

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DA  
MELATONINA NO SISTEMA CARDIOVASCULAR E  
MUSCULAR DE RATOS DESNERVADOS**

**EDUARDO DE LATORRE FUSATTO**

**2012**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

EDUARDO DE LATORRE FUSATTO

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA  
ADMINISTRAÇÃO DA MELATONINA NO  
SISTEMA CARDIOVASCULAR E MUSCULAR  
DE RATOS DESNERVADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia. Área de concentração: Intervenção fisioterapêutica. Linha de pesquisa: Plasticidade Neuromuscular e Desenvolvimento Neuromotor: Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

PIRACICABA  
2012

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Unimep  
Bibliotecária: Luciene Cristina Correa Ferreira CRB-8/8235

**F993a      Fusatto, Eduardo de Latorre.**

Análise da influência da administração da melatonina no sistema cardiovascular e muscular de ratos desnervados. / Eduardo de Latorre Fusatto. – Piracicaba, SP: [s.n.], 2012.

60 f. ; il.

Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) – Faculdade de Ciência da Saúde/ Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia - Universidade Metodista de Piracicaba.

Orientador: Carlos Alberto da Silva.

Inclui Bibliografia

1. Desnervação. 2. Melanina. 3. Ratos. 4. Interleucina 6. I. Silva, Carlos Alberto da. II. Universidade Metodista de Piracicaba. III Título.



Dedico esse trabalho aos meus pais,  
José Eduardo e Sueli, ao meu irmão,  
Ricardo e a minha esposa, Helena,  
pela dedicação, paciência e apoio.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade dessa conquista, pelos conhecimentos adquiridos e pelas pessoas que conheci durante essa etapa da minha vida.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva, pela participação direta e ativa nesse caminho percorrido, por ser muitas vezes mais que um orientador, por seus conselhos, palavras, conhecimentos e experiência permitindo o crescimento intelectual, científico e profissional. Serei eternamente grato!

Ao prof. Dr. Gabriel Borges Delfino e a prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Luiza Ozores Polacow por terem me dado a honra de tê-los em minha banca, pelas contribuições, conselhos e correções que contribuíram de forma extremamente significativa para a formação do texto final dessa dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, onde tive a oportunidade de dar um importante rumo ao crescimento pessoal e profissional.

A todas as pessoas que participaram e contribuíram para realização deste trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento.

“Toda pessoa deve confiar em si mesma,  
em suas próprias energias intelectuais,  
na própria experiência, na própria iniciativa.  
São elas que servem para tornar concretas  
nossas aspirações”  
(J. W. Goethe)

## ABSTRACT

Skeletal muscle has a major role in glycemic control, therefore, the metabolic homeostasis of muscle fibers can be compromised by various factors, such as in the denervation. Melatonin is the main substance secreted by the pineal gland, the melatonin acts via two different subtypes of G-protein receptors: MT1 and MT2 and also via a membrane receptor called quinone oxidoreductase 2 (MT3). The objective of this study was to investigate in the skeletal muscle of rats after denervation, the histological and chemical metabolic events linked to the treatment with melatonin, analyzing through biochemical methodology the indicators parameters of nutritional status. Wistar rats were used and divided into four groups with  $n = 4$ , as: control group (C), Melatonin Treaty (TM), denervated (D) and denervated treated with melatonin (DT) for 7 days at 7 am to maintaining circulating concentrations, even during the day. Glycogen (GLY) was analyzed in the soleus muscle (S) and white gastrocnemius (GB), by the phenol sulfuric method while the analysis of total protein concentration was performed in S by the colorimetric method (laboratorial lit) and Interleukin 6 (IL-6) plasmatic determined by ELISA. Was also evaluated constant of glucose decay, the electrocardiographic profile, the hematological profile and behavior of fatty acids (health status). Histomorphometric analysis was performed on the soleus muscles subjected to histological processed to the coloring in hematoxylin-eosin (HE). Statistical analysis was performed using the normality test of Shapiro-Wilk, ANOVA: one way and Tukey's test,  $p < 0.05$ . The GLI of S was higher in the TM and DM groups compared to its control; muscle GB, D and DM groups were lower than C and TM groups. The weight of the soleus was greater in treated groups ( TM and DM) compared to untreated groups (C and D) as well as the concentration of total protein. The plasmatic concentration of IL6 showed itself high in group D and regained control concentrations in DT. In respect of cardiac alterations, all treated groups showed reduction in all segments of the ECG, heart rate and reflection in the reduction of blood pressure. In the histological analysis was verified an increase in the content of connective tissue and a reduction in cross-sectional area of group D and DT. Treatment with melatonin has promoted improvement in the metabolic pattern of the denervated muscles but didn't prevent atrophy.

Key words: Denervation, Melatonin, Rats, Interleukin 6.

## RESUMO

A musculatura esquelética exerce um papel importante no controle glicêmico, sendo assim, a homeostasia metabólica das fibras musculares pode ser comprometida por diferentes fatores, tal como na desnervação. A melatonina é a principal substância secretada pela glândula pineal, sua ação decorre de dois subtipos diferentes de receptores de proteína-G: MT1 e MT2 e ainda via um receptor de membrana chamado quinona oxidoreductase 2 (MT3). O objetivo deste trabalho foi investigar no músculo esquelético de ratos submetidos à desnervação, os eventos histológicos e quimiometabólicos ligados ao tratamento com melatonina, analisando por meio de metodologia bioquímica, parâmetros indicadores do status nutricional. Foram utilizados ratos Wistar, divididos em quatro grupos com n=4, sendo: grupo controle (C), Tratado Melatonina (TM), Desnervado (D) e desnervado tratado com melatonina (DT), durante 7 dias as 7 horas da manhã para manter as concentrações circulantes, mesmo durante o dia. O glicogênio (GLI) foi analisado no músculo sóleo (S) e gastrocnêmio branco (GB), por meio do método fenol sulfúrico. A análise da concentração de proteína total foi realizada no S, pelo método colorimétrico (kit laboratorial) e a Interleucina 6 (IL-6) plasmática determinada pelo método ELISA. Avaliou-se ainda a constante de decaimento da glicemia, o perfil eletrocardiográfico, o perfil hematológico e os níveis dos ácidos graxos (estado de saúde). A análise histomorfométrica foi feita no sóleo, submetido a processado histológico para coloração em Hematoxilina-Eosina (HE). Análise estatística foi realizada através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, ANOVA: one way e teste de Tukey,  $p < 0,05$ . O GLI do S foi maior no grupo TM e DM comparado ao seu controle; no músculo GB, os grupos D e DM foram menores que o C e TM. O peso do sóleo foi maior nos grupos tratados (TM e DM) em relação aos grupos não tratados (C e D), bem como a concentração de proteínas totais. A concentração plasmática de IL6 mostrou-se elevada no grupo D e recuperou as concentrações controle no DT. No que se refere às alterações cardíacas, todos os grupos tratados apresentaram redução em todos os segmentos do ECG, frequência cardíaca e reflexo na redução da pressão arterial. Na análise histológica, foi verificado aumento no conteúdo de tecido conjuntivo e redução na área de secção transversa do grupo D e DT. O tratamento com melatonina promoveu melhora no padrão metabólico da musculatura desnervada, porém não impediu a atrofia.

Palavras Chave: Desnervação, Melatonina, Ratos, Interleucina 6.

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
1.1.CONSIDERAÇÕES SOBRE DESNERVAÇÃO	15
1.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE MELATONINA	17
2. HIPÓTESE	19
3. OBJETIVO	19
3.1. OBJETIVO ESPECÍFICO	19
4.MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 DESNERVAÇÃO	20
4.2 TRATAMENTO COM MELATONINA	21
4.3 TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA (ITT)	21
4.4 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (GTT)	21
4.5 GLICOGÊNIO MUSCULAR	22
4.6 PROTEÍNA TOTAL	22
4.7 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUENCIA CARDÍACA	22
4.8 ANÁLISE ELETROMIOGRÁFICA	23
4.9 INTERLEUCINA 6	23
4.10 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE HIDRATAÇÃO	24
4.11 DOSAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES	24
4.12 ANÁLISE DA SECÇÃO TRANSVERSA DAS FIBRAS MUSCULARES	24
4.13- ANÁLISE DA DENSIDADE DE ÁREA DO TECIDO	

	11
CONJUNTIVO INTRAMUSCULAR	25
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5.RESULTADOS	26
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

## 1. INTRODUÇÃO

As funções do músculo esquelético dependem da atividade proprioceptiva, inervação motora, carga mecânica e mobilidade muscular (SILVERIA et al., 1994).

As células musculares, tecidos conjuntivos, inervação e suprimento sanguíneo constituem a armação necessária para suportar a massa e eficiência na contração, produzindo os movimentos articulares e a locomoção, pois, os movimentos físicos não envolvem somente uma intrincada coordenação neuromuscular, mas também ajustes complexos envolvendo sinalizadores químicos, aporte de substratos metabolizáveis e geração de energia (KOEPPEN e STANTON, 2009).

De acordo com a composição anatomo-fisiológica do músculo esquelético observam-se células longas, delgadas com alternância de bandas claras e escuras, multinucleadas e envolvidas por uma membrana eletricamente polarizada, chamada de sarcolema formando um conjunto contrátil (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Os canais transmissor-ativados possuem receptor para a ACh (acetilcolina) do tipo nicotínico e, após o acoplamento, permitem a entrada de sódio e cálcio na célula e a saída de potássio para o meio extracelular (pelo mesmo canal). Essa entrada inicial de sódio provoca a geração de uma onda elétrica propagável (SARGENT, 1993).

O músculo estriado esquelético é composto por diferentes fibras musculares. Fibras vermelhas (tipo I) são chamadas de contração lenta, de metabolismo aeróbio, apresentando grande quantidade de mitocôndrias, de tamanho maior e agregadas logo abaixo do sarcolema e em forma de colunas longitudinais entre as miofibrilas; a linha Z nessa fibra é mais forte e larga sendo mais resistente à lesão. Devido a sua alta capacidade oxidativa e baixa velocidade de contração, as principais vias de geração de Adenosina Trifosfato (ATP) são decorrentes dos processos oxidativos mitocôndriais. Também possuem grande capacidade de utilizar os ácidos graxos livres devido à elevada capilaridade do tecido e alta reserva de triglicerídeos (SLUTZKY, 1997).

Por outro lado, as fibras do tipo IIb, também denominadas fibras brancas ou de contração rápida, apresentam metabolismo anaeróbio, com mitocôndrias escassas, de forma elíptica, que se acumulam ao redor da banda I, a linha Z é

mais estreita, apresenta capilaridade reduzida, possuem uma alta capacidade glicolítica e também elevada velocidade de contração, estão envolvidas com atividades de alta intensidade e curta duração e o número de vesículas sinápticas e sua complexidade das fendas juncionais são maiores do que comparadas às vermelhas (SLUTZKY, 1997).

Ainda existe um tipo de fibra chamada de fibras do tipo IIa também denominada mista apresentando contração rápida e oxidativa. É um tipo de fibra de comportamento intermediário entre as fibras musculares vermelhas e brancas, porém, a presença de mioglobina em sua estrutura lhe confere características superficiais semelhantes às fibras vermelhas (LIEBER, 2000).

Dentro de um perfil metabólico, a musculatura esquelética utiliza preferencialmente a glicose como substrato energético. Cabe ressaltar que a captação muscular de hexose é modulada pelo sistema endócrino, uma vez que, a insulina promove a translocação de transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4) de reservatórios citosólicos para a membrana, elevando a captação de glicose a qual pode ser oxidada ou direcionada para formação deste reservatório energético (HENRIKSEN et al., 1990; BELL et al., 1990; RICHARSON et al., 1991). Por outro lado, tem sido demonstrado que os sistemas musculares de captação de glicose são regulados pela insulina, pela atividade metabólica tecidual ou ainda pela atividade contrátil (De FRONZO, 1988; KLIP e PAQUET, 1990).

Estudos realizados na década de 90 demonstraram que aproximadamente 70 a 85 % da glicose que é captada em repouso fica reservada na forma de glicogênio (KELEY et al., 1990). O conteúdo de glicogênio na musculatura esquelética está relacionado diretamente a capacidade aeróbia ou à capacidade de “endurance” do organismo, de forma que as alterações no perfil enzimático, das mitocôndrias e das reservas glicogênicas são os responsáveis pela eficiência muscular, assim como a depleção das reservas de glicogênio é o evento marcador do estado de exaustão muscular (TAYLOR, 1972, CURI et al., 2003).

KLIP e PAQUET (1990), propuseram que a captação de glicose estimulada pela elevação no padrão contrátil das fibras varia dependendo do tipo de músculo ou do status metabólico vigente. Provavelmente existe variação interespecie,

onde os músculos de humanos diferenciam-se por ser mais sensível à insulina (ANDERSEN et al., 1993; SARABIA et al., 1992).

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos proteicos em tirosina. Atualmente, já foram descritos alguns substratos do receptor de insulina, porém, merece destacar que quatro desses pertencem à família das proteínas IRS (substratos do receptor de insulina). Outros substratos incluem Shc, Gab-1, p60<sup>dok</sup>, Cbl, JAK2 e APS. A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2). Dentre estas se destaca a fosfatidilinositol 3 quinase (PI 3-quinase). As funções fisiológicas do IRS-1/2 foram estabelecidas através da produção de camundongos sem os genes que codificam o IRS-1 e IRS-2 (camundongos *knockout* para IRS-1 e IRS-2). O camundongo que não expressa IRS-1 apresenta resistência à insulina e retardo de crescimento, mas não é hiperglicêmico (CAVALHEIRA et al., 2002b; SAAD et al., 1994).

