforços prolongados (Boit et al., 2016), e a suplementação com L-carnitina é estudada para melhorar a oxidação lipídica (Musazadeh et al., 2023; Li et al., 2023). Assim, as acilcarnitinas são essenciais não só para a produção de energia, mas também como indicadores de saúde metabólica, oferecendo potenciais alvos terapêuticos para melhorar a função mitocondrial e tratar distúrbios metabólicos (Virmani and Cirulli 2022). Embora não apresentando efeito sobre o pool de acilcarnitinas, a melatonina agiu fortemente nos triglicérides teciduais, promovendo uma redução significativa no gastrocnêmio branco ( $F = 20,79$ ;  $p = 0,000$ ), gastrocnêmio vermelho ( $F = 8,76$ ;  $p = 0,005$ ) e glúteo máximo ( $F = 4,90$ ;  $p = 0,032$ ), ao mesmo tempo que demonstrou aumento do sóleo ( $F = 6,00$ ;  $p = 0,019$ ). Além disso, a redução da concentração de triglicérides plasmático demonstrada pelo grupo EM1 e EM24 (capítulo 2) possivelmente aumentou o transporte de triglicérideo do sangue para o musculo esquelético para ser oxidado. Esses resultados corroboram com os achados da literatura, os quais indicam uma melhoria no perfil lipídico em animais suplementados com melatonina. Isso se manifesta pela redução da deposição de gordura intramuscular, atribuída à promoção da lipólise (Liu et al., 2019). Além disso, diversos estudos relatam uma redução na concentração de triglicérides sanguíneos em resposta à administração de melatonina (Loloei et al., 2019; Mendes et al., 2013; Agil et al., 2011). Dado o aprimoramento na oxidação de gordura durante o exercício, que consequentemente aumenta o fornecimento de ATP para a recuperação metabólica, era esperado que os animais tratados com melatonina apresentassem um maior teor de glicogênio em comparação com aqueles que receberam o controle. Esse efeito foi observado no gastrocnêmio vermelho ( $F = 82,81$ ;  $p = 0,000$ ), no glúteo máximo ( $F = 19,55$ ;  $p = 0,000$ ) e no fígado ( $F = 6,24$ ;  $p = 0,016$ ).

Em relação à reposição de glicogênio após o esforço, é bem claro na literatura que o glicogênio é uma forma de armazenamento de glicose nas células (Katz 2022), principalmente nos músculos esqueléticos e no fígado (Iwayama et al., 2021), e desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase energética durante o exercício físico (Hearris et al., 2018; Pi et al., 2023). Durante atividades de alta intensidade ou prolongadas, os estoques de glicogênio muscular são utilizados como fonte primária de energia (Jensen et al., 2011), sendo progressivamente depletados à medida que o exercício prossegue (Mul et al., 2015). A depleção significativa de glicogênio está associada à fadiga muscular e à redução do desempenho atlético (Schytz et al., 2023; Williams et al., 2013), destacando a importância de sua reposição adequada para a recuperação pós-exercício (Knuiman et al., 2015). Após o exercício, a rápida restauração dos níveis de glicogênio é essencial (Craven et al., 2021), especialmente nas primeiras horas (Kerksick et al., 2017), devido à maior sensibilidade à insulina e atividade enzimática (Alghannam et al., 2018; DiMenna and Arad 2021). Já existem evidências claras sobre a ação da melatonina na melhora da sensibilidade à insulina e mecanismos relacionados à captação de glicose pelas células (Albreiki et al., 2021; Watanabe et al., 2023; Hong et al., 2024). Nesse estudo, a administração de melatonina após o exercício resultou em aumentos significativos no conteúdo de glicogênio no gastrocnêmio vermelho ( $F = 82,81$ ;  $p = 0,000$ ), no glúteo máximo ( $F = 19,55$ ;  $p = 0,000$ ) e no fígado ( $F = 6,24$ ;  $p = 0,016$ ), promovendo supercompensação no gastrocnêmio vermelho ( $F = 82,81$ ;  $p = 0,000$ ). Estes achados sugerem que a melatonina desempenha um papel crucial na aceleração da restauração dos substratos energéticos, potencialmente aumentando as

reservas de glicogênio. A capacidade de restaurar rapidamente essas reservas após o exercício é fundamental para a recuperação e para a preparação dos músculos para esforços futuros (Lvy 2004; Hingst et al., 2018). A supercompensação de glicogênio observada no gastrocnêmio vermelho indica que a melatonina não apenas ajuda na reposição dos níveis normais de glicogênio, mas também pode aumentar a capacidade de armazenamento acima dos níveis basais. Este fenômeno é benéfico para atletas e indivíduos que realizam atividades físicas regularmente (Doering et al., 2019; Jensen et al., 2021), pois uma maior reserva de glicogênio pode retardar a fadiga muscular e melhorar o desempenho em sessões subsequentes de exercício (Alghannam et al., 2018). Além disso, o aumento do glicogênio no fígado é igualmente importante (López-Soldado et al., 2021), pois o fígado desempenha um papel central na manutenção da glicemia durante e após o exercício (Schweitzer et al., 2023). A reposição eficiente do glicogênio hepático ajuda a estabilizar os níveis de glicose no sangue, fornecendo uma fonte contínua de energia para o cérebro e outros órgãos vitais durante a recuperação (Kanungo et al., 2018). Em contraste com os aumentos significativos de glicogênio, observamos que a melatonina resultou em um aumento significativo no fígado apenas 24 horas após o exercício ( $p = 0,006$ ). Curiosamente, os resultados demonstram uma dependência tecidual, uma vez que o gastrocnêmio branco apresentou uma redução no conteúdo de glicogênio 24 horas após o exercício no grupo tratado com melatonina ( $p = 0,001$ ). Este achado sugere que a resposta à administração de melatonina pode variar significativamente entre diferentes tipos de tecidos musculares, possivelmente devido às suas características metabólicas e funcionais específicas.

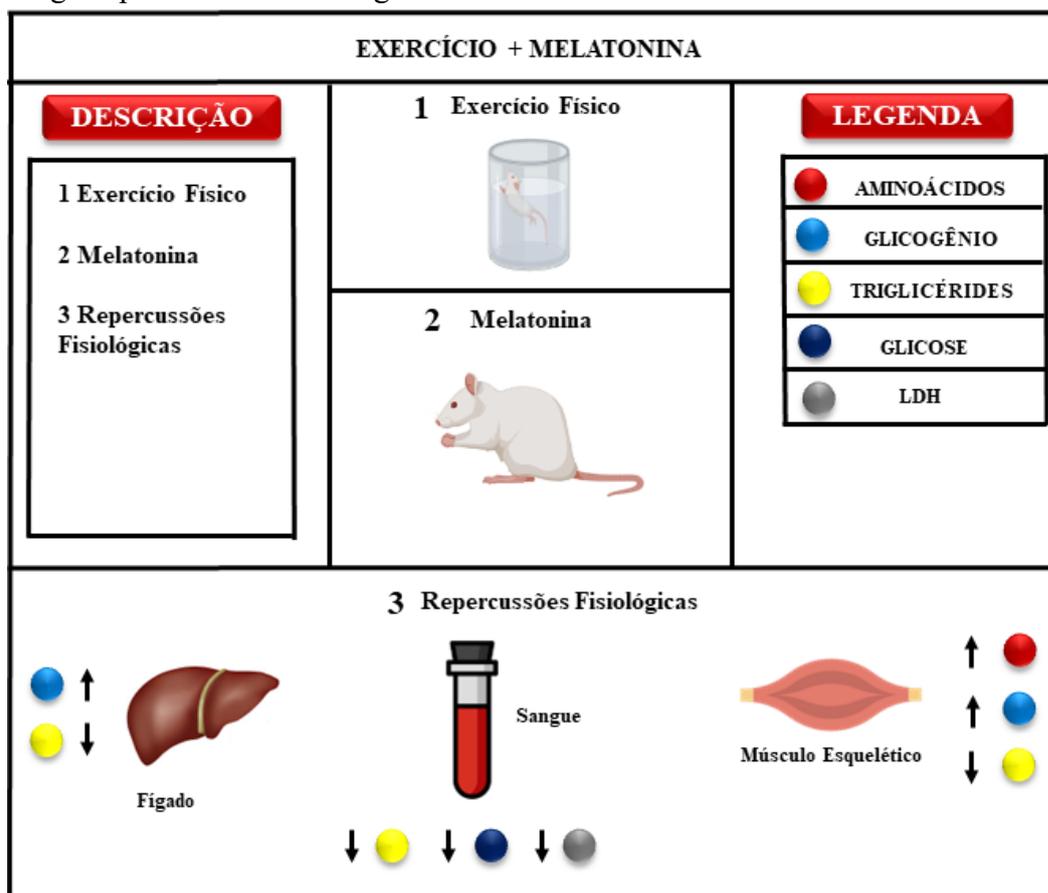
Em relação ao dano tecidual, é bem conhecido na literatura que o dano tecidual induzido pelo exercício é frequentemente avaliado por meio da quantificação de enzimas marcadoras, como a creatina quinase (CK) e a lactato desidrogenase (LDH) (Rodrigues et al., 2010; Allard et al., 2023; Bischof et al., 2024). Estas enzimas são liberadas na circulação sanguínea quando há lesão muscular (Baird et al., 2012), servindo como indicadores sensíveis da extensão do dano tecidual e da eficácia dos processos de recuperação muscular (Callegari et al., 2017; Kim et al., 2020). No presente estudo observamos que a administração de melatonina demonstrou uma redução seletiva nos níveis de LDH, indicando um efeito protetor contra o dano tecidual induzido pelo exercício. Em contraste, os níveis de CK, outro marcador crucial de dano muscular e catabolismo proteico (Washington and Hoosier 2012), permaneceram inalterados entre os grupos experimentais, sugerindo que a melatonina pode ter um impacto diferencial sobre diferentes tipos de lesão celular ou processos inflamatórios no tecido muscular. Esta distinção é fundamental para compreender os mecanismos específicos pelos quais a melatonina modula a resposta ao dano tecidual após o exercício. Estudos experimentais corroboram a eficácia da melatonina na redução de marcadores de dano tecidual em modelos animais e humanos após exercício físico intenso. Cheikh et al. 2020 investigaram os efeitos da ingestão noturna de melatonina contra o estresse oxidativo e danos musculares em jovens atletas. Quatorze adolescentes treinados realizaram dois testes de sprint anaeróbico, seguidos pela ingestão de melatonina ou placebo. Na manhã seguinte, repetiram o teste. A melatonina aumentou a potência e reduziu o tempo de teste e índice de fadiga. Além disso, atenuou enzimas de dano muscular e hepático (CK e LDH), comparado ao placebo. Gedikli et al. 2015 avaliou os efeitos da melatonina nos tecidos hepáticos e renais de ratos expostos ao exercício intensivo (exercício em esteira). Vinte e quatro ratos machos foram divididos em quatro grupos, sendo submetidos a diferentes

