ANDRÉ RICARDO GOMES DE PROENÇA

EXERCÍCIO FÍSICO E MELATONINA PROMOVEM CONJUNTAMENTE REDUÇÃO DA ADIPOSIDADEEM RATOS, EMBORA ESTES SE TORNEM HIPOGONÁDICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

ANDRÉ RICARDO GOMES DE PROENÇA

EXERCÍCIO FÍSICO E MELATONINA PROMOVEM CONJUNTAMENTE REDUÇÃO DA ADIPOSIDADEEM RATOS, EMBORA ESTES SE TORNEM HIPOGONÁDICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Fábio Bessa Lima

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Proença, André Ricardo Gomes de.
Exercício físico e melatonina promovem conjuntamente redução da adiposidade em ratos, embora estes se tornem hipogonádicos / André Ricardo Gomes de Proença. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Bessa Lima.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia do tecido adiposo.

Versão do título para o inglês: Exercise and melatonin acting together promote in rats adiposity reduction, although they become hypogonadic.

1. Tecido adiposo 2. Treinamento físico 3. Melatonina 4. Lipólise 5. Hipogonadismo 6. Testosterona I. Lima, Prof. Dr. Fábio Bessa II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0174/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): André Ricardo Gomes de Proença.

Título da Tese: Exercício físico e melatonina promovem conjuntamente redução da adiposidade em ratos, embora estes se tornem hipogonádicos.

Orientador(a): Prof. Dr. Fábio Bessa Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura: .....
Nome:.....
Instituição:.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **009** nas fls. **82** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Fabio Bessa Lima, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Exercício físico e melatonina: ação conjunta frente ao quadro de obesidade em ratos wistar** do qual participou(aram) o(s) alunos **André Ricardo Gomes de Proença, Andressa Bolsoni Lopes, Amanda Baron Campaña, Ariclécio Cunha de Oliveira, Arnaldo Henrique de Souza, Natalie Carolina de Castro, Rogério Antonio Laurato Sertié, Talita da Silva Mendes de Farias, Francisco Leonardo Torres Leal, Patrícia Chimin,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **25.02.2010,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 12 de março de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA – ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 034.13

São Paulo, 13 de maio de 2013.

REF.: Protocolo nº 009/2010.

"Exercício físico e melatonina: Ação conjunta em ratos,com ênfase na atividade lipolítica do tecido adiposo".

Prezado Professor,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 25.02.2016.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Fabio Bessa Lima
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

EXPEDIÇÃO
DATA 15/5/13
REL. Nº 1716

À Deus que, em sua infinita misericórdia e bondade,
me permitiu alcançar mais essa conquista .

"Não a nós, Senhor, nenhuma glória para nós, mas sim ao teu nome,
por teu amor e por tua fidelidade".

Salmo 115:1

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Bessa Lima que, com dedicação e paciência, está sempre pronto para discutir, aconselhar, orientar, preocupando-se sempre com a formação dos seus pós-graduandos. Obrigado por possibilitar que a relação entre aluno e orientador fosse transformada em uma amizade fraternal, nutrida por respeito e sinceridade.

À mamãe Sandra Andreotti, que já exercia papel de mãe antes mesmo de ter a pequena Beatriz, e que com competência e dedicação sempre esteve pronta a ajudar. Obrigado por toda atenção, carinho, amizade e acima de tudo profissionalismo. Sua participação foi imprescindível.

Aos amigos do laboratório, Amanda B. Campaña, Rennan O. Caminhotto, Rogério A.L. Sertié, Ariclécio C. de Oliveira, que foram fundamentais para a obtenção dos resultados desse trabalho, assim como pelas importantes discussões. À Natalie C. Castro, Talita S.M. Farias, Patrícia P. Nunes e Priscila S. Bertevello pela amizade, apoio e observações levantadas. Agradeço a todos vocês pelos momentos de descontração, alegria e cumplicidade, principalmente quando as coisas não estavam bem.

Aos amigos Carlos Flores, Renato Nachbar e Alcione Souza Jr. pelos momentos inesquecíveis que passamos em "república" e que certamente serão sempre lembrados. Obrigado também pela colaboração nos experimentos, assim como pelas ricas discussões.

Às famílias Gomes, Proença, Madrid e Volf, que apoiando, ensinando, tranquilizando e principalmente orando, acompanharam de perto mais esta jornada. Obrigado pela paciência, e pelo amor demonstrado em todos os momentos.

À minha noiva Tainá Madrid Volf, que de maneira paciente, compreensiva e com todo amor me ajudou a passar pelos momentos verdadeiramente turbulentos dessa conquista. Obrigado por também ter dividido comigo o desfrutar de muitas alegrias.

À Luciana Rigo que abriu as portas de sua casa para receber uma pessoa estranha, e que lá permaneceria por 6 meses. Obrigado Lú pela paciência, amizade, compreensão, e por ter dividido comigo momentos de extrema dificuldade e extrema alegria.