A insulina também estimula a *mitogen-activated protein kinase* (MAP), que é uma via iniciada com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína Grb2. A Grb2 (proteína adaptadora envolvida na transdução de sinal/sinalização celular. Nos humanos a proteína GRB2 é codificada pelo gene GRB2 ) está constitutivamente associada à SOS, proteína que troca GDP (guanosina difosfato) por GTP (guanosina trifosfato) da Ras (proteína ligada a um gene ativador) ativando-a. A ativação da Ras requer a participação da SHP2. Uma vez ativada, Ras estimula a fosforilação em serina da cascata da MAPK que leva à proliferação e diferenciação celulares. A insulina aumenta a síntese e bloqueia a degradação de proteínas através da ativação da mTOR (enzima alvo da rapamicina ligada ao anabolismo). A mTOR controla a translação de proteínas diretamente através da fosforilação da p70- ribossomal S6 quinase (p70<sup>rsk</sup>), que ativa a síntese ribossomal de proteínas através da fosforilação da proteína. A mTOR também fosforila a PHAS1 (enzima da via anabólica intracelular), que aumenta a síntese proteica via aumento da translação de proteínas (CROSS et al., 1995).

## 1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE DESNERVAÇÃO

O conhecimento dos fatores acima citado é extremamente importante para os fisioterapeutas, pois, os fenômenos adaptativos adquiridos pelas fibras musculares frente a diferentes condições tal como o desuso, permitem uma maior e melhor efetividade na interface avaliação e tratamento (ROSE e ROTHSTEIN, 1982).

Alguns recursos fisioterapêuticos, bem como farmacológicos tem sido utilizados na tentativa da melhoria das condições causadas pelo desuso. DURIGAN (2007) utilizou estimulação elétrica neuromuscular na tentativa da melhora dos padrões metabólicos e histológicos do músculo. PARDI (2010) utilizou nandrolona na musculatura imobilizada e encontrou, na dose clínica (0,7 mg/Kg/semana) importantes resultados na manutenção da homeostasia muscular. RIBEIRO (2010) utilizou o aminoácido leucina em músculo desnervado e não encontrou resultados satisfatórios em doses altas desse aminoácido (5 mM), podendo afetar o funcionamento bioquímico do organismo e possivelmente levando na prática clínica, á algumas possíveis complicações, pelo uso de forma incorreta deste suplemento. O que não aconteceu com o uso de doses menores (0,30 mM). Esse trabalho, assim, vem como mais uma tentativa de diminuir o catabolismo causado na musculatura pelo desuso.

SEDDON (1943) descreve as lesões nervosas em neuropraxia, axonotmese e neurotmese. Neuropraxia é a lesão mais leve não havendo perda de continuidade do nervo e sua perda funcional é transitória. Axonotmese é a interrupção completa do axônio e a mielina, porém, o perineuro e o epineuro estão preservados, já a neurotmese é a desconexão de um nervo, ocorrendo a lesão inclusive do perineuro e do epineuro. Neurotmese é, segundo SEDDON, a pior lesão nervosa possível. Nosso trabalho, optou assim, por utilizar essa lesão para expor o músculo na pior condição possível.

As lesões de nervos periféricos aparecem comumente na prática clínica, no qual além das alterações no padrão funcional do sistema nervoso central e periférico, os tecidos por estes inervados acabam por ser comprometidos, pelo desuso. No caso de interrupção completa de inervação motora, observa-se a perda imediata da ação voluntária deste tecido bem como sua ação reflexa, proliferação de tecido conjuntivo intramuscular, diminuição ou perda na

capacidade de gerar força, fatores esses, que de forma associada podem levar a atrofia muscular (HENRIKSEN et al., 1997; DOW et al., 2006).

Tal processo envolve mudanças quantitativas e qualitativas na expressão de genes específicos do músculo, sendo o músculo esquelético, um tecido que possui a maior capacidade de adaptação diante as diferentes condições impostas (GOLDSPINK, 2002).

Desta forma, a literatura aponta as mudanças significativas que ocorrem no tecido muscular após uma secção completa de um nervo periférico, como: resistência periférica insulínica, devida a diminuição na concentração de fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K) ligada ao receptor insulínico, diminuição do número de GLUT 4, seus transportadores e na expressão gênica do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) do GLUT 4, o que afliu na diminuição da síntese energética de glicose e protética do tecido afetado, predispondo a atrofia (SOWELL et al., 1989, CODERRE et al., 1992; HENRIKSEN et al., 1997; FORTI et al., 2004).

No estudo realizado por NUNES e MELLO (2005), em músculo sóleo de ratos desnervados durante os períodos de 3, 7 e 28 dias, foi demonstrado redução na captação de glicose pelo músculo sóleo da pata desnervado após 7 dias, em relação ao grupo controle, os demais grupos, 3 e 28 dias, não foram diferentes em relação ao o grupo controle. Além disso, na avaliação da oxidação da glicose só obtiveram significancia estatistica no grupo 7 dias em relação ao controle. Em relação à síntese de glicogênio, houve uma diminuição nos animais desnervados em todos os grupos analisados em relação ao controle. A constante de remoção da glicose sanguínea (KiTT), após 28 dias de desnervação foi significativamente superior aos animais de controle e após 3 e 7 dias.

Na análise histofisiológica realizadas com animais imobilizados foram encontradas alterações na distribuição da densidade de área do tecido conjuntivo, em músculo sóleo mais evidenciada no perimísio, onde os grupos desnervados e desnervados/eletroestimulado em dias alternados apresentaram maior densidade de área de tecido conjuntivo, quando comparado ao grupo controle e desnervado/eletroestimulado diariamente (CAIERÃO et al., 2008; DURIGAN, 2007).

A análise da área das fibras do músculo sóleo, depois de 20 dias, os grupos desnervados, desnervados/eletroestimulados diariamente e em dias alternados, apresentaram diminuição em relação ao controle, o que demonstra a não efetividade da eletroestimulação na prevenção da atrofia, pois não obteve diferença em relação ao grupo desnervado. No período de 30 dias, também não houve diferença estatística entre os grupos experimentais (CAIERÃO et al., 2008).

Em 2006 um estudo de Lima, avaliou a ação da estimulação elétrica sobre a expressão gênica da MyoD, atrogina-1 e miostatina, onde foi observado que o estímulo elétrico promoveu eventos ligados a miogênese mostrando-se eficiente no processo de recuperação muscular.

## **1.2 – CONSIDERAÇÕES SOBRE MELATONINA**

A melatonina (MEL) tem sido foco de grande interesse da pesquisa científica devido aos seus efeitos clínicos, principalmente no sistema cardiovascular (SIMKO e PAULIS, 2007). A MEL (N-acetil-5-metoxitriptamina) é a principal substância secretada pela glândula pineal. Em humanos, a ação da MEL está associada, por exemplo, com o ciclo claro/escuro, ou seja, a consolidação do sono, regulação do ritmo circadiano e da temperatura corporal (TOMÁS-ZAPICO e COTO-MONTES, 2005; BERRA e RIZZO, 2009). Sabe-se que a melatonina não exerce ação tóxica (FUENTES-BRITO et al., 2010).

Esse neurohormônio é secretado durante a fase de ausência de luz sendo o sinalizador biológico do escuro, assim, atribui-se a MEL relação com o sono em espécies de atividade diurna. Porém, o fato da secreção de MEL ocorrer à noite tanto em animais de atividade diurna quanto em animais de atividade noturna, é pouco provável que haja relação direta entre o sono e a melatonina. Portanto, a MEL pode levar a uma propensão a sonolência, mas não o induz diretamente (MARKUS, JUNIOR e FERREIRA, 2003).

A literatura aponta que existem três sítios para ligação da melatonina, denominados de receptores MT1 e MT2 ligados a proteína G, e a enzima quinona redutase 2 (QR2/Mt3) (TAMURA et al., 2006). Ambos receptores MT1 e MT2 estão envolvidos no controle de funções sistêmicas e no sistema nervoso central (HARDELAND et al., 2006). A melatonina possui uma meia vida de aproximadamente 4-6 horas após administração, sendo convertida em 6-

hidroximelatonina pela citocromo P450 1A2 no fígado e, posteriormente conjugada com ácido glicurônico ou sulfato gerando 6-sulfatoximelatonina, sendo este último um marcador eficaz para atividade da melatonina (ARENDR, 2006).

Diversos cientistas têm mostrado a expressão de receptores de melatonina tipo MT1 e MT2 em ilhotas pancreáticas de humanos e roedores, bem como em clones de INS-1 nas células  $\beta$  (PANDI-PERUMAL et al., 2008). Também há receptores MT1 e MT2 no sistema nervoso central e medula onde a melatonina exerce função analgésica na dose de 60 mg/Kg (LASTE et al., 2012).

A MEL é um produto do metabolismo do triptofano, tendo natureza tanto lipofílica quanto hidrofílica, o que facilita sua passagem através das biomembranas (sem que seja necessária a ligação com algum receptor específico), podendo, assim, exercer sua ação em estruturas citosólicas ou nucleares (DOBSAK et al., 2003, BERRA e RIZZO, 2009).

Tem sido demonstrado que a MEL pode modular a transmissão de sinais cálcio dependentes devido à sua fixação à calmodulina e influenciar diretamente no sistema da adenilil-ciclase e fosfodiesterase (DOBSAK et al., 2003). A ligação da MEL com a calmodulina pode ser um mecanismo molecular pelo qual a MEL inibe a formação de isoformas da enzima óxido nítrico sintase (TAMURA et al., 2006). A MEL pode ainda, modular diretamente os canais de cálcio voltagem-dependente no coração influenciando a fisiologia cardíaca (DOBSAK et al., 2003).

Segundo estudos a MEL auxilia no tratamento do câncer, pois estimula a atividade anti-mitótica do sistema imune, participa da regulação da fisiologia gastrointestinal, da função cardiovascular, da função renal, da função reprodutora e da fisiologia óssea, possui funções anti-inflamatórias (REITER et al., 2003; JARZYŃKA et al., 2006). No que tange aos benefícios da melatonina para a musculatura esquelética tem sido demonstrado o potencial terapêutico no tratamento da distrofia muscular Duchenne, pois previne apoptose no músculo esquelético, promove aumento no número de células satélite e auxilia na regeneração da célula muscular lesada (CHAHBOUNI et al., 2010, WANG et al., 2010, YOUSSEF HIBAOU et al., 2011, STRATOS et al., 2012).

Assim, a melatonina aumenta indiretamente a produção de enzimas antioxidantes como a glutathioneperoxidase, superóxido dismutase e glutathione, essa ação ocorre em curtos prazos, porém em altas concentrações (100 mg/Kg) e

promove a redução da IL-6 (TAHAN et al., 2004 e 2010).

## **2. HIPÓTESE**

A hipótese desse estudo é que a melatonina tem efeito protetor na musculatura periférica impedindo a queda dos níveis de glicogênio muscular, da proteína total, diminua a IL-6 e mantenha a histologia a níveis controle.

## **3. OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi investigar no músculo esquelético de ratos submetidos à desnervação, os eventos ligados ao tratamento com melatonina, analisando o perfil eletrocardiográfico e através de metodologia bioquímica, parâmetros indicadores do status nutricional.

### **3.1. OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Realizar um estudo direcionado a determinação da dose efetiva de melatonina
- Avaliar o estado de saúde dos animais tratados após estabelecer a dose de melatonina
- Acompanhar o perfil eletrocardiográfico de ratos controle e tratados com melatonina;
- Aplicar o teste de tolerância à insulina (ITT) e o teste de tolerância à glicose (GTT) para avaliar o índice de decaimento da glicemia e a responsividade das ilhotas pancreáticas em animais tratados com a melatonina;
- Avaliar as reservas glicogênicas dos músculos do membro posterior de ratos controles e submetidos à desnervação durante 7 dias, além do efeito do tratamento com a melatonina, bem como a concentração plasmática de proteínas totais.
- Avaliar o conteúdo de proteínas totais dos músculos sóleo normal, desnervado e tratado com Melatonina;

- Avaliar A IL-6 dos grupos controle, tratados com a melatonina, desnervados e desnervado tratado com melatonina
- Avaliar as condições histológicas dos músculos nas diferentes condições experimentais.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

**Animais:** Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rathus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), com 3 a 4 meses de idade com peso de 200 a 300 g da ANILAB® localizada na cidade de Paulínia - SP, os quais receberam água e alimentação a vontade (*ad libitum*) sendo mantidos em ambiente com temperatura constante de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz acesa a partir das 6 horas, sendo mantidos em gaiolas coletivas contendo no máximo 5 animais e distribuídos segundo a tabela.

Tabela 1- Distribuição dos ratos em grupos experimentais, n=6.

Controle
Tratado com Melatonina – 7 dias com a dose de 5 mg/Kg
Desnervado - 7 dias
Desnervado Tratado com Melatonina - 7 dias com a dose de 5 mg/Kg

Devido à anestesia e a cirurgia para a desnervação dos animais, tivemos algumas perdas amostrais reduzindo o n=4.

##### 4.1 DESNERVAÇÃO

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg), a pata posterior esquerda tricotomizada e 1 cm do nervo isquiático foi seccionado e retirado segundo proposta de Corderre et. al. (1992).

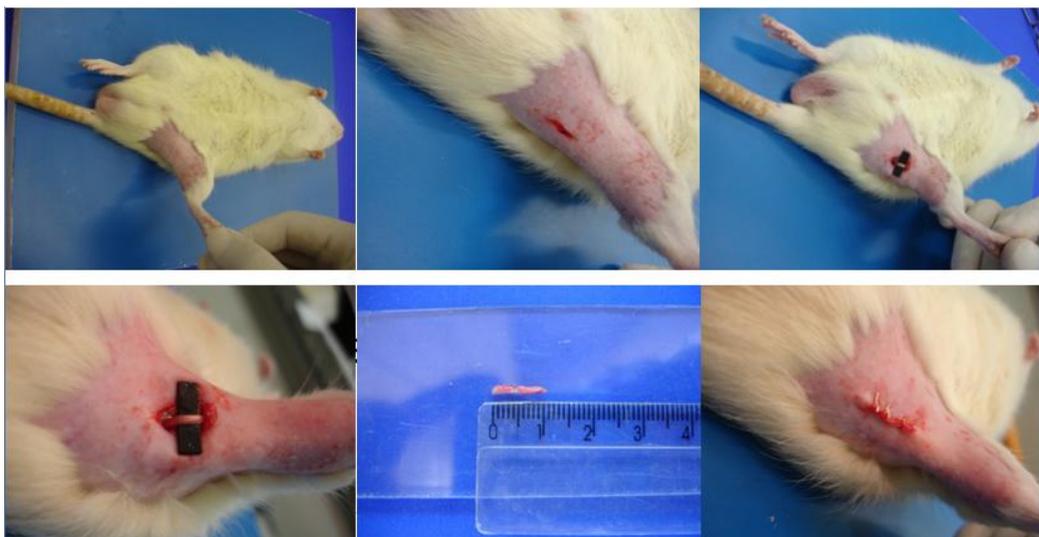


Figura 1. Procedimento utilizado para desnervação. A figura mostra as fases desde a localização do nervo até a retirada de 1 cm.