protocolos de intervenção. Os resultados bioquímicos indicaram uma diminuição nos níveis de enzimas de dano tecidual hepáticas e renais no grupo exercitados e tratados com melatonina em comparação com os níveis no grupo de exercícios intensos apenas. Portanto, inferimos que a melatonina possui o potencial de mitigar o dano tecidual pós-exercício, embora sua influência sobre todas as enzimas envolvidas possa variar.

Neste contexto, a administração de melatonina se mostrou promissora no cenário de recuperação após esforço. Ao ser aplicada no contexto do treinamento físico, a melatonina emerge como um potencial facilitador da supercompensação, um processo crucial para o aprimoramento do desempenho esportivo. A supercompensação refere-se à fase em que o corpo, após o estresse do exercício, restaura e até mesmo aumenta suas reservas de energia e capacidade funcional além do nível inicial. Assim, ao promover uma resposta adaptativa mais eficiente, a melatonina pode acelerar esse processo, permitindo que o atleta se recupere mais rapidamente e esteja pronto para receber novos estímulos de treinamento. Essa capacidade de antecipar a supercompensação tem implicações profundas para a progressão do treinamento e o alcance do pico de desempenho, potencialmente encurtando o tempo necessário para atingir os mais altos níveis de aptidão física e excelência atlética. Sendo assim, pesquisas em modelo humano necessitam ser conduzidas a fim de observarem se tais aferições serão transponíveis de um modelo para outro, logo, tais possibilidades sobre a aplicação da melatonina carecem ser investigadas em futuros experimentos.

Em síntese, acreditamos que o presente estudo destacou relevantes achados que certamente irão contribuir com a literatura. No entanto, algumas limitações devem ser consideradas, como: 1) novas dosagens de melatonina devem ser testadas a fim de obtermos efeitos semelhantes utilizando dosagens superiores a utilizada neste experimento, visto que alguns parâmetros não foram modificados; 2) além disso, diferentes modelos de exercício poderiam trazer respostas interessantes; 3) por fim, optamos por concentrar nossas análises sobre o metabolismo intermediário (aminoácidos, lipídios e carboidratos), no entanto, seria relevante estudar proteínas chaves para estes metabolismos bem como suas vias de sinalização.

**Figura 12** – Efeito da melatonina sobre tecido muscular esquelético, fígado e sangue após exercício isocarga.



**Figura 14** – Efeito da melatonina sobre o conteúdo de substratos energéticos em tecido muscular esquelético (aminoácidos, glicogênio e triglicérides) e fígado (glicogênio e triglicérides), e concentração de lactato desidrogenase, glicose e triglicérides plasmáticos em ratos submetidos ao exercício isocarga de natação em intensidade correspondente a máxima capacidade aeróbia. LDH: lactato desidrogenase.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os nossos dados, o presente estudo demonstrou que na presença de melatonina após exercício isocarga, houve aumento nos níveis de alguns aminoácidos em tecido muscular esquelético, conseqüentemente, modulando o metabolismo energético através da redução de glicose, dos estoques de triglicérides muscular e plasmático e acelerando a reposição do conteúdo de glicogênio muscular, além da diminuição de dano tecidual por meio da redução de lactato desidrogenase. Dessa maneira, favoreceu-se o ambiente celular para futuros esforços, ao menos do ponto de vista bioenergético.

## REFERÊNCIAS

- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., Rosales-Corral, S., Tan, D.-X., & Reiter, R. J. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(16), 2997–3025. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>
- Agil, A., Rosado, I., Ruiz, R., Figueroa, A., Zen, N., & Fernández-Vázquez, G. (2012a). Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Pineal Research*, *52*(2), 203–210. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00928.x>
- Aguirre, N., van Loon, L. J. C., & Baar, K. (2013). *The Role of Amino Acids in Skeletal Muscle Adaptation to Exercise* (pp. 85–102). <https://doi.org/10.1159/000350261>
- Albendea, C. D., Gómez-Trullén, E. M., Fuentes-Broto, L., Miana-Mena, F. J., Millán-Plano, S., Reyes-Gonzales, M. C., Martínez-Ballarín, E., & García, J. J. (2007). Melatonin reduces lipid and protein oxidative damage in synaptosomes due to aluminium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *21*(4), 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2007.04.002>
- Albreiki, M. S., Middleton, B., & Hampton, S. M. (2021b). The effect of melatonin on glucose tolerance, insulin sensitivity and lipid profiles after a late evening meal in healthy young males. *Journal of Pineal Research*, *71*(4). <https://doi.org/10.1111/jpi.12770>
- Alghannam, A., Gonzalez, J., & Betts, J. (2018a). Restoration of Muscle Glycogen and Functional Capacity: Role of Post-Exercise Carbohydrate and Protein Co-Ingestion. *Nutrients*, *10*(2), 253. <https://doi.org/10.3390/nu10020253>
- Allard, N. A. E., Janssen, L., Lagerwaard, B., Nuijten, M. A. H., Bongers, C. C. W. G., Rodenburg, R. J., Thompson, P. D., Eijssvogels, T. M. H., Assendelft, W. J. J., Schirris, T. J. J., Timmers, S., & Hopman, M. T. E. (2023). Prolonged Moderate-Intensity Exercise Does Not Increase Muscle Injury Markers in Symptomatic or Asymptomatic Statin Users. *Journal of the American College of Cardiology*, *81*(14), 1353–1364. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2023.01.043>
- Allen, J., Sun, Y., & Woods, J. A. (2015). *Exercise and the Regulation of Inflammatory Responses* (pp. 337–354). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.07.003>
- Alseekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y., Contrepois, K., D'Auria, J., Ewald, J., C. Ewald, J., Fraser, P. D., Giavalisco, P., Hall, R. D., Heinemann, M., Link, H., Luo, J., Neumann, S., Nielsen, J., Perez de Souza, L., Saito, K., Sauer, U., Schroeder, F. C., ... Fernie, A. R. (2021). Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nature Methods*, *18*(7), 747–756. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01197-1>
- Amaral, F. G. do, & Cipolla-Neto, J. (2018). A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, *62*(4), 472–479. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000066>
- Argilés, J. M., Campos, N., Lopez-Pedrosa, J. M., Rueda, R., & Rodríguez-Mañas, L. (2016). Skeletal Muscle Regulates Metabolism via Interorgan Crosstalk: Roles in Health

and Disease. *Journal of the American Medical Directors Association*, 17(9), 789–796. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2016.04.019>

Aslam, S., O’Dea, M., Kelly, L. A., O’Neill, A., McKenna, E., Hurley, T., Branagan, A., O’Driscoll, D., Normile, C., Saleemi, S., Sweetman, D., Vavasseur, C., Murphy, J., Donoghue, V., Watson, W., & Molloy, E. J. (2023). Melatonin Alters Innate Immune Function in Infants with Neonatal Encephalopathy. *Neonatology*, 120(3), 325–333. <https://doi.org/10.1159/000527714>

Baird, M. F., Graham, S. M., Baker, J. S., & Bickerstaff, G. F. (2012). Creatine-Kinase- and Exercise-Related Muscle Damage Implications for Muscle Performance and Recovery. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/960363>

Beck, W. F., De, G. G., Menezes Scariot, P. P., Masselli dos Reis, I. G., & Gobatto, C. A. (2014). Time to exhaustion at anaerobic threshold in swimming rats: metabolic investigation. *Bratislava Medical Journal*, 115(10), 617–621. [https://doi.org/10.4149/BLL\\_2014\\_119](https://doi.org/10.4149/BLL_2014_119)

Beck, W. R., Botezelli, J. D., Pauli, J. R., Ropelle, E. R., & Gobatto, C. A. (2015). Melatonin Has An Ergogenic Effect But Does Not Prevent Inflammation and Damage In Exhaustive Exercise. *Scientific Reports*, 5(1), 18065. <https://doi.org/10.1038/srep18065> (A).