À Profª. Drª. Solange M. F. de Moraes, pela oportunidade do início, que possibilitou o alcançar desta etapa. Estendo ainda esse agradecimento as professoras Jorgete Constantin e Emy Iwamoto, que prontamente me apoiaram no início da pós-graduação, a vocês serei eternamente grato.

Aos amigos de outros laboratórios que tive oportunidade de conhecer durante minha passagem pelo Instituto de Ciências Biomédicas.

Aos técnicos do biotério, que se aplicam no cuidado diário do biotério e dos nossos animais.

Aos funcionários da Biblioteca do ICB I, pelos serviços prestados durante e, principalmente, nesta reta final.

Aos secretários da pós-graduação José Maria e Paloma por todo auxílio e paciência.

Aos mestres e professores do ICB, agradeço pelo ensino ministrado durante as disciplinas edificantes, nas palestras desenvolvidas no ICB I e por todo empenho aplicado no aprendizado e na pesquisa científica.

Ao CNPq, Capes e principalmente à FAPESP (Proc.2009/54732-7), que financiaram a minha pesquisa e minha permanência em São Paulo.

Agradeço acima de tudo à Deus, que nos momentos de dificuldade, em que titubeamos na fé, ainda sim Ele se mostra Senhor soberano e misericordioso, permitindo-nos descansar e continuar.

*"**A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode. Isto fica sendo a minha última e mais elevada descoberta".***

Isaac Newton

RESUMO

Proença ARG. Exercício físico e melatonina promovem conjuntamente redução da adiposidade em ratos, embora estes se tornem hipogonádicos. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Na última década, vários estudos observaram que a melatonina, além de alterar o peso corporal de animais, também reduz adiposidade e melhora a sensibilidade à insulina no tecido adiposo. Entretanto, alguns trabalhos apontam um possível efeito antigonadotrófico da melatonina. Em relação ao exercício físico, suas contribuições no controle do peso corporal assim como da adiposidade já foram evidenciadas por diversos estudos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o de averiguar se o exercício físico somado a suplementação com melatonina em animais pós-púberes, modifica a adiposidade e a regulação da atividade lipolítica, nos tecidos adiposos localizados nas regiões subcutânea inguinal (SUB) e retroperitoneal (RP), além de verificar possíveis efeitos antigonadotróficos decorrentes do tratamento com melatonina. A concomitância do treinamento físico (50-60% da capacidade máxima) e da suplementação com melatonina (0,2 mg/Kg/dia) durante 8 semanas em ratos *Wistar* de 11 semanas de idade foi mais eficiente em promover reduções no diâmetro dos adipócitos e, consequentemente, na adiposidade do que o uso isolado do treinamento físico ou da suplementação com melatonina. Entretanto, não foram observadas alterações na atividade lipolítica, e nem na lipogênese, medidas em adipócitos isolados das regiões estudadas. Foi demonstrado também que, mesmo em doses reduzidas, a suplementação promoveu hipogonadismo com consequente redução da testosteronemia, além de uma redução da massa do músculo EDL (de contração rápida), evidenciando assim a necessidade de se aprofundar os estudos sobre os impactos do uso de melatonina sobre o eixo hipófise-hipotálamo-gônadas.

Palavras-chave: Treinamento físico. Melatonina. Adiposidade. Lipólise. Hipogonadismo.

ABSTRACT

Proença ARG. Exercise and melatonin acting together promote in rats adiposity reduction, although they become hypogonadic. [Ph. D. thesis (Human Phisiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

In the last decade, several studies showed that melatonin, besides changing body weight of animal also reduces adiposity and improves insulin sensitivity in adipose tissue. However, some of them pointed to a possible melatonin's antigonadotropic action. In relation to exercise, its contributions to the control of body weight, as well as adiposity, have been highlighted by several studies. Hence, the purpose of this study was to investigate whether the physical exercise plus supplementation with melatonin in postpubertal animals modify adiposity and regulation of lipolysis in the inguinal subcutaneous (SUB) and retroperitoneal (RP) adipose tissues, away from assessing the possible antigonadotropic effects resulting from melatonin treatment. The concomitance of physical training (50-60% maximum) and melatonin supplementation (0.2 mg / kg / day) for 8 weeks to 11 weeks old rats were more efficient in promoting reductions in adipocyte size and hence in adiposity than physical training or melatonin supplementation alone. However, no changes were observed in lipolysis or in lipogenesis, measured in isolated adipocytes from investigated the fat depots. We also showed that, even at this low dose, melatonin promoted hypogonadism with consequent reduction of the testosteronemia and a reduction in EDL (*extensor digitorum longus*) muscle mass (fast twitch), thus evidencing that further studies on the impacts of the use of melatonin the hypothalamic-pituitary-gonadal axis are actually needed.