#### **4.2 TRATAMENTO COM MELATONINA**

A Melatonina (Sigma-Aldrich) foi administrada na dose de 5 mg/Kg diluídas em água deionizada e injetada via intraperitoneal (IP) ou ainda na dose de 10 mg/Kg no estudo de doses. A dose foi administrada durante 7 dias as 7 horas da manhã no intuito de manter as concentrações circulantes mesmo durante o dia (MALHOTRA et al., 2004).

#### **4.3 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)**

Para a realização do ITT, os ratos foram anestesiados e após 10 minutos da indução anestésica foi realizado um corte na cauda do animal por onde uma alíquota de sangue foi coletada e a glicemia avaliada através de fita usada em glicoteste determinando o tempo zero. A seguir foi administrado insulina (2 U/Kg/ip - Biohulin) seguido de coleta de sangue nos tempos 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min e 30 min e a glicemia novamente avaliada (RAFACHO et al., 2007).

#### **4.4 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)**

Para avaliação do GTT, os animais foram anestesiados e após 10 minutos da indução anestésica foi realizado um corte na cauda do animal por onde uma

alíquota de sangue foi coletada e a glicemia avaliada através de fita usada em glicoteste determinando o tempo zero. A seguir foi administrado glicose (2 g/Kg/ip) seguido de coleta de sangue nos tempos 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min e a glicemia novamente avaliada (RAFACHO et al., 2007).

#### **4.5 GLICOGÊNIO MUSCULAR**

Após anestesia, amostras dos músculos sóleo e gastrocnêmio branco foram retiradas e digeridas em KOH 30 % a quente, o glicogênio foi precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos. O glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol, segundo a proposta de SIU et al., (1970). Os valores foram expressos em mg/100 mg de peso úmido.

#### **4.6 PROTEÍNA TOTAL (PT)**

Para a determinação da proteína total, foi utilizado o kit laboratorial Protototal da Laborlab. Neste procedimento, no dia da coleta muscular retirou-se uma alíquota do músculo sóleo sendo prontamente embebida em uma solução de ácido perclórico e posteriormente digeridas em politron (homogeneizador) e o extrato obtido foi centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos, após este período, foi homogeneizado e incubado durante 15 minutos à 37°C. Retirado do banho, depois de resfriados, o conteúdo foi determinado através de colorimetria em espectrofotômetro a 540 nm.

#### **4.7 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA**

Durante todo o período experimental, uma vez por semana e no final do período, foi verificada a pressão arterial dos animais do grupo controle e tratado melatonina por meio da conexão de um pletismógrafo (BP-2000 Blood Pressure Analysis System™) à cauda dos animais, em sala com isolamento acústico e diminuição de quaisquer fontes de ruído que pudessem interferir nesta avaliação. Os ratos foram retirados do biotério e mantidos por 30 minutos no laboratório de experimentação para que pudessem se adaptar ao ambiente. Dois ratos, de grupos alternados, foram colocados no aparelho, cada um dentro de um

compartimento retangular adequado ao tamanho do animal, onde permaneceram por 5 minutos sobre uma plataforma aquecida a 36 °C e com a cauda já conectada ao “cuff” do aparelho. Após 5 minutos de adaptação do animal ao aparelho, este foi acionado e as medidas de pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca foram coletadas. Em cada troca de animal cada compartimento retangular foi lavado com sabão neutro e secado para evitar que os odores liberados pelos ratos anteriormente analisados pudessem interferir nas análises dos ratos subseqüentes. As análises foram realizadas uma vez por semana entre 8:00 e 12:00 h, segundo Kang et al., 2006.

#### **4.8 ANÁLISE ELETROCARDIOGRÁFICA**

Para a avaliação das ondas e intervalos eletrocardiográficos, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg/ip), mantidos em posição supina, com respiração espontânea para registro do ECG. Os eletrodos foram conectados aos canais do computador (Heart Ware System) e registradas três derivações bipolares (DI, DII e DIII) e nas três derivações amplificadas (aVR, aVL e aVF) com sensibilidade 2 N e velocidade de 50 mm/segundo. O intervalo QT foi medido em dez batimentos consecutivos, do início do complexo QRS ao ponto de retorno da onda T isoeletrica definido como segmento TP. O intervalo QT foi corrigido pela frequência cardíaca usando a fórmula de Bazett ( $QTc = QT / \sqrt{RR}$ ) e posteriormente foi calculada a dispersão do intervalo QTc, subtraindo o intervalo QTc mais curto do QTc mais longo ( $QTcd = QTc \text{ Max} - QTc \text{ min}$ ). As análises foram feitas por um único avaliador para minimizar as divergências na medida da dispersão (COSTA , 2008).

A avaliação eletrocardiográfica foi realizada no 7 dia de tratamento.

#### **4.9 INTERLEUCINA 6**

A concentração plasmática da interleucina 6 foi realizada pelo método ELISA (Kit ReD Systems, Minneapolis, MN), com concentrações mínimas detectáveis de 0,9, 2,0, 2,0 e 0,2 pg/ml respectivamente, conforme descrito por Ostrowski et al. (1999).

#### **4.10 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE HIDRATAÇÃO**

Na avaliação do conteúdo de água muscular, foi utilizado a desidratação em estufa a 50°, onde o músculo sóleo foi pesado e colocado em um cadinho de porcelana previamente desidratado e o peso do músculo avaliado com balança analítica a cada hora até atingir o peso constante.

#### **4.11 DOSAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES**

Para determinação da concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGL) foi utilizado o método proposto por REGOUW (1971). O método consistiu na extração do AGL através de um solvente seletivo, onde o extrato é tratado com uma mistura reagente que contém nitrato de cobre, havendo em consequência disto, a formação de um sabão de cobre. O metal assim ligado reage com o dietilditilcarbamato, produzindo uma coloração cuja intensidade é diretamente proporcional ao teor de AGL que é medida espectrofotometricamente em 435 nm.

#### **4.12 - ANÁLISE DA SECÇÃO TRANSVERSA DAS FIBRAS MUSCULARES**

Segmentos do ventre do músculo sóleo foram fixados em solução tamponada de formol a 10% e processados para inclusão em paraplast. Utilizou-se cortes não seriados de 7 µm de espessura que foram corados com hematoxilina-Eosina (HE).

Foram selecionados 20 cortes nos quais foram escolhidas 15 imagens com áreas iguais e para a captação e análise das imagens, utilizando-se um *software* Image Pró-plus® 6.2, e uma câmera digital (JVC) acoplada a um microscópio (Zeiss) com integração a um microcomputador. Todas as imagens foram captadas com uma objetiva 20x. Para a análise da secção transversa das fibras foi utilizado uma tela quadriculada, composta por 80 quadrados, com 63 intersecções de retas. A intersecção de retas que coincidia na fibra muscular, esta era delimitada e o programa gerava um número correspondente à área da fibra, sendo analisadas 10 fibras por área, escolhidas de forma aleatória. Foram analisadas 150 fibras musculares em cada grupo experimental (MANDARIM DE LACERDA, 2010).

#### **4.13- ANÁLISE DA DENSIDADE DE ÁREA DO TECIDO CONJUNTIVO INTRAMUSCULAR**

A densidade de área de tecido conjuntivo (em %) foi obtida por meio da planimetria por contagem de pontos (MATHIEU et al, 1981; MANDARIN DE LACERDA, 2010), que através do *software* Image Pró-Plus® 6.2, proporcionou a visualização em uma tela quadriculada. A intersecção de retas que coincidiam sobre o tecido conjuntivo foram contados e a porcentagem de área foi calculada.

$$\text{Resultado} = \frac{\text{Número de pontos} \times 100}{165} \quad (\text{número de pontos} \times 100/165)$$

#### **4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Na avaliação estatística foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido de ANOVA e teste de Tukey,  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

Inicialmente optou-se por realizar um estudo no intuito de determinar a concentração de melatonina que melhor produzisse resposta tendo como foco a sensibilização dos tecidos periféricos. Esta opção está baseada no fato de não haver consenso quanto a concentração ideal a ser empregada em estudos de cunho metabólico. As doses selecionadas foram de 5 mg/Kg e de 10 mg/Kg, sendo escolhido os testes de tolerância a glicose (GTT) e de tolerância a insulina (ITT).

Na análise do GTT utilizamos como parâmetro de análise a área sob a curva após 120 minutos de teste, sendo observado que os animais tratados com melatonina na dose de 5 mg/Kg apresentaram valores 94% menores se comparado ao controle, por outro lado, o grupo tratado com a concentração de 10mg/Kg, não diferenciou do controle (figura 1). O mesmo perfil de análise foi realizado aplicando-se o ITT, no qual utilizou-se como índice de avaliação a porcentagem de decaimento da glicemia por minuto (KITT/min), sendo observado que a velocidade de decaimento da glicemia dos ratos tratados com melatonina 5mg/Kg não diferiu do controle, enquanto no grupo tratado com melatonina na concentração de 10 mg/Kg foi observado valores 29% menores em relação ao controle (figura 2).

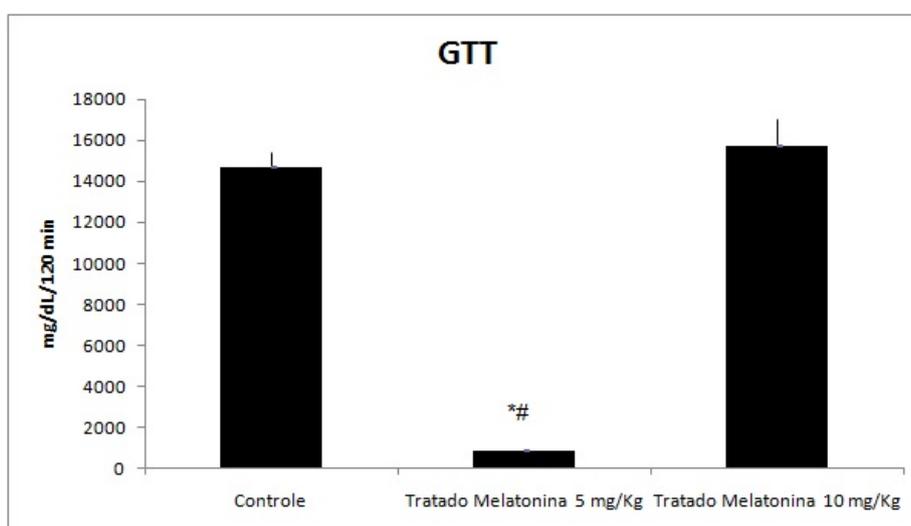


Figura 1: Representação da área sob a curva no teste de tolerância a glicose (GTT) de ratos controle, tratado com melatonina 5 mg/Kg e tratado melatonina 10 mg/Kg. Os valores representam a média  $\pm$  epm, n=4. \* p<0,05 em relação ao controle, # p<0,05 em relação ao tratado com melatonina 10 mg/Kg.

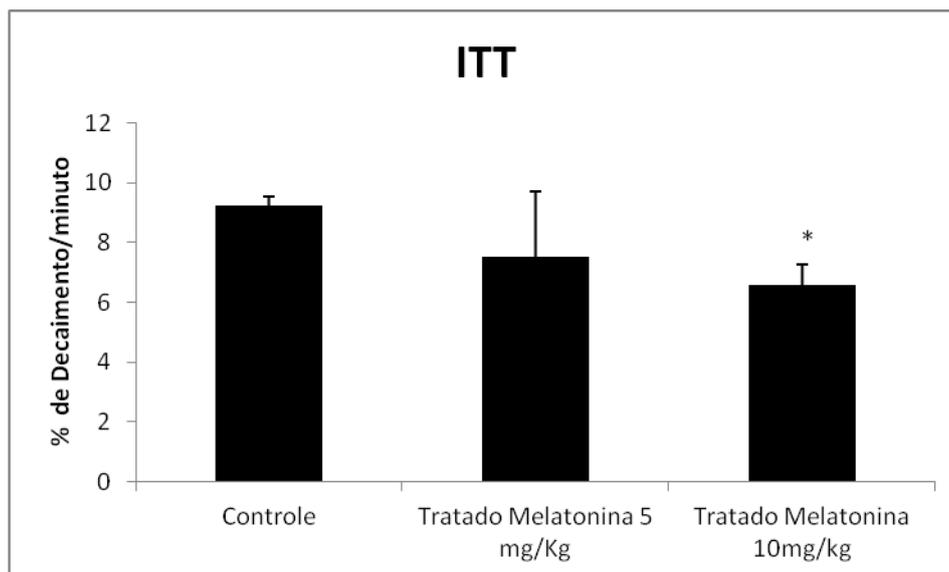


Figura 2: Representação da constante de decaimento da glicemia (KITT) no teste de tolerância a insulina de ratos controle, tratado com melatonina 5 mg/Kg e tratado melatonina 10 mg/Kg. Os valores representam a média  $\pm$  epm, n=4. \*  $p < 0,05$  em relação ao controle.