Beck, W., & Gobatto, C. (2013). Effects of maximum intensity aerobic swimming exercise until exhaustion at different times of day on the hematological parameters in rats. *Acta Physiologica Hungarica*, 100(4), 427–434. <https://doi.org/10.1556/APhysiol.100.2013.013>

Beck, W., Scariot, P., & Gobatto, C. (2015). Melatonin is an Ergogenic Aid for Exhaustive Aerobic Exercise only during the Wakefulness Period. *International Journal of Sports Medicine*, 37(01), 71–76. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1559698>

Beck, W.R., Campesan, Y.S., Gobatto, C.A. Validity and reliability of incremental test to determine the anaerobic threshold in swimming rats. *Int J Appl Exerc Physiol* 2015; 4: 25–33. (B)

Begni, V., Sanson, A., Pfeiffer, N., Brandwein, C., Inta, D., Talbot, S. R., Riva, M. A., Gass, P., & Mallien, A. S. (2020). Social isolation in rats: Effects on animal welfare and molecular markers for neuroplasticity. *PLOS ONE*, 15(10), e0240439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240439>

- Behram Kandemir, Y., Aydin, C., & Gorgisen, G. (2017). The effects of melatonin on oxidative stress and prevention of primordial follicle loss via activation of mTOR pathway in the rat ovary. *Cellular and Molecular Biology*, 63(2), 100. <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.2.16>
- Beiter, T., Hoene, M., Prenzler, F., Mooren, F. C., Steinacker, J. M., Weigert, C., Nieß, A. M., & Munz, B. (2015). Exercise, skeletal muscle and inflammation: ARE-binding proteins as key regulators in inflammatory and adaptive networks. *Exercise Immunology Review*, 21, 42–57.
- ben Dhia, I., Maaloul, R., Marzougui, H., Ghroubi, S., Kallel, C., Driss, T., Elleuch, M. H., Ayadi, F., Turki, M., & Hammouda, O. (2022). Melatonin reduces muscle damage, inflammation and oxidative stress induced by exhaustive exercise in people with overweight/obesity. *Physiology International*, 109(1), 78–89. <https://doi.org/10.1556/2060.2022.00126>
- Bester, R., Stander, Z., Mason, S., Keane, K. M., Howatson, G., Clifford, T., Stevenson, E. J., & Loots, D. T. (2023). The metabolic recovery of marathon runners: an untargeted 1H-NMR metabolomics perspective. *Frontiers in Physiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1117687>
- Bielinski, R., Schutz, Y., & Jéquier, E. (1985). Energy metabolism during the postexercise recovery in man. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 42(1), 69–82. <https://doi.org/10.1093/ajcn/42.1.69>
- Bischof, K., Stafilidis, S., Bundschuh, L., Oesser, S., Baca, A., & König, D. (2024a). Reduction in systemic muscle stress markers after exercise-induced muscle damage following concurrent training and supplementation with specific collagen peptides – a randomized controlled trial. *Frontiers in Nutrition*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1384112>
- Bischof, K., Stafilidis, S., Bundschuh, L., Oesser, S., Baca, A., & König, D. (2024b). Reduction in systemic muscle stress markers after exercise-induced muscle damage following concurrent training and supplementation with specific collagen peptides – a randomized controlled trial. *Frontiers in Nutrition*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1384112>
- Bocheva, G., Slominski, R. M., Janjetovic, Z., Kim, T.-K., Böhm, M., Steinbrink, K., Reiter, R. J., Kleszczyński, K., & Slominski, A. T. (2022). Protective Role of Melatonin and Its Metabolites in Skin Aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1238. <https://doi.org/10.3390/ijms23031238>
- Bondy, S. C., & Campbell, A. (2020). Melatonin and Regulation of Immune Function: Impact on Numerous Diseases. *Current Aging Science*, 13(2), 92–101. <https://doi.org/10.2174/1874609813666200711153223>
- Borges, L. da S., Dermargos, A., Junior, E. P. da S., Weimann, E., Lambertucci, R. H., & Hatanaka, E. (2015). Melatonin decreases muscular oxidative stress and inflammation induced by strenuous exercise and stimulates growth factor synthesis. *Journal of Pineal Research*, 58(2), 166–172. <https://doi.org/10.1111/jpi.12202>
- Bosma, M. (2014). Lipid homeostasis in exercise. *Drug Discovery Today*, 19(7), 1019–1023. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.03.007>

- Boutin, J. A., Kennaway, D. J., & Jockers, R. (2023). Melatonin: Facts, Extrapolations and Clinical Trials. *Biomolecules*, *13*(6), 943. <https://doi.org/10.3390/biom13060943>
- Bouviere, J., Fortunato, R. S., Dupuy, C., Werneck-de-Castro, J. P., Carvalho, D. P., & Louzada, R. A. (2021). Exercise-Stimulated ROS Sensitive Signaling Pathways in Skeletal Muscle. *Antioxidants*, *10*(4), 537. <https://doi.org/10.3390/antiox10040537>
- Cajochen, C., Kräuchi, K., & Wirz-Justice, A. (2003). Role of Melatonin in the Regulation of Human Circadian Rhythms and Sleep. *Journal of Neuroendocrinology*, *15*(4), 432–437. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.00989.x>
- Callegari, G. A., Novaes, J. S., Neto, G. R., Dias, I., Garrido, N. D., & Dani, C. (2017). Creatine Kinase and Lactate Dehydrogenase Responses After Different Resistance and Aerobic Exercise Protocols. *Journal of Human Kinetics*, *58*(1), 65–72. <https://doi.org/10.1515/hukin-2017-0071>
- Canals-Garzón, C., Guisado-Barrilao, R., Martínez-García, D., Chiroso-Ríos, I. J., Jerez-Mayorga, D., & Guisado-Requena, I. M. (2022). Effect of Antioxidant Supplementation on Markers of Oxidative Stress and Muscle Damage after Strength Exercise: A Systematic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(3), 1803. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031803>
- Cao, X., & Thyfault, J. P. (2023). Exercise drives metabolic integration between muscle, adipose and liver metabolism and protects against aging-related diseases. *Experimental Gerontology*, *176*, 112178. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2023.112178>
- Cardinali, D. P. (2021). *Melatonin and healthy aging* (pp. 67–88). <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2020.12.004>
- Carrillo-Vico, A., Lardone, P., Álvarez-Sánchez, N., Rodríguez-Rodríguez, A., & Guerrero, J. (2013). Melatonin: Buffering the Immune System. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(4), 8638–8683. <https://doi.org/10.3390/ijms14048638>
- Chakravarthy, M. v., Siddiqui, M. S., Forsgren, M. F., & Sanyal, A. J. (2020). Harnessing Muscle–Liver Crosstalk to Treat Nonalcoholic Steatohepatitis. *Frontiers in Endocrinology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.592373>
- Cheikh, M., Makhlof, K., Ghattassi, K., Graja, A., Ferchichi, S., Kallel, C., Houda, M., Souissi, N., & Hammouda, O. (2020). Melatonin ingestion after exhaustive late-evening exercise attenuate muscle damage, oxidative stress, and inflammation during intense short term effort in the following day in teenage athletes. *Chronobiology International*, *37*(2), 236–247. <https://doi.org/10.1080/07420528.2019.1692348>
- Cho, J. H., Bhutani, S., Kim, C. H., & Irwin, M. R. (2021). Anti-inflammatory effects of melatonin: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Brain, Behavior, and Immunity*, *93*, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.01.034>
- Chowdhury, V. S., Yamamoto, K., Saeki, I., Hasunuma, I., Shimura, T., & Tsutsui, K. (2008). Melatonin Stimulates the Release of Growth Hormone and Prolactin by a Possible Induction of the Expression of Frog Growth Hormone-Releasing Peptide and Its Related Peptide-2 in the Amphibian Hypothalamus. *Endocrinology*, *149*(3), 962–970. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1427>

- Cimen, B., Uz, A., Cetin, I., Cimen, L., & Cetin, A. (2017). Melatonin Supplementation Ameliorates Energy Charge and Oxidative Stress Induced by Acute Exercise in Rat Heart Tissue. *Acta Cardiologica Sinica*, *33*(5), 530–538. <https://doi.org/10.6515/acs20170331a>
- Cipolla-Neto, J., Amaral, F. G., Afeche, S. C., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2014). Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *Journal of Pineal Research*, *56*(4), 371–381. <https://doi.org/10.1111/jpi.12137>
- Claustrat, B., & Leston, J. (2015). Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*, *61*(2–3), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2015.03.002>
- Cohen, D. Statistical power analysis for the behavioral sciences (second edition). Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale (1988).
- Colares, J. R., Hartmann, R. M., Schemitt, E. G., Fonseca, S. R. B., Brasil, M. S., Picada, J. N., Dias, A. S., Bueno, A. F., Marroni, C. A., & Marroni, N. P. (2022). Melatonin prevents oxidative stress, inflammatory activity, and DNA damage in cirrhotic rats. *World Journal of Gastroenterology*, *28*(3), 348–364. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i3.348>
- Colin-Gonzalez, A., Aguilera, G., Serratos, I., Escribano, B., Santamaria, A., & Tunez, I. (2015). On the Relationship Between the Light/Dark Cycle, Melatonin and Oxidative Stress. *Current Pharmaceutical Design*, *21*(24), 3477–3488. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150706110940>
- Craven, J., Desbrow, B., Sabapathy, S., Bellinger, P., McCartney, D., & Irwin, C. (2021). The Effect of Consuming Carbohydrate With and Without Protein on the Rate of Muscle Glycogen Re-synthesis During Short-Term Post-exercise Recovery: a Systematic Review and Meta-analysis. *Sports Medicine - Open*, *7*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s40798-020-00297-0>
- Cruzat, V., Macedo Rogero, M., Noel Keane, K., Curi, R., & Newsholme, P. (2018). Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/nu10111564>
- da Boit, M., Hunter, A. M., & Gray, S. R. (2017). Fit with good fat? The role of n-3 polyunsaturated fatty acids on exercise performance. *Metabolism*, *66*, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.10.007>
- Dambrova, M., Makrecka-Kuka, M., Kuka, J., Vilskersts, R., Nordberg, D., Attwood, M. M., Smesny, S., Sen, Z. D., Guo, A. C., Oler, E., Tian, S., Zheng, J., Wishart, D. S., Liepinsh, E., & Schiöth, H. B. (2022a). Acylcarnitines: Nomenclature, Biomarkers, Therapeutic Potential, Drug Targets, and Clinical Trials. *Pharmacological Reviews*, *74*(3), 506–551. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000408>
- Dambrova, M., Makrecka-Kuka, M., Kuka, J., Vilskersts, R., Nordberg, D., Attwood, M. M., Smesny, S., Sen, Z. D., Guo, A. C., Oler, E., Tian, S., Zheng, J., Wishart, D. S., Liepinsh, E., & Schiöth, H. B. (2022b). Acylcarnitines: Nomenclature, Biomarkers, Therapeutic Potential, Drug Targets, and Clinical Trials. *Pharmacological Reviews*, *74*(3), 506–551. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000408>
- Dey, S., Biswas, A., Deng, Y., Birhanie, Z. M., Wentao, C., & Li, D. (2023). Exogenous melatonin enhances low-temperature stress of jute seedlings through modulation of photosynthesis and antioxidant potential. *Heliyon*, *9*(8), e19125. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19125>

- DiMenna, F. J., & Arad, A. D. (2021). The acute vs. chronic effect of exercise on insulin sensitivity: nothing lasts forever. *Cardiovascular Endocrinology & Metabolism*, *10*(3), 149–161. <https://doi.org/10.1097/XCE.0000000000000239>
- Doering, T. M., Cox, G. R., Areta, J. L., & Coffey, V. G. (2019). Repeated muscle glycogen supercompensation with four days' recovery between exhaustive exercise. *Journal of Science and Medicine in Sport*, *22*(8), 907–911. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2019.03.009>
- Duan, Y., Li, F., Li, Y., Tang, Y., Kong, X., Feng, Z., Anthony, T. G., Watford, M., Hou, Y., Wu, G., & Yin, Y. (2016). The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism. *Amino Acids*, *48*(1), 41–51. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2067-1>
- DuBois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, Fred. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Engel, P. C., & Jones, J. B. (1978). Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD<sup>+</sup> in alkaline hydrazine buffers: Improved conditions for the assay of l-glutamate, l-lactate, and other metabolites. *Analytical Biochemistry*, *88*(2), 475–484. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90447-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90447-5)
- Esposito, E., & Cuzzocrea, S. (2010). Antiinflammatory Activity of Melatonin in Central Nervous System. *Current Neuropharmacology*, *8*(3), 228–242. <https://doi.org/10.2174/157015910792246155>
- Faria, V. S., Machado-Gobatto, F. B., Scariot, P. P. M., Zagatto, A. M., & Beck, W. R. (2022). Melatonin Potentiates Exercise-Induced Increases in Skeletal Muscle PGC-1 $\alpha$  and Optimizes Glycogen Replenishment. *Frontiers in Physiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.803126>
- Faria, V. S., Pejon, T. M. M., Gobatto, C. A., de Araujo, G. G., Cornachione, A. S., & Beck, W. R. (2021). Acute melatonin administration improves exercise tolerance and the metabolic recovery after exhaustive effort. *Scientific Reports*, *11*(1), 19228. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97364-7>
- Farjallah, M., Graja, A., Mahmoud, L., Ghattassi, K., Boudaya, M., Driss, T., Jamoussi, K., Sahnoun, Z., Souissi, N., & Hammouda, O. (2022). Effects of melatonin ingestion on physical performance and biochemical responses following exhaustive running exercise in soccer players. *Biology of Sport*, *39*(2), 473–479. <https://doi.org/10.5114/biolsport.2022.106385>
- Fatouros, I., & Jamurtas, A. (2016). Insights into the molecular etiology of exercise-induced inflammation: opportunities for optimizing performance. *Journal of Inflammation Research*, *Volume 9*, 175–186. <https://doi.org/10.2147/JIR.S114635>
- Fujita, S., Rasmussen, B. B., Cadenas, J. G., Grady, J. J., & Volpi, E. (2006). Effect of insulin on human skeletal muscle protein synthesis is modulated by insulin-induced changes in muscle blood flow and amino acid availability. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *291*(4), E745–E754. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00271.2005>
- Fuller, S. E., Huang, T.-Y., Simon, J., Batdorf, H. M., Essajee, N. M., Scott, M. C., Waskom, C. M., Brown, J. M., Burke, S. J., Collier, J. J., & Noland, R. C. (2019). Low-intensity exercise induces acute shifts in liver and skeletal muscle substrate metabolism

but not chronic adaptations in tissue oxidative capacity. *Journal of Applied Physiology*, 127(1), 143–156. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00820.2018>

Galano, A., & Reiter, R. J. (2018). Melatonin and its metabolites vs oxidative stress: From individual actions to collective protection. *Journal of Pineal Research*, 65(1). <https://doi.org/10.1111/jpi.12514>

Galli, D., Carubbi, C., Masselli, E., Vaccarezza, M., Presta, V., Pozzi, G., Ambrosini, L., Gobbi, G., Vitale, M., & Mirandola, P. (2021). Physical Activity and Redox Balance in the Elderly: Signal Transduction Mechanisms. *Applied Sciences*, 11(5), 2228. <https://doi.org/10.3390/app11052228>

Garaulet, M., Qian, J., Florez, J. C., Arendt, J., Saxena, R., & Scheer, F. A. J. L. (2020). Melatonin Effects on Glucose Metabolism: Time To Unlock the Controversy. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 31(3), 192–204. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.11.011>

Gedikli, S., Gelen, V., Sengul, E., Ozkanlar, S., Gur, C., Agirbas, O., Cakmak, F., & Kara, A. (2015). Therapeutic Effects of Melatonin On Liver And Kidney Damages In Intensive Exercise Model of Rats. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 15(4), 308–314. <https://doi.org/10.2174/1871530315666150827103043>

Guerrero, J., & Reiter, R. (2002). Melatonin-Immune System Relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(2), 167–179. <https://doi.org/10.2174/1568026023394335>

Gunata, M., Parlakpınar, H., & Acet, H. A. (2020). Melatonin: A review of its potential functions and effects on neurological diseases. *Revue Neurologique*, 176(3), 148–165. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.07.025>

Habib, A., Nazri, M. I. B. A., & Rahman, S. A. (2023). Dataset from dried blood spot acylcarnitine for detection of Carnitine-Acylcarnitine Translocase (CACT) deficiency and Carnitine Palmitoyl Transferase 2 (CPT2) deficiency. *Data in Brief*, 48, 109090. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2023.109090>

Hardeland, R. (2019). Aging, Melatonin, and the Pro- and Anti-Inflammatory Networks. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1223. <https://doi.org/10.3390/ijms20051223>

Hargreaves, M., & Spriet, L. L. (2020). Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nature Metabolism*, 2(9), 817–828. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0251-4>

He, F., Li, J., Liu, Z., Chuang, C.-C., Yang, W., & Zuo, L. (2016). Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in Exercise. *Frontiers in Physiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00486>

Harris, M., Hammond, K., Fell, J., & Morton, J. (2018). Regulation of Muscle Glycogen Metabolism during Exercise: Implications for Endurance Performance and Training Adaptations. *Nutrients*, 10(3), 298. <https://doi.org/10.3390/nu10030298>

Hingst, J. R., Bruhn, L., Hansen, M. B., Rosschou, M. F., Birk, J. B., Fentz, J., Foretz, M., Viollet, B., Sakamoto, K., Færgeman, N. J., Havelund, J. F., Parker, B. L., James, D. E., Kiens, B., Richter, E. A., Jensen, J., & Wojtaszewski, J. F. P. (2018). Exercise-induced molecular mechanisms promoting glycogen supercompensation in human skeletal

muscle. *Molecular Metabolism*, 16, 24–34.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.07.001>

Hong, F., Pan, S., Xu, P., Xue, T., Wang, J., Guo, Y., Jia, L., Qiao, X., Li, L., & Zhai, Y. (2020). Melatonin Orchestrates Lipid Homeostasis through the Hepatointestinal Circadian Clock and Microbiota during Constant Light Exposure. *Cells*, 9(2), 489. <https://doi.org/10.3390/cells9020489>

Hong, S. H., Lee, D.-B., Yoon, D.-W., & Kim, J. (2024). Melatonin Improves Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity by Mitigating Inflammation and Activating AMPK Signaling in a Mouse Model of Sleep Fragmentation. *Cells*, 13(6), 470. <https://doi.org/10.3390/cells13060470>

Hood, D. A., & Terjung, R. L. (1990). Amino Acid Metabolism During Exercise and Following Endurance Training. *Sports Medicine*, 9(1), 23–35. <https://doi.org/10.2165/00007256-199009010-00003>

Hsu, C.-C., Sun, C.-Y., Tsai, C.-Y., Chen, M.-Y., Wang, S.-Y., Hsu, J.-T., Yeh, C.-N., & Yeh, T.-S. (2021). Metabolism of Proteins and Amino Acids in Critical Illness: From Physiological Alterations to Relevant Clinical Practice. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, 14, 1107–1117. <https://doi.org/10.2147/JMDH.S306350>