Uma vez constatado que a melatonina na concentração de 5 mg/Kg, exerceu ação de secretagogo, sem interferir na sensibilidade periférica, considerando-se o tempo do tratamento aqui descrito, passou-se a avaliar o conteúdo muscular de glicogênio, reserva reflexo da ação insulínica e escolhidos para o estudo os músculos sóleo e o gastrocnêmio branco, por serem músculos de tipagem de fibras diferentes, sendo o sóleo tipicamente fibras do tipo I (vermelhas) e gastrocnêmio branco tipicamente fibras do tipo II (branca).

Os resultados mostraram que o conteúdo de glicogênio do músculo sóleo do grupo tratado com melatonina foi 21% maior se comparado ao controle, enquanto, o desnervado teve suas reservas reduzidas em 37% se comparado ao controle e 48% se comparado ao grupo tratado melatonina. No mesmo perfil de análise, foi observado que o grupo desnervado tratado com melatonina apresentou reservas 28% e 40% menores se comparado ao controle e ao tratado com melatonina, respectivamente, não havendo diferença estatística entre o grupo desnervado e desnervado tratado. (figura 3).

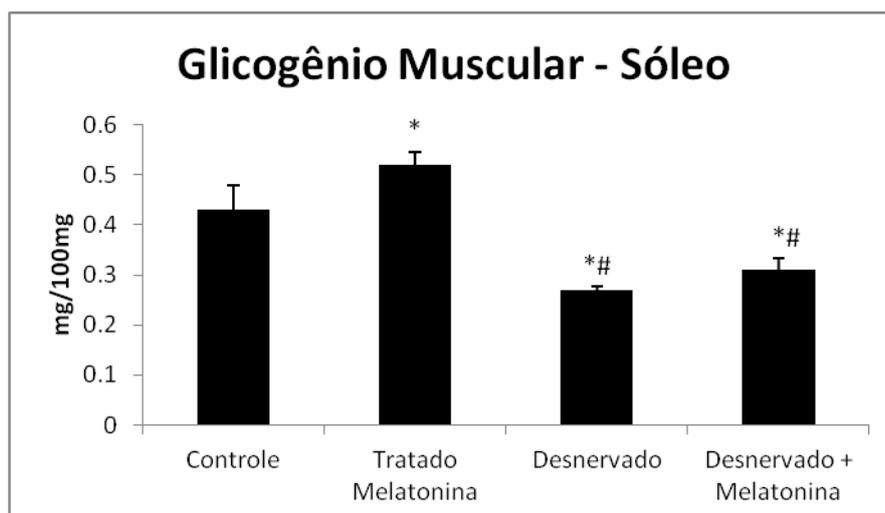


Figura 3: Conteúdo de glicogênio do músculo sóleo de ratos controle, tratado com melatonina, desnervado e desnervado tratado com melatonina. Os valores representam a média  $\pm$  epm,  $n=4$ . \* $p<0,05$  com relação ao controle; # $p<0,05$  com relação aos tratados com melatonina.

A análise do conteúdo glicogênico do músculo gastrocnêmio porção branca, mostrou que o glicogênio do grupo desnervado foi 43% menor do que o controle e 50% menor que o grupo tratado melatonina, já o grupo desnervado tratado com melatonina apresentou reservas 50% menores em relação ao controle e 56% menor com relação ao grupo tratado melatonina, porém não foi verificada diferença entre desnervado e desnervado tratado (figura 4).

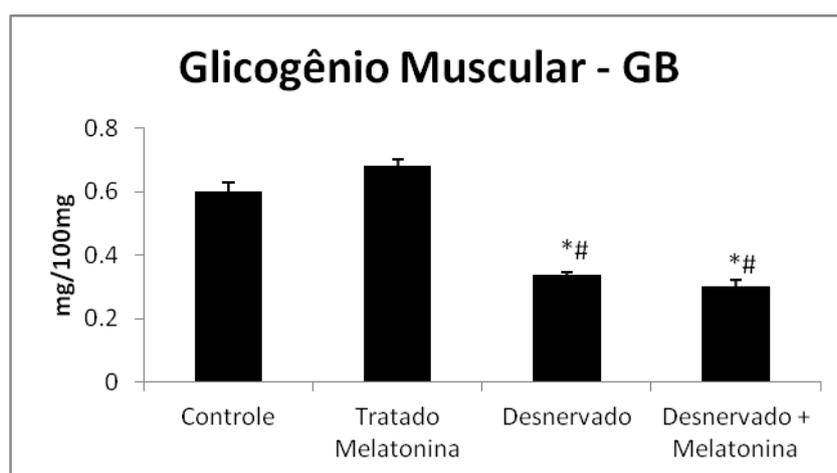


Figura 4: Conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio porção branca (GB) de ratos controle, tratado com melatonina (10mg/Kg), desnervado e desnervado tratado com melatonina. Os valores representam a média  $\pm$  epm,  $n=4$ . \*  $p<0,05$  em relação ao controle; # $p<0,05$  com relação ao tratado melatonina.

Uma vez determinado a dose efetiva surgiu a preocupação do tratamento promover alterações em padrões hematimétricos. Para dirimir a dúvida foi realizado a avaliação de 3 padrões indicativos de anemia ou reações imunológica e não foi verificado diferença entre os grupos como pode ser verificado na tabela 2. Na mesma tabela pode ser verificado que a concentração plasmática de ácidos graxos livres foram reduzidas em 16% devido ao tratamento com melatonina.

Tabela 2. Padrão hematológico e concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGL) de ratos controle e tratados com melatonina 5 mg/Kg. Os valores correspondem a média  $\pm$  epm, n=5.

	Hemoglobina ( g/dL)	Hematócrito (%)	Leucometria (x10 <sup>6</sup> )	AGL (mmol/L)
Controle	12,73 $\pm$ 0,8	24 $\pm$ 5,0	6,12 $\pm$ 0,3 x10 <sup>6</sup>	0,50 $\pm$ 0,03
Tratado	13,17 $\pm$ 0,5	30,6 $\pm$ 2,1	6,26 $\pm$ 0,3 x10 <sup>6</sup>	0,42 $\pm$ 0,05

Quando se avalia parâmetros que envolvem a recuperação metabólica da musculatura, atenção especial deve ser direcionada ao peso do músculo sendo escolhido neste estudo o músculo sóleo devido a maior facilidade de identificação dos limites anatômicos.

Os dados mostram que o sóleo do grupo tratado melatonina apresentou peso 14% maior do que o controle. Por outro lado, o grupo desnervado apresentou peso 25% e 34% menores se comparado ao controle e ao tratado melatonina. Já o grupo desnervado tratado com melatonina apresentou valores 17% e 25% menores do que o grupo tratado melatonina e desnervado, respectivamente, como pode ser observado na figura 5.

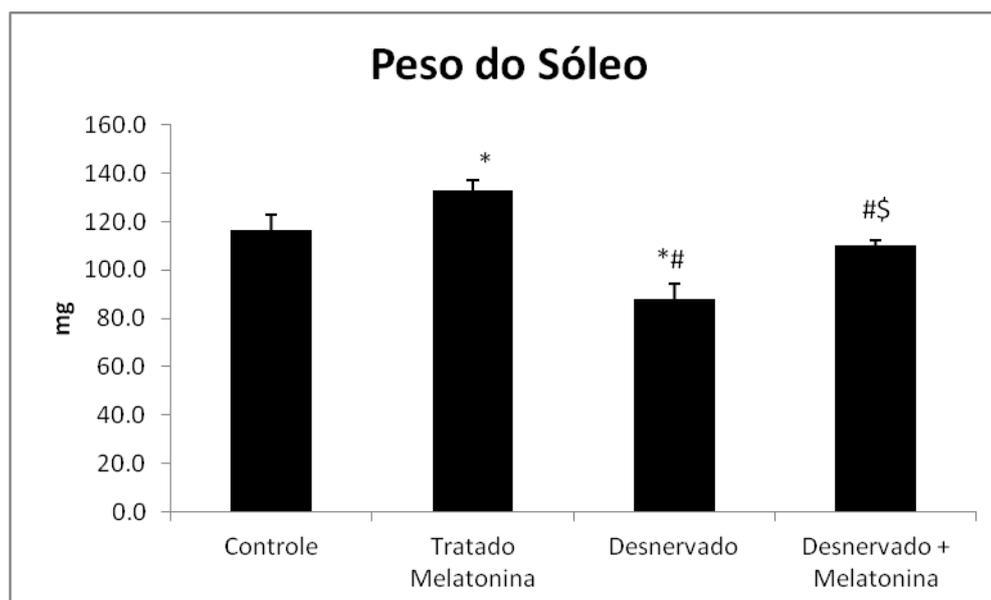


Figura 5: Peso (mg) do músculo sóleo de ratos controle, tratado com melatonina (10g/kg), desnervado e desnervado tratado com melatonina. Os valores representam a média  $\pm$  epm, n=4. \* $p < 0,05$  com relação ao controle; # $p < 0,05$  com relação ao tratado melatonina, \$ comparado ao desnervado.

A partir do reflexo do tratamento sobre o peso, passou-se a avaliar o conteúdo de proteínas totais. Nesta avaliação, os dados mostraram que no grupo tratado melatonina, o sóleo apresentou concentração de proteína total 23,86% maior do que o controle. Por outro lado, o grupo desnervado apresentou proteína total 23% e 38% menor se comparado ao controle e ao tratado melatonina. No que se refere ao grupo desnervado tratado com melatonina foi verificado valores 27% menores do que o grupo tratado melatonina e 18% maiores se comparado ao grupo desnervado não tratado, como pode ser observado na figura 6.

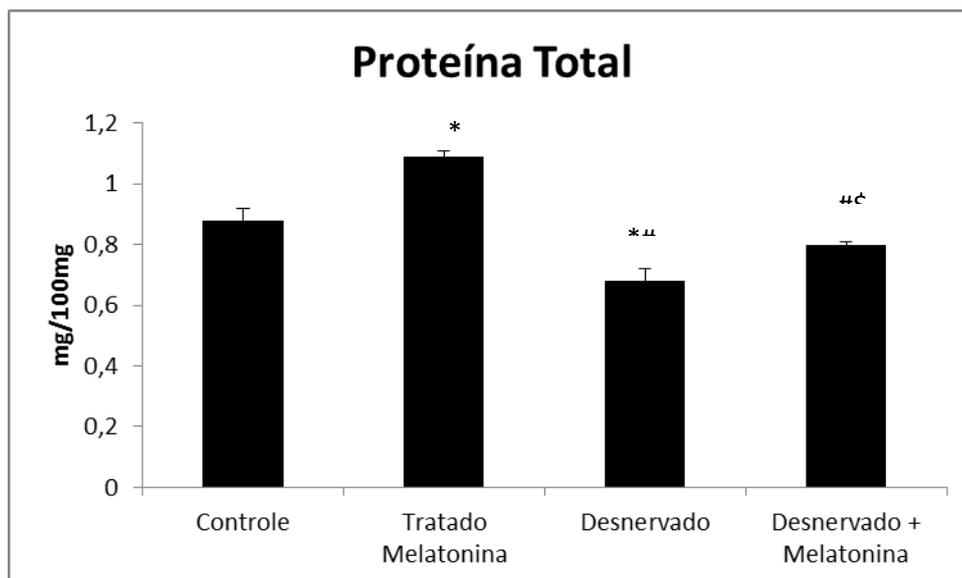


Figura 6: Conteúdo de proteína total do músculo sóleo de ratos controle, tratado com melatonina (10 mg/Kg), desnervado e desnervado tratado com melatonina (10 mg/Kg). Os valores representam a média  $\pm$  epm, n=4. \*  $p < 0,05$  em relação ao controle; #  $p < 0,05$  com relação ao tratado melatonina; \$  $p < 0,05$  com relação ao desnervado.

Uma vez que foi verificada alterações no peso optou-se por verificar se o tratamento estaria elevando o conteúdo de água no músculo, e os dados mostraram que o índice de desidratação atingiu em média 74%, não diferenciando entre os grupos controle e tratado com melatonina, como mostra a figura 7.

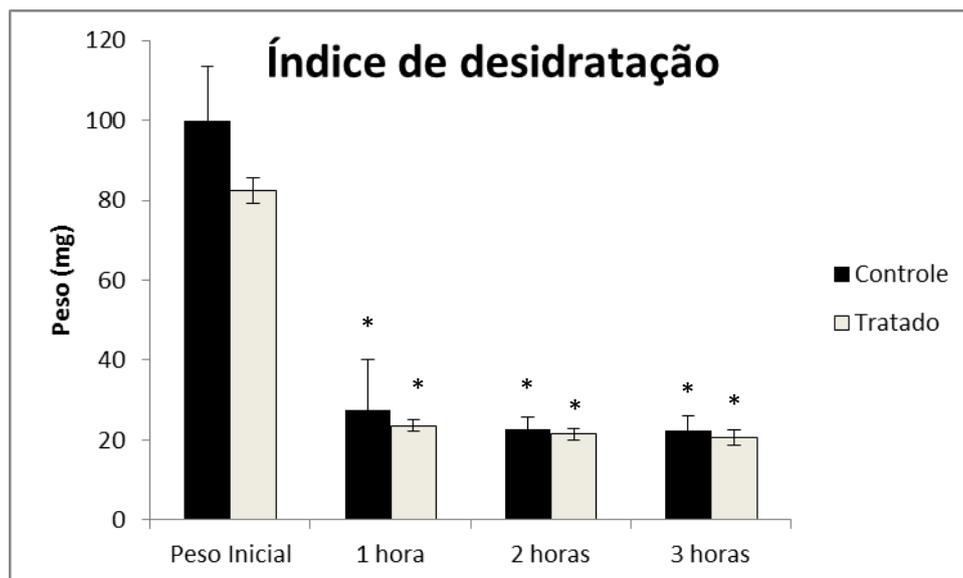


Figura 7: Avaliação do índice de desidratação definida a partir do peso (mg) do músculo sóleo de ratos controle e tratado com melatonina (5 mg/Kg). Os valores representam a média  $\pm$  epm, n=4. \*  $p < 0,05$  em relação ao controle representado pelo peso inicial. Os números 2, 3 e 4 representam as horas subsequentes da pesagem.