Hsu, L.-W., & Chien, Y.-W. (2023). Effects of Melatonin Supplementation on Lipid Metabolism and Body Fat Accumulation in Ovariectomized Rats. *Nutrients*, 15(12), 2800. <https://doi.org/10.3390/nu15122800>

Hu, C., Hoene, M., Plomgaard, P., Hansen, J. S., Zhao, X., Li, J., Wang, X., Clemmesen, J. O., Secher, N. H., Häring, H. U., Lehmann, R., Xu, G., & Weigert, C. (2020). Muscle-Liver Substrate Fluxes in Exercising Humans and Potential Effects on Hepatic Metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 105(4), 1196–1209. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz266>

Hu, C., Hoene, M., Plomgaard, P., Hansen, J. S., Zhao, X., Li, J., Wang, X., Clemmesen, J. O., Secher, N. H., Häring, H. U., Lehmann, R., Xu, G., & Weigert, C. (2020). Muscle-Liver Substrate Fluxes in Exercising Humans and Potential Effects on Hepatic Metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 105(4), 1196–1209. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz266>

Indiveri, C., Iacobazzi, V., Tonazzi, A., Giangregorio, N., Infantino, V., Convertini, P., Console, L., & Palmieri, F. (2011). The mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier: Function, structure and physiopathology. *Molecular Aspects of Medicine*, 32(4–6), 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.008>

Ivy, J. L. (2004). Regulation of muscle glycogen repletion, muscle protein synthesis and repair following exercise. *Journal of Sports Science & Medicine*, 3(3), 131–138.

Iwayama, K., Tanabe, Y., Tanji, F., Ohnishi, T., & Takahashi, H. (2021). Diurnal variations in muscle and liver glycogen differ depending on the timing of exercise. *The Journal of Physiological Sciences*, 71(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12576-021-00821-1>

Jensen, J., Rustad, P. I., Kolnes, A. J., & Lai, Y.-C. (2011). The Role of Skeletal Muscle Glycogen Breakdown for Regulation of Insulin Sensitivity by Exercise. *Frontiers in Physiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00112>

- Jensen, R. C., Christensen, L. L., Nielsen, J., Schrøder, H. D., Kvorning, T., Gejl, K., Højlund, K., Glinborg, D., & Andersen, M. (2018). Mitochondria, glycogen, and lipid droplets in skeletal muscle during testosterone treatment and strength training: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Andrology*, *6*(4), 547–555. <https://doi.org/10.1111/andr.12492>
- Jensen, R., Ørtenblad, N., Stausholm, M. H., Skjærbæk, M. C., Larsen, D. N., Hansen, M., Holmberg, H., Plomgaard, P., & Nielsen, J. (2021). Glycogen supercompensation is due to increased number, not size, of glycogen particles in human skeletal muscle. *Experimental Physiology*, *106*(5), 1272–1284. <https://doi.org/10.1113/EP089317>
- Jensen, T. E., & Richter, E. A. (2012a). Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. *The Journal of Physiology*, *590*(5), 1069–1076. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224972>
- Jensen, T. E., & Richter, E. A. (2012b). Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. *The Journal of Physiology*, *590*(5), 1069–1076. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224972>
- Jewell, J. L., Russell, R. C., & Guan, K.-L. (2013). Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(3), 133–139. <https://doi.org/10.1038/nrm3522>
- Joseph, T. T., Schuch, V., Hossack, D. J., Chakraborty, R., & Johnson, E. L. (2024). Melatonin: the placental antioxidant and anti-inflammatory. *Frontiers in Immunology*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1339304>
- Joshi, P. R., & Zierz, S. (2020). Muscle Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) Deficiency: A Conceptual Approach. *Molecules*, *25*(8), 1784. <https://doi.org/10.3390/molecules25081784>
- Kankuri, E., Finckenberg, P., Leinonen, J., Tarkia, M., Björk, S., Purhonen, J., Kallijärvi, J., Kankainen, M., Soliymani, R., Lalowski, M., & Mervaala, E. (2023). Altered acylcarnitine metabolism and inflexible mitochondrial fuel utilization characterize the loss of neonatal myocardial regeneration capacity. *Experimental & Molecular Medicine*, *55*(4), 806–817. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-00967-5>
- Kanungo, S., Wells, K., Tribett, T., & El-Gharbawy, A. (2018a). Glycogen metabolism and glycogen storage disorders. *Annals of Translational Medicine*, *6*(24), 474–474. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.10.59>
- Kanungo, S., Wells, K., Tribett, T., & El-Gharbawy, A. (2018b). Glycogen metabolism and glycogen storage disorders. *Annals of Translational Medicine*, *6*(24), 474–474. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.10.59>
- Katz, A. (2022). A century of exercise physiology: key concepts in regulation of glycogen metabolism in skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, *122*(8), 1751–1772. <https://doi.org/10.1007/s00421-022-04935-1>
- Kennaway, D. J. (2023). The mammalian gastro-intestinal tract is a NOT a major extra-pineal source of melatonin. *Journal of Pineal Research*, *75*(4). <https://doi.org/10.1111/jpi.12906>
- Kerksick, C. M., Arent, S., Schoenfeld, B. J., Stout, J. R., Campbell, B., Wilborn, C. D., Taylor, L., Kalman, D., Smith-Ryan, A. E., Kreider, R. B., Willoughby, D., Arciero, P.

- J., VanDusseldorp, T. A., Ormsbee, M. J., Wildman, R., Greenwood, M., Ziegenfuss, T. N., Aragon, A. A., & Antonio, J. (2017). International society of sports nutrition position stand: nutrient timing. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12970-017-0189-4>
- Kim, D.-H., Kim, S.-H., Jeong, W.-S., & Lee, H.-Y. (2013). Effect of BCAA intake during endurance exercises on fatigue substances, muscle damage substances, and energy metabolism substances. *Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry*, *17*(4), 169–180. <https://doi.org/10.5717/jenb.2013.17.4.169>
- Kim, N.-I., Kim, S.-J., Jang, J.-H., Shin, W., Eum, H., Kim, B., Choi, A., & Lee, S.-S. (2020). Changes in Fatigue Recovery and Muscle Damage Enzymes after Deep-Sea Water Thalassotherapy. *Applied Sciences*, *10*(23), 8383. <https://doi.org/10.3390/app10238383>
- Kim, S. J., Reiter, R. J., Qi, W., Tan Dx, D., & Cabrera, J. (2000). Melatonin prevents oxidative damage to protein and lipid induced by ascorbate-Fe(3+)-EDTA: Comparison with glutathione and alpha-tocopherol. *Neuro Endocrinology Letters*, *21*(4), 269–276.
- King, A. J., O'Hara, J. P., Arjomandkhah, N. C., Rowe, J., Morrison, D. J., Preston, T., & King, R. F. G. J. (2019). Liver and muscle glycogen oxidation and performance with dose variation of glucose–fructose ingestion during prolonged (3 h) exercise. *European Journal of Applied Physiology*, *119*(5), 1157–1169. <https://doi.org/10.1007/s00421-019-04106-9>
- Knuiman, P., Hopman, M. T. E., & Mensink, M. (2015). Glycogen availability and skeletal muscle adaptations with endurance and resistance exercise. *Nutrition & Metabolism*, *12*(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12986-015-0055-9>
- Kopustinskiene, D. M., & Bernatoniene, J. (2021). Molecular Mechanisms of Melatonin-Mediated Cell Protection and Signaling in Health and Disease. *Pharmaceutics*, *13*(2), 129. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020129>
- Kruk, J., Aboul-Enein, B. H., & Duchnik, E. (2021). Exercise-induced oxidative stress and melatonin supplementation: current evidence. *The Journal of Physiological Sciences*, *71*(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s12576-021-00812-2>
- Legros, C., Chesneau, D., Boutin, J. A., Barc, C., & Malpoux, B. (2014). Melatonin from Cerebrospinal Fluid but Not from Blood Reaches Sheep Cerebral Tissues Under Physiological Conditions. *Journal of Neuroendocrinology*, *26*(3), 151–163. <https://doi.org/10.1111/jne.12134>
- Leone, R. D., Zhao, L., Englert, J. M., Sun, I.-M., Oh, M.-H., Sun, I.-H., Arwood, M. L., Bettencourt, I. A., Patel, C. H., Wen, J., Tam, A., Blosser, R. L., Prchalova, E., Alt, J., Rais, R., Slusher, B. S., & Powell, J. D. (2019). Glutamine blockade induces divergent metabolic programs to overcome tumor immune evasion. *Science*, *366*(6468), 1013–1021. <https://doi.org/10.1126/science.aav2588>
- Li, D. C. W., Rudloff, S., Langer, H. T., Norman, K., & Herpich, C. (2024). Age-Associated Differences in Recovery from Exercise-Induced Muscle Damage. *Cells*, *13*(3), 255. <https://doi.org/10.3390/cells13030255>
- Li, J.-M., Zhang, Z., Kong, A., Lai, W., Xu, W., Cao, X., Zhao, M., Li, J., Shentu, J., Guo, X., Mai, K., & Ai, Q. (2023). Dietary l-carnitine regulates liver lipid metabolism via simultaneously activating fatty acid  $\beta$ -oxidation and suppressing

endoplasmic reticulum stress in large yellow croaker fed with high-fat diets. *British Journal of Nutrition*, 129(1), 29–40. <https://doi.org/10.1017/S0007114522000101>

Li, Q., & Hoppe, T. (2023). Role of amino acid metabolism in mitochondrial homeostasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1127618>

Liew, G., Tse, B., Ho, I.-V., Joachim, N., White, A., Pickford, R., Maltby, D., Gopinath, B., Mitchell, P., & Crossett, B. (2020). Acylcarnitine Abnormalities Implicate Mitochondrial Dysfunction in Patients With Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61(8), 32. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.8.32>

Ling, Z.-N., Jiang, Y.-F., Ru, J.-N., Lu, J.-H., Ding, B., & Wu, J. (2023). Amino acid metabolism in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 345. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01569-3>

Loloei, S., Sepidarkish, M., Heydarian, A., Tahvilian, N., Khazdouz, M., Heshmati, J., & Pouraram, H. (2019). The effect of melatonin supplementation on lipid profile and anthropometric indices: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(3), 1901–1910. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.04.043>

López-Soldado, I., Guinovart, J. J., & Duran, J. (2021). Increased liver glycogen levels enhance exercise capacity in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 297(2), 100976. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100976>

Lotfy, M., Khattab, A., Shata, M., Alhasbani, A., Khalaf, A., Alsaedi, S., Thaker, M., Said, H., Toumi, H. R., Alzahmi, H., Alblooshi, O., Hamdan, M., Hussein, A., Kundu, B., & Adeghate, E. A. (2024). Melatonin increases AKT and SOD gene and protein expressions in diabetic rats. *Heliyon*, 10(7), e28639. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28639>

Lundsgaard, A.-M., Fritzen, A. M., & Kiens, B. (2020). The Importance of Fatty Acids as Nutrients during Post-Exercise Recovery. *Nutrients*, 12(2), 280. <https://doi.org/10.3390/nu12020280>

Makris, A., Alevra, A. I., Exadactylos, A., & Papadopoulos, S. (2023). The Role of Melatonin to Ameliorate Oxidative Stress in Sperm Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 15056. <https://doi.org/10.3390/ijms242015056>

Marchingo, J. M., & Cantrell, D. A. (2022). Protein synthesis, degradation, and energy metabolism in T cell immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, 19(3), 303–315. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00792-8>

Margaritelis, N. V., Paschalis, V., Theodorou, A. A., Kyparos, A., & Nikolaidis, M. G. (2020). Redox basis of exercise physiology. *Redox Biology*, 35, 101499. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101499>

Markus, I., Constantini, K., Hoffman, J. R., Bartolomei, S., & Gepner, Y. (2021). Exercise-induced muscle damage: mechanism, assessment and nutritional factors to accelerate recovery. *European Journal of Applied Physiology*, 121(4), 969–992. <https://doi.org/10.1007/s00421-020-04566-4>

- Marseglia, L., D'Angelo, G., Manti, S., Rulli, I., Salvo, V., Buonocore, G., Reiter, R., & Gitto, E. (2017). Melatonin Secretion Is Increased in Children with Severe Traumatic Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(5), 1053. <https://doi.org/10.3390/ijms18051053>
- Mauriz, J. L., Collado, P. S., Veneroso, C., Reiter, R. J., & González-Gallego, J. (2013). A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *Journal of Pineal Research*, *54*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.01014.x>
- Mayo, J. C., & Sainz, R. M. (2020). Melatonin from an Antioxidant to a Classic Hormone or a Tissue Factor: Experimental and Clinical Aspects 2019. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(10), 3645. <https://doi.org/10.3390/ijms21103645>
- McCann, M. R., George De la Rosa, M. V., Rosania, G. R., & Stringer, K. A. (2021a). L-Carnitine and Acylcarnitines: Mitochondrial Biomarkers for Precision Medicine. *Metabolites*, *11*(1), 51. <https://doi.org/10.3390/metabo11010051>
- McCann, M. R., George De la Rosa, M. V., Rosania, G. R., & Stringer, K. A. (2021b). L-Carnitine and Acylcarnitines: Mitochondrial Biomarkers for Precision Medicine. *Metabolites*, *11*(1), 51. <https://doi.org/10.3390/metabo11010051>
- Megha, K. B., Arathi, A., Shikha, S., Alka, R., Ramya, P., & Mohanan, P. v. (2024). Significance of Melatonin in the Regulation of Circadian Rhythms and Disease Management. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-024-03915-0>
- Mendes, C., Lopes, A. M. de S., do Amaral, F. G., Peliciari-Garcia, R. A., Turati, A. de O., Hirabara, S. M., Scialfa Falcão, J. H., & Cipolla-Neto, J. (2013). Adaptations of the aging animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin. *Journal of Pineal Research*, *55*(3), 229–239. <https://doi.org/10.1111/jpi.12065>
- Merritt II, J. L., Norris, M., & Kanungo, S. (2018). Fatty acid oxidation disorders. *Annals of Translational Medicine*, *6*(24), 473–473. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.10.57>
- Miller, M. J., Cusmano-Ozog, K., Oglesbee, D., & Young, S. (2021). Laboratory analysis of acylcarnitines, 2020 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*, *23*(2), 249–258. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-00990-1>
- Mladenov, M., Lubomirov, L., Grisk, O., Avtanski, D., Mitrokhin, V., Sazdova, I., Keremidarska-Markova, M., Danailova, Y., Nikolaev, G., Konakchieva, R., & Gagov, H. (2023). Oxidative Stress, Reductive Stress and Antioxidants in Vascular Pathogenesis and Aging. *Antioxidants*, *12*(5), 1126. <https://doi.org/10.3390/antiox12051126>
- Moller, N., Vendelbo, M. H., Kampmann, U., Christensen, B., Madsen, M., Norrelund, H., & Jorgensen, J. O. (2009). Growth hormone and protein metabolism. *Clinical Nutrition*, *28*(6), 597–603. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.08.015>
- Monteiro, K. K. A. C., Shiroma, M. E., Damous, L. L., Simões, M. de J., Simões, R. dos S., Cipolla-Neto, J., Baracat, E. C., & Soares-Jr., J. M. (2024). Antioxidant Actions of Melatonin: A Systematic Review of Animal Studies. *Antioxidants*, *13*(4), 439. <https://doi.org/10.3390/antiox13040439>

- Morita, M., Gravel, S.-P., Hulea, L., Larsson, O., Pollak, M., St-Pierre, J., & Topisirovic, I. (2015). mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle*, *14*(4), 473–480. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.991572>
- Moslehi, M., Moazamiyanfar, R., Dakkali, M. S., Rezaei, S., Rastegar-Pouyani, N., Jafarzadeh, E., Mouludi, K., Khodamoradi, E., Taeb, S., & Najafi, M. (2022). Modulation of the immune system by melatonin; implications for cancer therapy. *International Immunopharmacology*, *108*, 108890. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108890>
- Moura, A. V., de Oliveira, D. C., Silva, A. Ap. R., da Rosa, J. R., Garcia, P. H. D., Sanches, P. H. G., Garza, K. Y., Mendes, F. M. M., Lambert, M., Gutierrez, J. M., Granado, N. M., dos Santos, A. C., de Lima, I. L., Negrini, L. D. de O., Antonio, M. A., Eberlin, M. N., Eberlin, L. S., & Porcari, A. M. (2022). Urine Metabolites Enable Fast Detection of COVID-19 Using Mass Spectrometry. *Metabolites*, *12*(11), 1056. <https://doi.org/10.3390/metabo12111056>
- Mul, J. D., Stanford, K. I., Hirshman, M. F., & Goodyear, L. J. (2015). *Exercise and Regulation of Carbohydrate Metabolism* (pp. 17–37). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.07.020>
- Murray, B., & Rosenbloom, C. (2018). Fundamentals of glycogen metabolism for coaches and athletes. *Nutrition Reviews*, *76*(4), 243–259. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy001>
- Musazadeh, V., Alinejad, H., Esfahani, N. K., Kavyani, Z., Keramati, M., Roshanravan, N., Mosharkesh, E., & Dehghan, P. (2023). The effect of L-carnitine supplementation on lipid profile in adults: an umbrella meta-analysis on interventional meta-analyses. *Frontiers in Nutrition*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1214734>
- Muscella, A., Stefano, E., Lunetti, P., Capobianco, L., & Marsigliante, S. (2020). The Regulation of Fat Metabolism during Aerobic Exercise. *Biomolecules*, *10*(12), 1699. <https://doi.org/10.3390/biom10121699>
- Noland, R. C. (2015). *Exercise and Regulation of Lipid Metabolism* (pp. 39–74). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.017>
- ON, P. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals (2020 Edition).
- Park, D.-D., Gahr, B. M., Krause, J., Rottbauer, W., Zeller, T., & Just, S. (2021). Long-Chain Acyl-Carnitines Interfere with Mitochondrial ATP Production Leading to Cardiac Dysfunction in Zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8468. <https://doi.org/10.3390/ijms22168468>
- Pasiakos, S. M., & Carbone, J. W. (2014). Assessment of skeletal muscle proteolysis and the regulatory response to nutrition and exercise. *IUBMB Life*, *66*(7), 478–484. <https://doi.org/10.1002/iub.1291>
- Peschke, E., Bähr, I., & Mühlbauer, E. (2013). Melatonin and Pancreatic Islets: Interrelationships between Melatonin, Insulin and Glucagon. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(4), 6981–7015. <https://doi.org/10.3390/ijms14046981>
- Pi, A., Villivalam, S. D., & Kang, S. (2023). The Molecular Mechanisms of Fuel Utilization during Exercise. *Biology*, *12*(11), 1450. <https://doi.org/10.3390/biology12111450>