A observação de modificações metabólicas e teciduais, instigou a avaliação da concentração plasmática de interleucina 6 (IL-6), sendo observado que o tratamento de músculos normais com melatonina (10 mg/Kg), não alterou a concentração da citocina, fato contrário ocorreu no músculo desnervado onde foi observado elevação na secreção atingindo valores 11% maiores. Por sua vez, foi observado que no grupo desnervado tratado com a melatonina as concentrações foram similares ao controle, como mostra a figura 8.

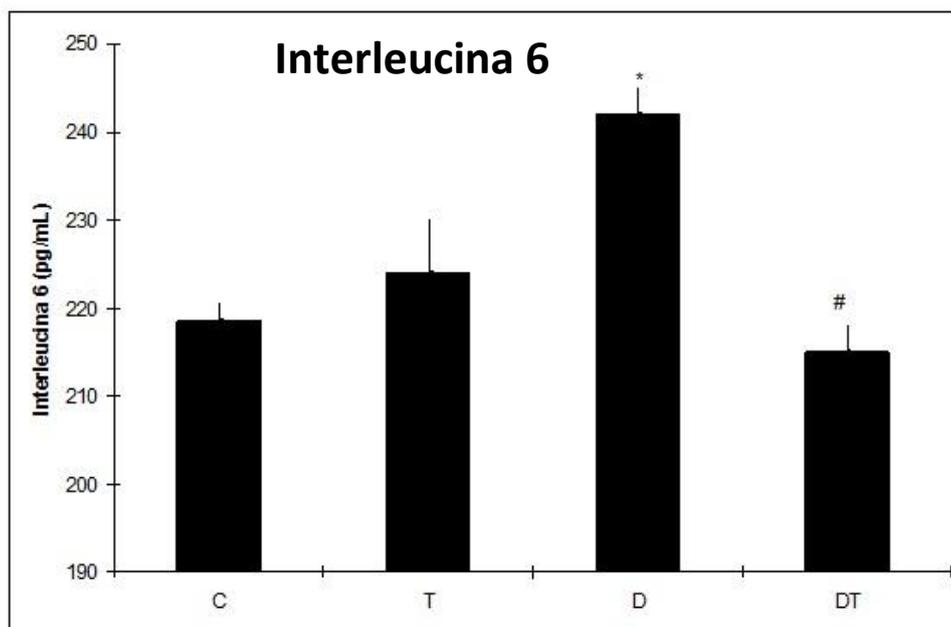


Figura 8. Concentração plasmática de Interleucina 6 (pg/mL) de ratos controle (C ), tratados com melatonina (T, 5 mg/Kg), desnervado (D) e desnervado tratado com melatonina (DT). Os valores correspondem a média  $\pm$  epm, n= 4. \* $p < 0,05$  comparado ao controle, # $p < 0,05$  comparado ao desnervado.

Dentro de uma análise mais ampla que dimensiona-se a amplitude do efeito da melatonina, atenção especial foi direcionada ao comportamento cardíaco iniciando pela avaliação do comportamento da frequência cardíaca onde foi observado redução de 19 % no grupo tratado com a melatonina, como pode ser verificado na figura 9. A seguir, foram avaliados segmentos do eletrocardiograma com ênfase nas ondas e nos segmentos sendo constatado redução no intervalo PR, QTc e no complexo QRS atingindo 21%, 10% e 29%, respectivamente (vide figura 10). Com relação às demais características das ondas eletrocardiográfica, tais como amplitude e tempo, não foi observado diferença estatística.

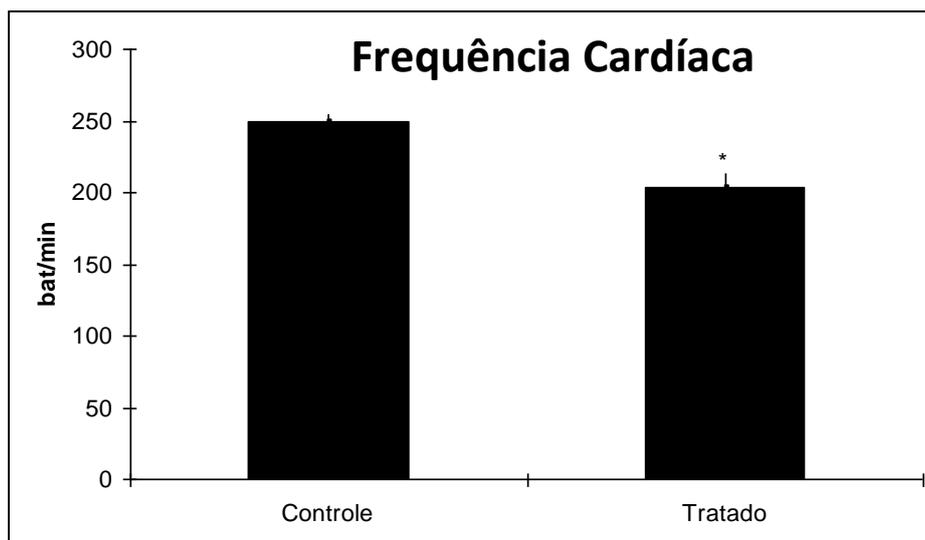


Figura 9. Frequência cardíaca (bat/min) em ratos normais e tratados com melatonina 5 mg/Kg durante 7 dias. Os valores correspondem a média  $\pm$  epm, n=8. \*p<0,05 comparado ao controle.

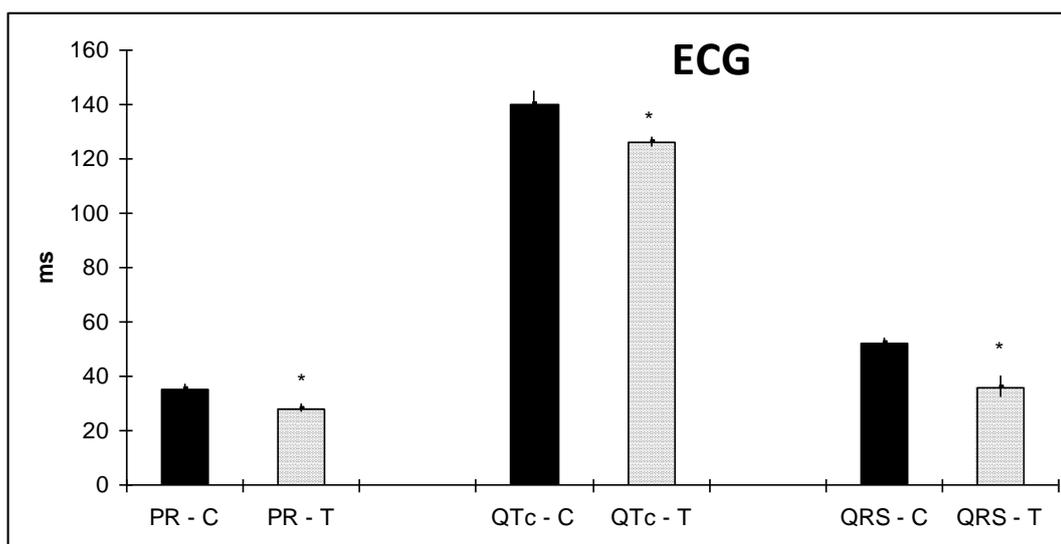


Figura 10. Intervalos PR, QTc e complexo QRS do eletrocardiograma representado em milissegundos (ms) de ratos controle (C) e tratados com melatonina 5 mg/Kg durante 7 dias (T). Os valores correspondem à média  $\pm$  epm, n=8. \* p< 0,05 comparado ao controle

Baseado nos reflexos sobre a função cardíaca optou-se por analisar a pressão arterial e foi observado que o grupo tratado com melatonina apresentou redução de 10% na pressão sistólica, 28% na pressão diastólica e 28% na pressão média, como mostra a figura 11.

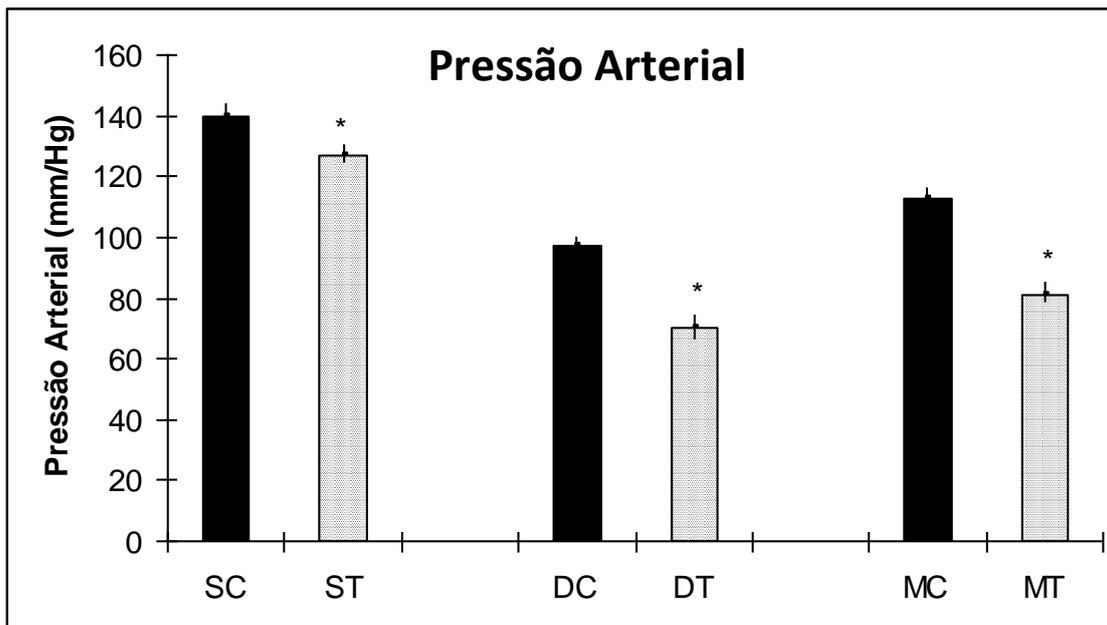


Figura 11. Pressão arterial (mm/Hg) sistólica (S), diastólica (D) e média (M) de ratos controle (C) e tratados com melatonina 5 mg/Kg durante 7 dias (T). Os valores correspondem à média  $\pm$  epm, n=8. \*  $p < 0,05$  comparado ao controle.

Na interface entre as vias de controle metabólico muscular, deu-se início a análise histológica realizada no músculo sóleo sendo observado que o grupo tratado melatonina apresentou 150% mais tecido conjuntivo se comparado ao grupo controle, por sua vez, no grupo desnervado também foi observado aumento no conjuntivo atingindo 140% em relação ao controle. O tratamento com melatonina não alterou a porcentagem (%) deste tecido

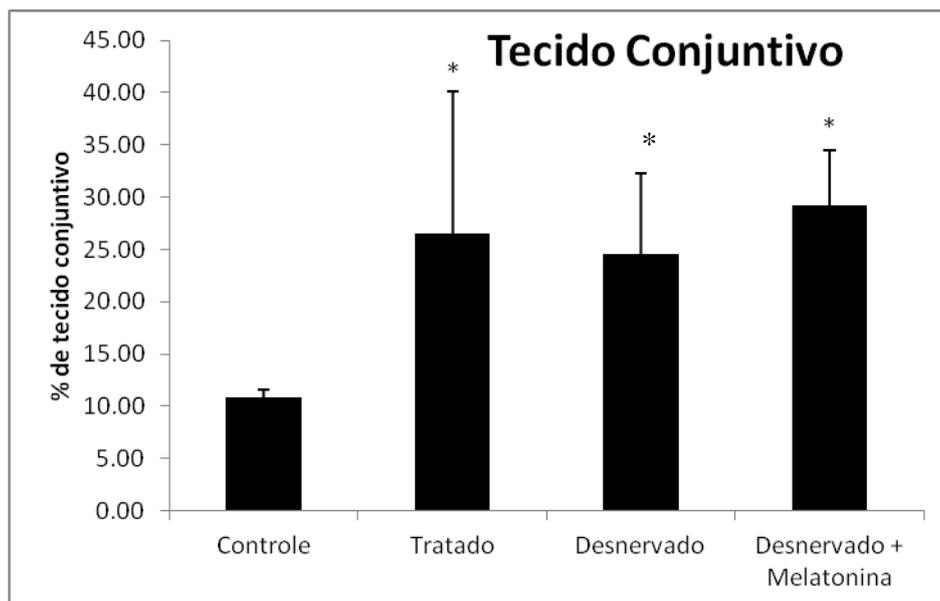


Figura 12: Porcentagem de área do tecido conjuntivo do músculo sóleo de ratos controle, tratado com melatonina, desnervado e desnervado tratado com melatonina. Os valores representam a média  $\pm$  epm,  $n=5$ . \*  $p<0,05$  em relação ao controle.

Com relação a área das fibras ( $\mu\text{m}$ ), o grupo desnervado apresentou área 48,9% e 45,7% menor se comparado ao grupo controle e ao grupo tratado melatonina, respectivamente. Já no grupo desnervado tratado com melatonina, foi observado que apresentou área 51% menor com relação ao grupo controle e 47,8% menor com relação ao grupo tratado melatonina, porém não diferiu do desnervado.

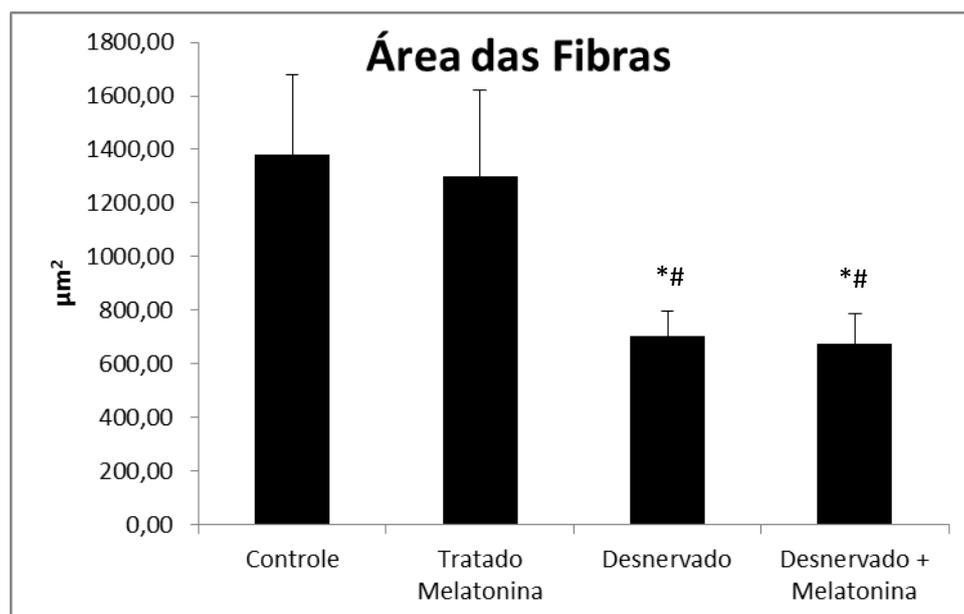


Figura 13: Área das fibras em micrômetro ( $\mu\text{m}$ ) do músculo sóleo de ratos controle, tratado com melatonina, desnervado e desnervado tratado com melatonina. Os valores representam a média  $\pm$  epm,  $n=5$ . \*  $p<0,05$  em relação ao controle; # $p<0,05$  em relação ao grupo tratado melatonina.

## 6. Discussão

O presente estudo trás no eixo norteador realizar uma avaliação de cunho metabólico focada nas ações proporcionadas pelo tratamento com melatonina. Neste contexto, optou-se por iniciar o desenvolvimento experimental buscando selecionar a dose adequada que proporcionasse melhora nas condições metabólicas dos tecidos periféricos, em especial os músculos.

Iniciou-se realizando o teste de tolerância à glicose (GTT) e teste de tolerância a insulina (ITT) em animais controle e tratados com melatonina na concentração de 10 mg/Kg e 5 mg/Kg, buscando informações sobre a responsividade dos tecidos periféricos.

Uma explicação para os resultados observados no GTT e no ITT se fundamentam nas relações que a melatonina exerce sobre o metabolismo de carboidratos, onde tem sido descrito que sua ação é expressa tanto no âmbito da sensibilização tecidual quanto na responsividade das células  $\beta$  pancreáticas (ROBEVA et al., 2008). Assim, a opção por avaliar diferentes doses reitera a busca em compreender os eventos que participam do controle glicêmico.

A opção por avaliar a dose de 10 mg/Kg de melatonina se pauta na demonstração que a melatonina exerce ação protetora nos cardiomiócitos, por atuar reduzindo a ação de espécies reativas de oxigênio, bem como, mostra-se eficiente em promover redução na apoptose (YEUNG et al., 2008; TAKE et al., 2009; SANTOS, 2010). No entanto nossos resultados mostraram que a dose de 10mg/Kg não causou modificação na dinâmica secretória das células beta pancreáticas, uma vez que, a área sob a curva no GTT não alterou-se, por outro lado, o hormônio potencializou a captação periférica de glicose, com intensidade próxima a manutenção de glicemias em concentrações hipoglicemicas (SUMIDA et. al., 1999).

Diante dos resultados obtidos a partir da dose supra-citada, passamos a avaliar os eventos inerentes a uma dose 50% menor, não mudando o perfil de análise já em curso. Neste contexto, foi observado que a dose de 5 mg/Kg hipersensibilizou o processo secretório representado por uma menor área sob a curva descrita no GTT, no entanto, não apresentou resultado estatisticamente significativo em relação ao ITT, sendo sugestivo a existência de potencial sensibilizador em tecido periféricos.

Estudos têm demonstrado que o estado de resistência à insulina se caracteriza pela redução na eficiência do sinal insulínico e consequente comprometimento na captação de glicose por tecidos periféricos. Neste aspecto tem sido proposto que a melatonina promove melhora na sensibilidade insulínica ativando proteínas chave na cascata insulínica (CONTRERAS-ALCANTARA et al., 2010).

Dentre os processos de sensibilização tecidual há duas condições a se considerar, a primeira ligada à sensibilização periférica e a segunda ligada à sensibilização das ilhotas pancreáticas. Assim, é sugestivo que na dose 10 mg/Kg o aumento na captação periférica possa induzir um ajuste na população de receptores insulínicos gerando *down regulation*, diminuição na sensibilidade e comprometimento na sensibilidade dos tecidos periféricos. Por outro lado, na dose 5 mg/kg a ação se mostrou estimuladora das respostas pancreáticas, sendo sugestivo que a constância do estímulo possa redirecionar à sensibilização dos tecidos periféricos. Nosso estudo corrobora com Öner et. al., (2008), os quais utilizando uma dose próxima (6 mg/Kg) por 30 dias, comparou o efeito da testosterona e da melatonina na atrofia muscular de ratos e demonstrou que a melatonina foi tão efetiva quanto a testosterona na prevenção de atrofia muscular.

Estudos *in vitro* também reiteraram em fibras de músculos esquelético isoladas que a melatonina exerce ação na cascata da via insulínica através da translocação de GLUT 4 para membrana (STRATOS et al., 2012).

Na experimentação científica faz-se necessário avaliar o estado de saúde dos animais já que compreende o bem estar comportamental e físico, que por sua vez, refletem a interação com o ambiente e o status nutricional.

Há diversos indicadores da saúde dos animais tais como pêlos homogêneos com brilho, olhos brilhantes e umidificados e vivacidade em condições de normalidade (ANDERSEN et al., 2004). Quando o foco do estudo está pautado em avaliações de parâmetros metabólicos, faz-se necessário analisar o perfil hematológico bem como o comportamento glicêmico e das concentrações de ácidos graxos livres.

No âmbito hematológico optou-se por analisar o hematócrito e o conteúdo de hemoglobina não sendo verificada diferença entre controle e tratado, indicando que a melatonina, durante o período avaliado, não modificou a formação e a

homeostase dos glóbulos vermelhos. A analisou-se também o ácido graxo livre (AGL).

Cabe ressaltar que na presença da melatonina, as concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres foram reduzidas sugerindo que haja participação da melatonina, enquanto hormônio que pode minimizar as ações de hormônios cuja ação está centrada na mobilização das reservas lipídicas, os quais possivelmente são secretados frente à desnervação.

Após a determinação da dose efetiva, passamos para as análises quimiometabólicas dos músculos. Sabe-se que a glicose é um substrato preferencialmente metabolizado em todos os tecidos, assim a captação da hexose por tecidos periféricos, tal como o músculo esquelético, depende de fatores como a estimulação pela insulina ou a elevação na atividade contrátil, promovendo a translocação do transportador de glicose (GLUT4) para a superfície da célula (PESCHKE et al., 2008).

Tem sido descrito a presença de receptores de melatonina no pâncreas, assim, a pineal de maneira indireta pode alterar a secreção de insulina através de modulação autonômica e de responsividade dos neurotransmissores. Diante disso, sob estímulo insulínico ocorre translocação das vesículas de GLUT 4 na membrana plasmática, aumentando em 30 vezes o transporte de glicose para o tecido muscular (de OLIVEIRA et al., 2012; MUHLBAUER et al., 2012).

Nosso estudo mostra que no músculo sóleo (fibra tipo I), o tratamento com melatonina 5 mg/Kg promoveu elevação nas reservas glicogênicas, efeito que se manifestou em músculos normais e desnervados indicando as relações funcionais entre o hormônio e a efetividade/ativação das vias insulínicas, mesmo existindo comprometimento gerado pela perda do controle motor. No mesmo sentido, demonstramos que as ações nas vias glicogênicas não foram observadas no gastrocnêmio porção branca (fibra tipo II), o que pode indicar que o hormônio possa exercer ação preferencial em fibras vermelhas, nas quais a população de receptores insulínicos é maior (RAFACHO et al., 2007).

Em ratos pinealectomizados, o conteúdo do GLUT 4 e seu RNAm são significativamente menores (48% a 71%) alteração observada no músculo sóleo e não nos músculos gastrocnêmios (LIMA, 2004).

Em suma, a melatonina exerce um importante papel na regulação do controle glicêmico, pois eleva a sensibilidade tecidual a insulina e promove alterações na expressão gênica da proteína transportadora GLUT 4 (ZANQUETTA et al., 2005; LIMA, 2006; GHOSH et al., 2011).

Ao avaliarmos o conteúdo de proteínas totais de músculos desnervados foi verificada diminuição estatisticamente significativa no sóleo, no entanto, em contra partida, o músculo sóleo do animal tratado com a melatonina e aquele que foi desnervado e posteriormente tratado com a mesma dose apresentaram um significativo aumento no conteúdo de proteína muscular se comparado com o músculo desnervado. Da mesma maneira nossa avaliação do peso do músculo sóleo, mostrou diminuição significativa no desnervado com relação ao controle e um aumento significativo do tratado melatonina com relação ao controle e do desnervado melatonina com relação ao desnervado.

Uma possível resposta para discernir sobre as ações da melatonina sobre o parâmetro peso muscular pode estar relacionado à interação da melatonina com o IGF-I e conseqüentemente o hormônio de crescimento (GH).

O tecido muscular tem a capacidade de se regenerar em resposta a microlesões que podem ser geradas frente à elevação na exigência da atividade contrátil. Sua habilidade de responder a estímulos físicos ou químicos depende em grande quantidade das células satélite, as quais são células precursoras de músculo ou células “pró-músculo”. Elas são células que estão tanto no músculo quanto ao redor deste. Estas células ficam “dormentes” até o momento que fatores de crescimento tal como IGF-1 as estimula. Uma vez que isto acontece, estas células se dividem e mudam geneticamente em células que têm o núcleo idêntico àqueles de células musculares. Estas novas células satélites com núcleo de células musculares são “mandatórias” para o crescimento muscular (RELAIX e ZAMMIT, 2012; YUSUF et al., 2012).

Sabe-se que a redução dos níveis de IGF-I esta associada à atrofia muscular (URUSHIYAMA et. al., 2004).

Nesse sentido, a literatura mostra que a melatonina altera a síntese do hormônio de crescimento e IGF-I em diferentes tecidos, promovendo a síntese protéica muscular (OSTROWSKA et al., 2003).

Öner (2008) observou que a suplementação de melatonina, durante 30 dias, em ratos castrados aumentou o diâmetro da fibra muscular, o peso e a expressão do IGF-I no músculo sóleo e conclui que a melatonina secretada pela glândula pineal tem efeitos similares a testosterona na prevenção de atrofia muscular induzida pela castração por meio do eixo IGF-I.

Na busca de aumentar informações sobre a integração na sinalização metabólica optou-se por avaliar a concentração plasmática de interleucina 6 (IL-6) sendo verificado aumento no grupo desnervado. Para explicar esta alteração tem-se que relatar que as citocinas são moduladas por vários estímulos, incluindo a atividade física, trauma e infecção, condições onde as reservas energéticas torna-se comprometidas (MOLDOVEANU et al., 2000; OSTROWSKI et al., 2011).

Dentre as interleucinas, a IL-6 é um potente estimulador da secreção de proteínas de fase aguda da inflamação, pelo fígado e também exerce uma ação reguladora do metabolismo promovendo mobilização das reservas energéticas musculares (MOOREN e VOLKER, 2012). Esta citocina é biologicamente ativa, a qual inicialmente havia referencia somente de sua secreção pelas células do sistema imunológico durante condições inflamatórias, porém, tem sido descrito sua secreção pelo tecido adiposo e pela contração muscular inclusive na ausência de inflamação (STEENBERG et al., 2000).

PEDERSEN et al (2001), propuseram que a IL-6 é produzida localizadamente pelo músculo esquelético e liberada na corrente sanguínea em grandes quantidades e dessa forma exerce um papel importante na manutenção da homeostasia da glicose durante o exercício. Também sugerem que a IL-6 pode operar suas ações de uma maneira similar a um hormônio, otimizando a resposta metabólica durante a atividade muscular. Cabe ressaltar que no grupo desnervado, observou-se pequenas reservas glicogênicas, indicando que o status metabólico da musculatura possa ter sido um dos fatos estimulador da secreção da IL-6.

Outro ponto a se destacar se refere a multiplicidade de ações ligadas diretamente a atuação da IL6 na fibra muscular, destacando-se o estímulo sob células satélite e a mobilização de diferentes reservatórios energéticos elevando a disponibilidade de acordo com a demanda (PEDERSEN et al., 2000 a,b). Neste sentido, no grupo desnervado tratado com melatonina foi observado redução na

produção da interleucina 6 indicando que possivelmente a melatonina diminuiu o efeito inflamatório local caracterizado pela diminuição significativa da IL-6 e não devido as reservas energéticas, onde o efeito foi de pequena intensidade.

No que se refere a elevação das reservas glicogênicas, mesmo em pequena quantidade, como observado no músculo sóleo, se deve a capacidade da IL-6 interagir com as vias insulínicas translocando GLUT 4 de reservatórios citosólico até a membrana, ativando a enzima AMPK e estimulando a oxidação de ácidos graxos associado a captação de glicose, desta forma, há de se sugerir que a IL6 seja um “sensor de energia” (MOOREN e VOLKER, 2012).

Tendo em vista que a melatonina é considerada um hormônio que reduz a atividade dos órgãos, o estudo foi direcionado a avaliações de parâmetros ligados a atividade cardíaca iniciando pela avaliação eletrocardiográfica, que é um método efetivo no diagnóstico de alterações cardíacas por não ser invasivo, uma vez que capta sinais elétricos que se originam no músculo cardíaco e se propagam pela superfície corporal. Dentre as novas opções farmacológicas prescritas no tratamento de complicações cardiovasculares, a utilização do hormônio melatonina enquanto coadjuvante, tem se destacado devido aos seus amplos efeitos moderadores das sintomatologias (HARDELAND et al., 2011).