- Posey, E. A., Bazer, F. W., & Wu, G. (2021). *Amino Acids and Their Metabolites for Improving Human Exercising Performance* (pp. 151–166). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-74180-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-74180-8_9)
- Powers, S. K., Deminice, R., Ozdemir, M., Yoshihara, T., Bomkamp, M. P., & Hyatt, H. (2020). Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? *Journal of Sport and Health Science*, *9*(5), 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2020.04.001>
- Powers, S. K., Radak, Z., Ji, L. L., & Jackson, M. (2024). Reactive oxygen species promote endurance exercise-induced adaptations in skeletal muscles. *Journal of Sport and Health Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2024.05.001>
- Purdom, T., Kravitz, L., Dokladny, K., & Mermier, C. (2018). Understanding the factors that effect maximal fat oxidation. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12970-018-0207-1>
- Reale, R., Slater, G., & Burke, L. M. (2017). Individualised dietary strategies for Olympic combat sports: Acute weight loss, recovery and competition nutrition. *European Journal of Sport Science*, *17*(6), 727–740. <https://doi.org/10.1080/17461391.2017.1297489>
- Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M., & Qin, L. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *Journal of Pineal Research*, *61*(3), 253–278. <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>
- Reiter, R. J., Sharma, R., Rosales-Corral, S., de Campos Zuccari, D. A. P., & de Almeida Chuffa, L. G. (2022). Melatonin: A mitochondrial resident with a diverse skill set. *Life Sciences*, *301*, 120612. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120612>
- Reiter, R. J., Tan, D.-X., & Fuentes-Broto, L. (2010). *Melatonin: A Multitasking Molecule* (pp. 127–151). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)81008-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81008-4)
- Reiter, R., Rosales-Corral, S., Tan, D.-X., Acuna-Castroviejo, D., Qin, L., Yang, S.-F., & Xu, K. (2017). Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(4), 843. <https://doi.org/10.3390/ijms18040843>
- Salem, A., Trabelsi, K., Jahrami, H., AlRasheed, M. M., Boukhris, O., Puce, L., Bragazzi, N. L., Ammar, A., Glenn, J. M., & Chtourou, H. (2024). Branched-Chain Amino Acids Supplementation and Post-Exercise Recovery: An Overview of Systematic Reviews. *Journal of the American Nutrition Association*, *43*(4), 384–396. <https://doi.org/10.1080/27697061.2023.2297899>
- Sánchez, A., Calpena, A., & Clares, B. (2015). Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(8), 16981–17004. <https://doi.org/10.3390/ijms160816981>
- Sarafian, M. H., Gaudin, M., Lewis, M. R., Martin, F.-P., Holmes, E., Nicholson, J. K., & Dumas, M.-E. (2014). Objective Set of Criteria for Optimization of Sample Preparation Procedures for Ultra-High Throughput Untargeted Blood Plasma Lipid Profiling by Ultra Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, *86*(12), 5766–5774. <https://doi.org/10.1021/ac500317c>
- Sato, S., Basse, A. L., Schönke, M., Chen, S., Samad, M., Altıntaş, A., Laker, R. C., Dalbram, E., Barrès, R., Baldi, P., Treebak, J. T., Zierath, J. R., & Sassone-Corsi, P. (2019). Time of Exercise Specifies the Impact on Muscle Metabolic Pathways and

- Systemic Energy Homeostasis. *Cell Metabolism*, 30(1), 92-110.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.03.013>
- Satyanarayanan, S. K., Su, H., Lin, Y.-W., & Su, K.-P. (2018). Circadian Rhythm and Melatonin in the Treatment of Depression. *Current Pharmaceutical Design*, 24(22), 2549–2555. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180803112304>
- Scheffer, D. da L., & Latini, A. (2020). Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165823. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165823>
- Schlaepfer, I. R., & Joshi, M. (2020). CPT1A-mediated Fat Oxidation, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Endocrinology*, 161(2). <https://doi.org/10.1210/endo/bqz046>
- Schoenfeld, B. J. (2012). Does Exercise-Induced Muscle Damage Play a Role in Skeletal Muscle Hypertrophy? *Journal of Strength and Conditioning Research*, 26(5), 1441–1453. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e31824f207e>
- Schweitzer, G. G., Ditzenberger, G. L., Hughey, C. C., Finck, B. N., Martino, M. R., Pacak, C. A., Byrne, B. J., & Cade, W. T. (2023a). Elevated liver glycogenolysis mediates higher blood glucose during acute exercise in Barth syndrome. *PLOS ONE*, 18(8), e0290832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290832>
- Schweitzer, G. G., Ditzenberger, G. L., Hughey, C. C., Finck, B. N., Martino, M. R., Pacak, C. A., Byrne, B. J., & Cade, W. T. (2023b). Elevated liver glycogenolysis mediates higher blood glucose during acute exercise in Barth syndrome. *PLOS ONE*, 18(8), e0290832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290832>
- Schytz, C. T., Ørtenblad, N., Birkholm, T. A., Plomgaard, P., Nybo, L., Kolnes, K. J., Andersen, O. E., Lundby, C., Nielsen, J., & Gejl, K. D. (2023). Lowered muscle glycogen reduces body mass with no effect on short-term exercise performance in men. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 33(7), 1054–1071. <https://doi.org/10.1111/sms.14354>
- Seth Monayo, Xin Liu, Yong Zhang, et al. The role of melatonin in epigenetic regulation of various diseases. Authorea. January 31, 2024.
- Shadrin, I. Y., Khodabukus, A., & Bursac, N. (2016). Striated muscle function, regeneration, and repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(22), 4175–4202. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2285-z>
- Sharman, E. H., Bondy, S. C., Sharman, K. G., Lahiri, D., Cotman, C. W., & Perreau, V. M. (2007). Effects of melatonin and age on gene expression in mouse CNS using microarray analysis. *Neurochemistry International*, 50(2), 336–344. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.09.001>
- Shimomura, Y., Murakami, T., Nakai, N., Nagasaki, M., & Harris, R. A. (2004). Exercise Promotes BCAA Catabolism: Effects of BCAA Supplementation on Skeletal Muscle during Exercise. *The Journal of Nutrition*, 134(6), 1583S-1587S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.6.1583S>
- Silva, B. R., Costa, F. C., de Lima Neto, M. F., Caetano Filho, F. F., de Assis, E. I. T., Aguiar, F. L. N., Silva, A. W. B., Martins, S. D., Araújo, V. R., Matos, M. H. T., Costa, J. J. N., & Silva, J. R. V. (2024a). Melatonin acts through different mechanisms to control

oxidative stress and primordial follicle activation and survival during in vitro culture of bovine ovarian tissue. *Domestic Animal Endocrinology*, 86, 106824. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2023.106824>

Silva, B. R., Costa, F. C., de Lima Neto, M. F., Caetano Filho, F. F., de Assis, E. I. T., Aguiar, F. L. N., Silva, A. W. B., Martins, S. D., Araújo, V. R., Matos, M. H. T., Costa, J. J. N., & Silva, J. R. V. (2024b). Melatonin acts through different mechanisms to control oxidative stress and primordial follicle activation and survival during in vitro culture of bovine ovarian tissue. *Domestic Animal Endocrinology*, 86, 106824. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2023.106824>

Silva, F. O. C. da. (2022). Relações entre exercício físico aeróbico, espécies reativas, adaptações orgânicas, desempenho físico e síndrome do overtraining: Uma revisão narrativa. *RBPFEEX - Revista Brasileira De Prescrição E Fisiologia Do Exercício*, 16(101), 110-126.

Slominski, R. M., Reiter, R. J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R. S., & Slominski, A. T. (2012). Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 351(2), 152–166. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.01.004>

Smith, J. A. B., Murach, K. A., Dyar, K. A., & Zierath, J. R. (2023). Exercise metabolism and adaptation in skeletal muscle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(9), 607–632. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00606-x>

Solberg, L. C., Horton, T. H., & Turek, F. W. (1999). Circadian rhythms and depression: effects of exercise in an animal model. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 276(1), R152–R161. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.1.R152>

Song, Y., Wang, B., Qiu, D., Xie, Z., Dai, S., Li, C., Xu, S., Zheng, Y., Li, S., & Jiang, M. (2021). Melatonin enhances metallic oxide nanoparticle stress tolerance in rice via inducing tetrapyrrole biosynthesis and amino acid metabolism. *Environmental Science: Nano*, 8(8), 2310–2323. <https://doi.org/10.1039/D1EN00244A>

Stožer, A., Vodopivec, P., & Križančić Bombek, L. (2020). Pathophysiology of exercise-induced muscle damage and its structural, functional, metabolic, and clinical consequences. *Physiological Research*, 69, 565–598. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934371>

Suzuki, R., Sato, Y., Obeng, K. A., Suzuki, D., Komiya, Y., Adachi, S., Yoshizawa, F., & Sato, Y. (2020). Energy metabolism profile of the effects of amino acid treatment on skeletal muscle cells: Leucine inhibits glycolysis of myotubes. *Nutrition*, 77, 110794. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110794>

Tain, Y.-L., Chen, C.-C., Lee, C.-T., Kao, Y.-H., Sheen, J.-M., Yu, H.-R., & Huang, L.-T. (2013). Melatonin regulates L-arginine transport and NADPH oxidase in young rats with bile duct ligation: role of protein kinase C. *Pediatric Research*, 73(1–4), 395–401. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.203>

Tan, D., Xu, B., Zhou, X., & Reiter, R. (2018). Pineal Calcification, Melatonin Production, Aging, Associated Health Consequences and Rejuvenation of the Pineal Gland. *Molecules*, 23(2), 301. <https://doi.org/10.3390/molecules23020301>