Com relação as variações na secreção de melatonina, sabe-se que estão fortemente associadas com o ciclo claro/escuro, regulação do ritmo circadiano e temperatura corporal (BERRA, RIZZO, 2009). Embora a pineal seja a glândula principal na produção e secreção da melatonina, já foi descrito menores secreções pela retina e trato gastrointestinal (TEIXEIRA, 2003).

A literatura mostra ainda relações diretas entre alterações na pressão arterial e modificação nas propriedades elétricas do coração indicando que o eletrocardiograma é um método eficiente em detectar tais alterações. O trabalho em tela mostra que o grupo tratado com melatonina apresentou redução na frequência cardíaca sugerindo que o hormônio atuando no sistema nervoso central melhora a dinâmica/resposta dos pressoreceptores, reduzindo o tônus simpático e com isto a frequência cardíaca (SIMKO, 2009). Recentemente esta resposta foi reiterada ao se demonstrar que ratos tratados durante 30 dias com melatonina, manifestaram uma expressiva redução frequência cardíaca (RAMOS, 2010).

Inúmeras alterações eletrocardiográficas são expressas por modificações na duração e/ou amplitude do intervalo QRS, anormalidades do segmento PR ou QTc, (HANCOCK, 2009).

Um ponto merecedor de destaque e demonstrado neste trabalho, é que a melatonina promoveu redução no tempo e intensidade dos principais segmentos e complexos do eletrocardiograma, indicando redução no tempo de condução, com reflexo na redução da atividade cardíaca, assim, fica notório que a melatonina exerce um importante mecanismo cardioprotetor. Esta conclusão pode ser respaldada no trabalho de Santos (2010) onde foi demonstrado que a melatonina protegeu o coração das alterações geradas pelo agente anabólico stanazolol.

Recentes estudos observaram que o tratamento com melatonina foi efetivo no tratamento de diferentes alterações cardíacas tais como: infarto (MOR et al., 1999), angina e hipertensão (ZASLAVSKAIA et al., 2010; 2008). Reitera-se ainda que a concentração plasmática de melatonina pode ser um índice importante enquanto marcador de infarto com supra desnivelamento no segmento ST (DOMINGUEZ-RODRIGUES et al., 2006).

Por fim, nosso trabalho corrobora com a sugestão que a melatonina é um hormônio importante com ação indireta no controle da variabilidade cardíaca e sugere que haja um efeito direto de cunho biofísico, atuando diretamente no sistema de geração e propagação do sinal elétrico no músculo cardíaco (BAKSHEEV, KOLOMETS, 2011; RECHCINSKI et al., 2010).

Dentro de um perfil de análise histológica foi observado redução na área da fibra nos grupos desnervados e desnervado tratado com melatonina, acompanhando autores que descreveram redução da massa muscular bem como da área de secção transversa em condições que promovem o desuso (AHTIKOSKI et al. 2003).

A redução na área das fibras, bem como da massa muscular decorre de modificações no balanço síntese/degradação proteica apontando para o quadro de hipotrofia muscular, tal como preconizado (QIN et al. 1997; TAILLANDIER et al., 2003; GOMES et al. 2004).

Com relação à densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular, devemos nos atentar aos componentes relacionados a homeostasia e funcionalidade das fibras, tal como, o colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanas e

as metaloproteinases que são as enzimas responsáveis pela degeneração do tecido conjuntivo (CARMELLI et al., 2004).

Com relação as alterações geradas pelo desuso tem sido descrito redução de componentes da matriz extracelular bem como o aumento da renovação (“turnover”) do colágeno, com degradação e síntese aceleradas, e ainda, independente do modelo de desuso muscular estudado (imobilização, tenotomia ou denervação), a quantidade de tecido conjuntivo no endomísio e perimísio aumenta significativamente, variando de 50% a 700%. (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1984; JÓZSA et al., 1988 e 1990).

Tem sido descrito alterações no metabolismo de colágeno nos tecidos conjuntivos quando submetidos ao desuso em decorrência da falta de forças fisiológicas atuando sobre eles, o que impede a formação de ligações cruzadas, dando origem a fibras imaturas, as quais são responsáveis pela fibrose. Além disso, com a falta de movimento perpetua uma orientação aleatória das fibrilas colágenas recém-sintetizadas, facilitando o surgimento de ligações cruzadas irregulares em regiões estratégicas do padrão trançado do colágeno (AKESON, 1987).

Recentes estudos tem descrito que a melatonina promoveu acúmulo de colágeno no coração enfartado, sendo considerado um evento ligado a melhora na resistência à tração da cicatriz devido a ação direta da substância nos genes  $\alpha 1$  (I) e (III) de procolágeno (DROBNIK et al., 2008; 2010).

Há relatos que a melatonina exerce ação inibitória na produção de colágeno, porém isso ocorre no fígado e na pele (TAHAN et al., 2010).

Por fim, nosso estudo acompanha um recente trabalho onde foi demonstrado em músculos lesados, que a melatonina, administrada na mesma concentração que utilizamos neste estudo, promove redução na infiltração leucocitária, induz aumento no número de células satélite, reduz a eficiência dos radicais livres e ainda estimula a geração de citocinas pro-inflamatórias facilitando a regeneração e modulando as vias controladoras do metabolismo (STRATOS et al., 2012).

Por outro lado, possivelmente os benefícios descritos pelo autor indica a participação impar da melatonina no reparo de músculos lesados, não

apresentando a mesma intensidade/eficiência de ação em músculos desnervados o qual foi objeto deste trabalho.

Como limitadores deste trabalho, tivemos perda de animais como consequência da anestesia e da cirurgia de desnervação, o que fez com que ficássemos com um número de animais menor que o previsto para a estatística. Outro importante limitador foi o tempo de administração da melatonina, no nosso trabalho, 7 dias, porém, acreditamos que seja um tempo relativamente curto para que observássemos efeitos mais reais dessa substância.

Por fim, este trabalho auxilia a fisioterapia, pois na prática clínica encontra-se comumente paciente com lesão periférica e esse estudo foi mais um na tentativa de inibir o catabolismo da musculatura esquelética em desuso extremo (desnervação), com o intuito de deixar esse músculo em melhores condições para uma possível reinervação. Observamos que apesar da melhora nos aspectos metabólicos e cardiovasculares, são necessários mais estudos com um tempo maior de administração e outros modelos de desuso, para podermos ter certeza dos efeitos da melatonina na musculatura esquelética.

## 7. CONCLUSÕES

A dose de 10mg/Kg potencializou a captação periférica de glicose, com intensidade próxima a manutenção de glicemias em concentrações hipoglicêmicas. Por outro lado, na dose 5 mg/kg a ação se mostrou estimuladora das respostas pancreáticas, sendo sugestivo que a constância do estímulo possa redirecionar à sensibilização dos tecidos periféricos.

A melatonina promoveu redução no tempo e intensidade dos principais segmentos e complexos do eletrocardiograma, indicando redução no tempo de condução, com reflexo na redução da atividade cardíaca, e não se modificou indicando a eficácia sem comprometimentos no hematócrito, eritrócitos, hemoglobina e leucometria.

A melatonina, segundo nosso estudo, melhorou as condições quimiometabólicas como: glicogênio muscular e proteína total. Reduziu a produção das IL-6 no grupo desnervado tratado sendo indicativo que a melatonina diminuiu o processo inflamatório local.

Com relação à histologia, observamos que houve um aumento significativo do tecido conjuntivo nos grupos tratados com melatonina e não houve recuperação das áreas das fibras musculares.

Assim, o tratamento com melatonina promoveu melhora no padrão metabólico da musculatura desnervada, porém não foi eficiente em impedir a atrofia desencadeada pela desnervação, sendo observado ainda aumento no conteúdo de tecido conjuntivo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN ML, D'ALMEIDA V, KO GM, KAWAKAMI R, MARTINS PJF, NAGALHÃES LE, TUFIK S. Projeto CEPID (processo 98/14303-3). Princípios Éticos e Práticos do uso de animais experimentais. Unifesp. 2004.

ANDERSEN PH, LUND S, SCHMITZ O, JUNKER S, KAHN BB, PETERSEN O. Increased insulin-stimulated glucose up-take in athletes: the importance of GLUT4 mRNA, GLUT protein and fiber type composition of skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand*, 1993; 149: 393 - 404,.

AHTIKOSKI AM, KOSKINEN SO, VIRTANEN P, KOVANEN V, RISTELI J, TAKALA TE. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand*. 2003;177(4):473-81.

AKESON, W.H. Effects of immobilization on joints. *Clin Orthop*, 1987; 219: 28-37.

ARENDRT J. Melatonin and Human Rhythms *Chronobiology International*. 2006, 23 (1-2) : 21-37

BAKSHEEV VI, KOLOMOETS NM. Melatonin in the system of neurohormonal regulation in man. *Klin Med (Mosk)*. 2011; 89 (1): 4-10.

BELL GI, KAYANO T, BUSE JB, BURANT CF, TAKEDA J, LIN D, FUKUMOTO H, SEINO S. Molecular biology of mammalian glucose transporter. *Diabetes Care*, 1990;13: 198 - 208.

BERRA B, RIZZO AM. Melatonin: circadian rhythm regulator, chronobiotic, antioxidant and beyond. *Clin Dermatol*, 2009; 27:202-209.

CARMELI E, MOAS M, REZNICK AZ, COLEMAN R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve*, 2004; 29: 191-97.

CARVALHEIRA JBC, ZECCHIN HG, SAAD MJA. Vias de Sinalização da Insulina. Arq Bras Endocrinol Metab, 2002b; 46(4): 419-425.

CAVALHEIRA JB, RIBEIRO EB, B. GR, TELLES MM, VELLOSO LA, GONTIJO JA. Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats, 2002a; Diabetes 51: A41.

CAIERÃO QM, BETINI J, TEODORI RM, MINAMOTO VB. The effect of time interval between electrical stimulation on the denervated rat muscle Rev. Bras. Fisioter, 2008; 12 (2): 143-148.

CHAHBOUNI M, ESCAMES G, VENEGAS C. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. J. Pineal Res. 2010; 48: 282-289.

CONTRERAS-ALCANTARA S, BABA K, TOSINI G. Removal of melatonin receptor type 1 induces insulin resistance in the mouse. Obesity (Silver Spring). 2010; 18(9):1861-1863.

CROSS DA, ALESSI DR, COHEN P, ANDJELKOVICH M, HEMMINGS BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature 1995; 378: 785-9.

COSTA ECS. Os Efeitos da Metformina sobre a Dispersão do Intervalo QT e QTc de Ratos Diabéticos. Arq Bras Cardiol, 2008; 90(4): 254-260.

CODERRE L, MONFAR MM, CHEN KS, HEYDRICK SJ, KUROWSKI TG, RUDERMAN NB, et al. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and Messenger RNA levels in denervated rat muscle. Endocrinol, 1992; 131(4):1821-1825.

CULLEN MT, BRICE E, KAHN R. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006; 7, 85-96.

CURI R; LAGRANHA CJ; RODRIGUES JR; PITHON-CURI TC; LANCHI JR AH; PELLEGRINOTTI IL; PROCOPIO J. The Krebs cycle as limiting factor for fatty acids utilization during aerobic exercise. *Arq Bras Endocrinol Arq Bras Endocrinol Metab*, 2003; 47(2):135-143.

De FRONZO RA. The triunvirate:  $\beta$ -Cell, muscle,liver. *Diabetes*, 1988; 37: 667-687.

de OLIVEIRA AC, ANDREOTTI S, FARIAS TDA S, TORRES-LEAL FL, DE PROENÇA AR, CAMPANA AB, DE SOUZA AH, SERTIÉ RA, CARPINELLI AR, CIPOLLA-NETO J, LIMA FB. Metabolic disorders and adipose tissue insulin responsiveness in neonatally STZ-induced diabetic rats are improved by long-term melatonin treatment. *Endocrinology*, 2012; 153(5):2178-88.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ A, ABREU-GONZALEZ P, GARCIA-GONZALEZ E. Prognostic value of nocturnal melatonin levels as a novel marker in patients with T-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 2006; 97 (8): 1162-1164.

DROBNIK J, KARBOWNIK LEWIŃSKA-M, SZCZEPANOWSKA A, D SŁOTWIŃSKA, OLCZAK S, L JAKUBOWSKI, DABROWSKI R. Influência reguladora de melatonina sobre o acúmulo de colágeno na cicatriz coração infartado. *J Pineal Re.*, 2008; 45 (3):285-90.

DROBNIK J, OLCZAK S, OWCZAREK K, HRABEC Z, E. Hrabec Melatonina aumenta a expressão do procolagénio  $\alpha 1$  (I) e (III)  $\alpha 1$  genes na cicatriz cardíaca de ratos pinealectomizados enfartada. *Tissue Res*, 2010; 51 (6) :491-6.

DOBSAK, P. et al. Melatonin protects against ischemia-reperfusion injury and inhibits apoptosis in isolated working rat heart. *Pathophysiology*, 2003; 9:179-187.

DOW DE, CARLSON BM, HASSETT CA, DENNIS RG, FAULKNER JA. Electrical stimulation of denervated muscle of rats maintains mass and force, but not

recovery following grafting. *Restor Neurol Neurosci*, 2006; 24 (1): 41-54.

DURIGAN JLQ. Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização associado à estimulação elétrica neuromuscular. [Dissertação]. Piracicaba: UNIMEP; 2007.

FORTI F, GUIRRO RRJ, SILVA CA. Efeitos da glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte*, 2004; 18(3): 273-281.

FUNTES-BRITO I, MIANA-MENA FJ, PIEDRAFITA E. Melatonin protects against tauroithocholic-induced oxidative stress in rat liver. *J. CellBiochem*. 2010; 110:1219 – 1225.

GOLDSPINK G. Gene expression in skeletal muscle. *Biochem Soc Trans*, 2002; 30(2): 285-90.

GOMES, A.R.S.; COUTINHO, E.L.; FRANÇA, C.N.; POLONIO, J.; SALVINI, T.F. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res*, 2004; 37: 1473-1480.

GHOSH G, DE K, MAITY S, BANDYOPADHYAY D, BHATTACHARYA S, REITER RJ, BANDYOPADHYAY A. Melatonin protects against oxidative damage and restores expression of GLUT4 gene in the hyperthyroid rat heart. *J Pineal Res*, 2011; 42(1):71-82.

HANCOCK EW, AHA/ACCF/HRS. Recommendations for the Standardization and Interpretation of the Electrocardiogram: Part V: Electrocardiogram Changes Associated With Cardiac Chamber Hypertrophy. *J Am Col Cardiol*, 2009; 53 (11): 992–1002.

HARDELAND R, CARDINALI DP, SRINIVASAN V. Melatonin- a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol*, 2011; 93 (3): 350-384.

HENRIKSEN EJ, BOURNEY RE, RODNICK KJ, KORANYI L, PERMUTT MA, HOLLOSZY JO. Glucose transport protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, 1990; 259: 593-598.

HERIKSEN EJ, RODNICK KJ, MONDON CE, JAMES DE, HOLLOSZY JO. Effect of denervation or unweighting on GLUT 4 protein in rat soleus muscle. *J Appl Physiol*, 1997; 70: 2322-2327.

JARZYNSKA MJ et al. Modulation of melatonin receptors and G-protein function by microtubules. *J. Pineal Res*, 2006; 41:324-336.

JUNQUEIRA LC. e CARNEIRO J. *Histologia Básica*. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

JÓZSA, L.; THORING, J.; JARVINEN, M.; KANNUS, P.; LEHTO, M.; KVIST, M. Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: An experimental study in the rat calf muscles. *Exp Mol Pathol*, 1988; 49: 267-278.

JÓZSA, L.; KANNUS, P.; THORING, J.; REFFY, A.; JARVINEN, M.; KVIST, M. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue. *J Bone Joint Surg*, 1990; 72: 293-297.

KANG JJ et al. Quantitative imaging of basic functions in renal (patho)physiology. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006;291:495–502.

KLIP A, PAQUET MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care*, 1990; 13: 228 - 243.

KELLEY DE, REILLY JP, VENEMAN T. Effects of insulin on skeletal muscle glucose storage, oxidation, and glycolysis in humans. *Am. J. Physiol*, 1990; 258: E923 - E929.

KOEPPEN BM, STANTON Bruce A. Berne e Levy . Fisiologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

LASTE G, MACEDO IC, ROZISKY JR, SILVA FR, TORRES ILS. Melatonin administration reduces inflammatory pain in rats. J. Pineal Res. 2012; 5: 359-362

LIMA SC. A estimulação elétrica na expressão gênica do músculo gastrocnêmio desnervado de ratos. [Dissertação]. Piracicaba: UNIMEP; 2006.

LIEBER RL. Skeletal muscle structure and function. Williams e Wilkins, 1992.

LIMA SC. A estimulação elétrica na expressão gênica do myoD, miostatina e atrogina-1 do músculo gastrocnêmio desnervado de ratos. [Dissertação]. Piracicaba: UNIMEP; 2007.

LIMA MFP, BARACAT EC, SIMÕES MJ. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. Braz J Med Biol Res. 2004; 37(7): 987 – 995.

MANDARIM DE LACERDA CA. Manual de Quantificação Morfológica: Morfometria, Alometria, Estereologia. Editora Humana Press; 2010.

MATHIEU O. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. Journal of Microscopy. 1981; (121): 75-88.

MARCUS RP, JUNIOR EJMB, FERREIRA ZS. Ritmos Biológicos: entendendo as horas, dias e estações do ano. Revista Einstein, 2003; 1:143-148.

MOLDOVEANU AI, SHEPARD RJ, SHEK PN. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL1 beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells. J. Appl. Physiol, 2000; 89(4):1499-504.

MALHOTRA S, SAWHNEY G, PANDHI P. The Therapeutic Potential of Melatonin: A Review of the Science. *MedGenMed*, 2004; 6(2): 46.

MOR M, PLAZZI PV, SPADONI G. Melatonin. *Curr Med Chem*, 1999; 6: 501-518.

MOOREN FC, VOLKER. *Fisiologia do exercício molecular e celular*. Santos Editora, 2012.

MÜHLBAUER E, ALBRECHT E, BAZWINSKY-WUTSCHKE I, PESCHKE E. Melatonin influences insulin secretion primarily via MT(1) receptors in rat insulinoma cells (INS-1) and mouse pancreatic islets. *J Pineal Res*, 2012; 52(4):446-59.

NUNES WMS, MELLO MAR. Glucose metabolism in rats submitted to skeletal muscle denervation *Braz. Arch. Biol. Technol*, 2005; 48 (4): 541 -548.

ONER J, ONER H, SAHIN Z, DEMIR R, USTÜNEL I. Melatonin is as effective as testosterone in the prevention of soleus muscle atrophy induced by castration in rats. *Anat Rec (Hoboken)*, 2008; 291(4):448-55.

OSTROWSKI K, ROHDE T, ZACHO M, ASP S, PEDERSEN B. K. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol*, 2011; 508: 949-953.

OSTROWSKI K, ROHDE T, ASP S, SCHJERLING P, PEDERSEN BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J. Physiol*, 1999; 515(Pt1):287-291.

OSTROWSKA Z, KOS-KUDLA B, NOWAK M, SWIETOCHOWSKA E, MAREK B, GORSKI J, KAJDANIUK D, WOLKOWSKA K. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats. *Endocr Regul*, 2003; 37(4):211-24.

PANDI-PERUMAL SR, TRAKHT I, SRINIVASAN V, SPENCE DW, MAESTRONI GJ, ZISAPEL N, CARDINALI DP. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol*. 2008, 85(3):335-53

PARDI ACR. Ação da Nandrolona no padrão energético do músculo esquelético imobilizado: estudo em ratos. [Dissertação]. Piracicaba: UNIMEP; 2010.

PEDERSEN BK. Exercise and cytokines. *Immunol Cell Biol*, 2000a; 78:532-535.

PEDERSEN BK, HOFFMAN-GOETZ L. Exercise and the Immune System: Regulation, Integration and Adaptation. *Physiol Rev*, 2000b; 80: 1055-1081.

PEDERSEN BK, STEENBERG A, SCHJERLING P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol*, 2001; 536: 329-337.

PESCHKE E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J Pineal Res*. 2008, 44(1):26-40

QIN, L.; APPELL, H.J.; CHAN, K.M.; MAFFULLI, N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch Phys Med Rehabil*, 1997; 78, 512-7.

RAFACHO A, ROMA LP, TABAGA SR. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Can J Physiol Pharmacol*, 2007; 85:536-45.

RAMOS LA. Efeito da melatonina sobre parâmetros cardiovasculares em ratos portadores de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina. [Dissertação]. Campinas:UNICAMP; 2010.

RECHCIŃSKI T, TRZOS E, WIERZBOWSKA-DRABIK K. Melatonin for nondippers with coronary artery disease: assessment of blood pressure profile and

heart rate variability. *Hypertens Res*, 2010; 33 (1):56-61.

REGOUW BJM, CORNELISSEM PJH, HELDER R, SPIJKERS JBF, WEEBER YMM. Specific determination of the free fatty acid in plasma. *Clin Chin Acta*, 1971; 31(1): 187-95.

REITER, R.J. et al. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans – Review. *Acta Bioch Polonica*, 2003; 50:1129-1146.

RELAIX F, ZAMMIT PS. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development*, 2012; 139(16):2845-56.

RIBEIRO CB. Análise quimiometabólica e biomolecular da musculatura esquelética desnervada de ratos submetidos ao tratamento com o aminoácido leucina. [Dissertação]. Piracicaba: UNIMEP; 2010.

RICHARSON JM, BALON TW, TREADWAY JL, e PESSIN JF. Differential regulation of glucose transporter activity in red and white skeletal muscle. *J. Biol. Chem*, 1991; 266: 12690 - 12694.

ROBEVA R, KIRILOV G, TOMOVA A, KUMANOV P. Melatonin-insulin interactions in patients with metabolic syndrome. *J Pineal Res*. 2008 Jan;44(1):52-6.

ROSE SJ, ROTHSTEIN JM. Muscle biology in the physical therapy. *Phys. Ther*, 1982; 62:1754-1756.

SAAD MJA. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Braz. J. Med. Biol.Res*, 1994; 27: 941-957.

SANTOS GB. Melatonina reduz o estresse oxidativo e as alterações cardiovasculares induzidas pelo estanozolol em ratos submetidos ao exercício de

natação. [Dissertação]. Campinas: UNICAMP; 2010.

SARGENT PB. The Diversity of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors  
Annual Review of Neuroscience, 1993; 16: 403-443.

SIMKO F. Effect of melatonin, captopril, spironolactone and simvastatin on blood pressure and left ventricular remodelling in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens, 2009; 27 Suppl 6, 5-10.

SIMKO F, PAULIS L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment. J Pineal Res, 2007; 42:319-322.

SARABIA V, LAM L, BURDETT E, LAITER LA, KLIP A. Glucose transport in human skeletal muscle cell in culture. J.Clin. Invest, 1992; 90: 1386-1395.

SEDDON HJ. Three types of nerve injury. Brain, 1943; 66: 237 – 288.

STEENSBERG A, VAN HALL G, OSADA T, SACCHETTI M, SALTIN B, KLARLUND PEDERSEN B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. J Physiol. 2000,15;529 Pt 1:237-42.

SLUTZKY LC. Fisioterapia respiratória nas enfermidades neuromusculares. 1º edição, Ed. Revinter, 1997.

SILVERIA MIA, PEROT C e GOUBEL F. Plasticidade muscular. CCS, 1994; 13 (3): 23-32.

SIU LO, RUSSEAU JC, TAYLOR AW. Determination of glycogen in small tissue samples. J. Appl. Physiol, 1970; 28:234-236.

SOWELL MO, DUTTON SL, BUSE MG. Selective in vitro reversal of the insulin resistance of glucose transport in denervated rat skeletal muscle. Am. J. Physiol., . 1989; 257, E418-E425.

SUMIDA DH, SERAPHIM PM, SKORUPA AL, BELLOT LG, CIPOLLA-NETO J, MACHADO UF. The role of the pineal gland in GLUT4 gene expression. 8th Meeting of the European Pineal Society Colloquium 1999;(abstract):pp156.

STRATOS I, RICHTER N, ROTTER R, LI Z, ZECHNER D, MITTLMEIER T, VOLLMAR B. Melatonin restores muscle regeneration and enhances muscle function after crush injury in rats. *J Pineal Res*, 2012; 52(1):62-70.

TAHAN V, OZARAS R, CANBAKAN B. Melatonin reduces dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *J. Pineal Res*. 2004, 37: 78-84.

TAHAN G, AKIN H, AYDPGAN F, RAMADAN SS, YAPICIER O, TARCIN O, UZUN H, TAHAN V, ZENGİN K. Melatonin ameliorates liver fibrosis induced by bile-duct ligation in rats. *Can J. Surg*. 2010; 53: 313-318.

TAMURA EK, SILVA CLM, MARKUS RP. Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. *J. Pineal Res*, 2006; 41:267-274.

TAILLANDIER, D.; AUROUSSEAU, E.; COMBARET, L.; GUEZENNEC, C.Y.; ATTAIX, D. Regulation of proteolysis during reloading of the unweighted soleus muscle. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003; 35: 665-675.

TAYLOR A, THAYER R, RAO S. Human skeletal glycogen synthetase activities water exercise and training. *Can. J. Physiol. Pharmacol*, 1972; 50: 411 – 412.

TEIXEIRA, A. Propriedades Antioxidantes da Melatonina: Inibição de Enzimas Pró-Oxidantes e Ação Contra a Peroxidação Lipídica. [Dissertação]. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

TOMÁS-ZAPICO C, COTO-MONTES A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res*, 2005; 39:99-104.

TAKE G, ERDOGAN D, HELVACIOGLU F. et al., Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2009; 42: 621-628.

URUSHIYAMA T, AKUTSU S, MIYAZAKI J, FUKUI T, DIEKWISCH TG, YAMANE A. Change from a hard to soft diet alters the expression of insulin-like growth factors, their receptors, and binding proteins in association with atrophy in adult mouse masseter muscle. *Cell Tissue Res*. 2004; 315(1):97-105.

ZASLAVSKAIA RM, SHCHERBAN EA, LILITSA GV. Melatonin in the combined treatment of cardiovascular diseases. *Klin Med*, 2010; 88 (3): 26-30.

ZASLAVSKAIA RM, SHCHERBAN EA, LOGVINENKO SI. Melatonin in combined therapy of patients with stable angina and arterial hypertension. *Klin Med (Mosk)*, 2008; 86 (9): 64-67.

ZANQUETTA MM, SERAPHIM PM, SUMIDA DH, CIPOLLA-NETO J, MACHADO UF. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane, 2005; 35(3):141-148.

YEUNG HM, HUNG MW, FUNG ML. Melatonin ameliorates calcium homeostasis in myocardial and ischemia-reperfusion injury chronically hypoxic rats. *J. Pineal Res*, 2008; 45:373-382.

YOUSSEFT HIBAOU Y, REUTENAUER-PATTE J, PATTHEY-VUADENS O, RUEGG UT, DORCHIES OM. Melatonin improves muscle function of the dystrophic mdx5Cv mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *J Pineal Res*. 2011, 51(2):163-71.

YUSUF F, BRAND-SABERI B. Myogenesis and muscle regeneration. *Histochem Cell Biol*, 2012; 138(2):187-99.

WANG WZ, FANG XH, STEPHENSON LL. Melatonin attenuates I/P – induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *J. Surg Res*, 2010.

WILLIAMS, P.E.; GOLDSPIK, G. Connective tissue changes in immobilized muscle. *J. Anat*, 1984; 138:343-50.