- Tan, D.-X., Manchester, L., Esteban-Zubero, E., Zhou, Z., & Reiter, R. (2015). Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules*, *20*(10), 18886–18906. <https://doi.org/10.3390/molecules201018886>
- Tarocco, A., Caroccia, N., Morciano, G., Wieckowski, M. R., Ancora, G., Garani, G., & Pinton, P. (2019). Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. *Cell Death & Disease*, *10*(4), 317. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1556-7>
- Tchekalarova, J., & Tzoneva, R. (2023). Oxidative Stress and Aging as Risk Factors for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: The Role of the Antioxidant Melatonin. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(3), 3022. <https://doi.org/10.3390/ijms24033022>
- Tchekalarova, J., & Tzoneva, R. (2023). Oxidative Stress and Aging as Risk Factors for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: The Role of the Antioxidant Melatonin. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(3), 3022. <https://doi.org/10.3390/ijms24033022>
- Tidball, J. G. (2011). Mechanisms of Muscle Injury, Repair, and Regeneration. In *Comprehensive Physiology* (pp. 2029–2062). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100092>
- Tiong, Y. L., Ng, K. Y., Koh, R. Y., Ponnudurai, G., & Chye, S. M. (2019). Melatonin Prevents Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in High Glucose-Treated Schwann Cells via Upregulation of Bcl2, NF- $\kappa$ B, mTOR, Wnt Signalling Pathways. *Antioxidants*, *8*(7), 198. <https://doi.org/10.3390/antiox8070198>
- Tonazzi, A., Giangregorio, N., Console, L., Palmieri, F., & Indiveri, C. (2021). The Mitochondrial Carnitine Acyl-carnitine Carrier (SLC25A20): Molecular Mechanisms of Transport, Role in Redox Sensing and Interaction with Drugs. *Biomolecules*, *11*(4), 521. <https://doi.org/10.3390/biom11040521>
- Tu, H., & Li, Y.-L. (2023). Inflammation balance in skeletal muscle damage and repair. *Frontiers in Immunology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1133355>
- van Vliet, S., Beals, J., Martinez, I., Skinner, S., & Burd, N. (2018). Achieving Optimal Post-Exercise Muscle Protein Remodeling in Physically Active Adults through Whole Food Consumption. *Nutrients*, *10*(2), 224. <https://doi.org/10.3390/nu10020224>
- Vasey, C., McBride, J., & Penta, K. (2021). Circadian Rhythm Dysregulation and Restoration: The Role of Melatonin. *Nutrients*, *13*(10), 3480. <https://doi.org/10.3390/nu13103480>
- Verma, A. K., Khan, M. I., Ashfaq, F., & Rizvi, S. I. (2023). Crosstalk Between Aging, Circadian Rhythm, and Melatonin. *Rejuvenation Research*, *26*(6), 229–241. <https://doi.org/10.1089/rej.2023.0047>
- Virmani, M. A., & Cirulli, M. (2022). The Role of l-Carnitine in Mitochondria, Prevention of Metabolic Inflexibility and Disease Initiation. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(5), 2717. <https://doi.org/10.3390/ijms23052717>
- Vriend, J., Sheppard, M. S., & Borer, K. T. (1990). Melatonin increases serum growth hormone and insulin-like growth factor I (IGF-I) levels in male Syrian hamsters via

hypothalamic neurotransmitters. *Growth, Development, and Aging : GDA*, 54(4), 165–171.

Washington, I. M., & van Hoosier, G. (2012). Clinical Biochemistry and Hematology. In *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (pp. 57–116). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00003-1>

Watanabe, K., Nakano, M., Maruyama, Y., Hirayama, J., Suzuki, N., & Hattori, A. (2023). Nocturnal melatonin increases glucose uptake via insulin-independent action in the goldfish brain. *Frontiers in Endocrinology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1173113>

Westman, J., Grinstein, S., & Marques, P. E. (2020). Phagocytosis of Necrotic Debris at Sites of Injury and Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03030>

Wilke, J., & Behringer, M. (2021). Is “Delayed Onset Muscle Soreness” a False Friend? The Potential Implication of the Fascial Connective Tissue in Post-Exercise Discomfort. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9482. <https://doi.org/10.3390/ijms22179482>

Williams, J. H., Batts, T. W., & Lees, S. (2013). Reduced Muscle Glycogen Differentially Affects Exercise Performance and Muscle Fatigue. *ISRN Physiology*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/371235>

Xiao, F., & Guo, F. (2022). Impacts of essential amino acids on energy balance. *Molecular Metabolism*, 57, 101393. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101393>

Xie, Z., Chen, F., Li, W. A., Geng, X., Li, C., Meng, X., Feng, Y., Liu, W., & Yu, F. (2017). A review of sleep disorders and melatonin. *Neurological Research*, 39(6), 559–565. <https://doi.org/10.1080/01616412.2017.1315864>

Xu, G., Hansen, J. S., Zhao, X. J., Chen, S., Hoene, M., Wang, X. L., Clemmesen, J. O., Secher, N. H., Häring, H. U., Pedersen, B. K., Lehmann, R., Weigert, C., & Plomgaard, P. (2016). Liver and Muscle Contribute Differently to the Plasma Acylcarnitine Pool During Fasting and Exercise in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(12), 5044–5052. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1859>

Yousefi, B., & Reiter, R. J. (2022). Melatonin in health and diseases. *Biochimie*, 202, 1. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.10.003>

Zhang, F.-F., Hao, Y., Zhang, K.-X., Yang, J.-J., Zhao, Z.-Q., Liu, H.-J., & Li, J.-T. (2024). Interplay between mesenchymal stem cells and macrophages: Promoting bone tissue repair. *World Journal of Stem Cells*, 16(4), 375–388. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v16.i4.375>

Zhou, X., Zhou, Q., He, Z., Xiao, Y., Liu, Y., Huang, Z., Sun, Y., Wang, J., Zhao, Z., Liu, X., Zhou, B., Ren, L., Sun, Y., Chen, Z., & Zhang, X. (2024). ROS Balance Autoregulating Core–Shell CeO<sub>2</sub>@ZIF-8/Au Nanoplatfor for Wound Repair. *Nano-Micro Letters*, 16(1), 156. <https://doi.org/10.1007/s40820-024-01353-0>

Zhu, T., Guan, S., Lv, D., Zhao, M., Yan, L., Shi, L., Ji, P., Zhang, L., & Liu, G. (2021). Melatonin Modulates Lipid Metabolism in Porcine Cumulus–Oocyte Complex via Its Receptors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.648209>

Zisapel, N. (2018). New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *British Journal of Pharmacology*, 175(16), 3190–3199. <https://doi.org/10.1111/bph.14116>

## ANEXO

## ANEXO – Tabela Suplementar S1

Tabela Suplementar S1: Aminoácidos investigados em músculo esquelético e fígado de ratos e seus parâmetros experimentais de detecção.

Composto	Cone (V)	Colisão (eV)	MRM (transição, m/z)
Alanina	<u>20</u>	<u>8</u>	<u>90.1-44.1</u>
Arginina	<u>30</u>	<u>21</u>	<u>175.1-70.1</u>
Asparagina	<u>20</u>	<u>6</u>	<u>133.1-87.0</u>
Ácido Aspártico	<u>14</u>	<u>10</u>	<u>134.1-88.0</u>
Ácido Glutâmico	<u>20</u>	<u>8</u>	<u>148.1-130.0</u>
Cisteína	<u>20</u>	<u>10</u>	<u>122.1 - 105.0</u>
Citrulina	<u>20</u>	<u>14</u>	<u>176.0-113.0</u>
Fenilalanina	<u>20</u>	<u>12</u>	<u>166.1-120.1</u>
Glutamina	<u>20</u>	<u>8</u>	<u>130.0-84.1</u>
Glicina	<u>20</u>	<u>7</u>	<u>76.0-30.1</u>
Histidina	<u>20</u>	<u>16</u>	<u>156.1-110.0</u>
Leucina	<u>20</u>	<u>9</u>	<u>132.1-85.1</u>
Leucina D3*	<u>20</u>	<u>10</u>	<u>135.0-89.0</u>
Lisina	<u>14</u>	<u>14</u>	<u>147.1-84.0</u>
Metionina	<u>20</u>	<u>9</u>	<u>150.0-104.0</u>
Ornitina	<u>15</u>	<u>14</u>	<u>133.0-70.0</u>
Prolina	<u>20</u>	<u>10</u>	<u>116.1-70.0</u>
Serina	<u>14</u>	<u>8</u>	<u>106.1-60.0</u>
Treonina	<u>38</u>	<u>20</u>	<u>120.1-74.0</u>
Triptofano	<u>16</u>	<u>18</u>	<u>205.1-146.0</u>
Tirosina	<u>20</u>	<u>12</u>	<u>182.1-136.1</u>
Valina	<u>20</u>	<u>10</u>	<u>118.1-72.1</u>

\*usado como padrão interno (IS)

## ANEXO – Certificado CEUA

Pró Reitoria  
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Time course do efeito da administração aguda de melatonina imediatamente após o exercício físico", protocolada sob o CEUA nº 8038210222 (ID 001634), sob a responsabilidade de **Wladimir Rafael Beck** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 07/03/2022.

We certify that the proposal "Time course of the acute melatonin administration immediately after physical exercise ", utilizing 120 Heterogenics rats (120 males), protocol number CEUA 8038210222 (ID 001634), under the responsibility of **Wladimir Rafael Beck** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 03/07/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [04/2022](#) a [04/2024](#)

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

Origem: [Biotério Central da UFSCar](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [40 a 45 dias](#)

N: [120](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [120 a 150 g](#)

Local do experimento: [Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico / Departamento de Ciências Fisiológicas / UFSCar.](#)

São Carlos, 08 de março de 2022

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

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