Keywords: Physical training. Melatonin. Adiposity. Lipolisys. Hypogonadism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AANAT - aril-alquil-N-acetiltranferase

Actb - Beta-Actina

AGL – Ácidos Graxos Livres

AMP - Adenosina monofosfato

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

AMPK - cinase protéica ativada por AMP

AQP-7 - aquaporina-7

ATGL - Lipase de triacilglicerol

ATP – Adenosina trifosfato

B2m - Beta 2 Microglobulina

C - Grupos Controle (SC e TC)

DAG - Diacilglicerol

EPM – Erro padrão da média

EDL – músculo extensor longo dos dedos (*extensor digitorum longus*)

FABP-4 - Proteína transportadora de ácidos graxos

G3P - Glicose 3 Fosfato

GH – Hormônio do Crescimento

GLUT-4 – Transportador de glicose 4

GMPc - Guanosina monofosfato cíclico

HDL-c - Lipoproteína de alta densidade

HIOMT - hidroxindol - O - metiltranferase

HSL – Lipase Hormônio Sensível

IL – 6 – Interleucina 6

LDL-c - Lipoproteina de baixa densidade

M - Grupos tratados com melatonina (SM e TM)

M.O – Microscópio Óptico

MAG - Monoacilglicerol

MS - Tecido Adiposo Mesentérico

MT1;2- receptor de melatonina

PE – Tecido Adiposo Periepididimal

PEPCKc - Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase citosólica

PKA – Proteina cinase A

RP – Tecido Adiposo Retroperitoneal

S - Grupos sedentários (SC e SM)

SC – Sedentário Controle

SM – Sedentário Melatonina

SUB – Tecido Adiposo Subcutâneo

TAG – Triacilglicerol

T - Grupos treinados (TC e TM)

TC – Treinado Controle

TM – Treinado Melatonina

TNF-α – Fator α de necrose tumoral

VLDL-c - Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- PRINCIPAIS VIAS ENVOLVIDAS DA REGULAÇÃO LIPOLÍTICA. VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DE CATECOLAMINAS VIA RECEPTORES ADRENÉRGICOS, RECEPTORES INIBITÓRIOS E DE PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS ATRIAL VIA RECEPTOR TIPO A 27

FIGURA 2 - REGULAÇÃO CLARO E ESCURO DO RELÓGIO BIOLÓGICO (NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO), PRODUÇÃO DE MELATONINA POR PINEALÓCITOS NO VERÃO E INVERNO 34

FIGURA 3 - DESENHO EXPERIMENTAL.....40

FIGURA 4 - CURVA DE PESO CORPORAL 50

FIGURA 5 - GANHO DE PESO CORPORAL 50

FIGURA 6 - INGESTÃO ALIMENTAR 51

FIGURA 7 - CONSUMO HÍDRICO.....51

FIGURA 8 - TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO 52

FIGURA 9 - A - COXINS ADIPOSOS (SUB, MS, PE E RP). **B -** COXIM ADIPOSO TOTAL.....53

FIGURA 10 - DIÂMETRO DOS ADIPÓCITOS ISOLADOS (SUB E RP) 54

FIGURA 11 - MICROFOTOGRAFIA DOS ADIPÓCITOS ISOLADOS 54

FIGURA 12 - A - NÚMERO DE ADIPÓCITOS NO TECIDO SUB E RP 55

FIGURA 13 - ESTRUTURAS REPRODUTORAS. **A -** TESTÍCULO DIREITO. **B -** TESTÍCULO ESQUERDO. **C -** EPIDÍDIMO. **D -** CANAL DEFERENTE. **E -** VESÍCULA SEMINAL.....56

FIGURA 14 - IMAGEM DAS ESTRUTURAS REPRODUTORAS 57

FIGURA 15 - A - PESO ÚMIDO DO MÚSCULO EDL. **B -** PESO SECO DO MÚSCULO EDL.....58

FIGURA 16 - A - PESO ÚMIDO DO MÚSCULO *SOLEUS*. **B -** PESO SECO DO MÚSCULO *SOLEUS* 58

FIGURA 17 - GLICOSE PLASMÁTICA 59

FIGURA 18 - INSULINA PLASMÁTICA 59

FIGURA 19 - HOMA-IR 60

FIGURA 20 - COLESTEROL TOTAL 61

FIGURA 21 - HSL-C 61

FIGURA 22 - LDL-C.....62

FIGURA 23 - VLDL-C 62

FIGURA 24 - TAG 63

FIGURA 25 - LEPTINA 64

FIGURA 26 - CORRELAÇÃO ENTRE LEPTINEMIA E DIÂMETRO ADIPÓCITOS DO TECIDO SUB E RP 64
FIGURA 27 - CORRELAÇÃO ENTRE LEPTINEMIA E PESO DO COXIM ADIPOSO TOTAL.....65
FIGURA 28 - ADIPONECTINA.....65
FIGURA 29 - TESTOSTERONA.....66
FIGURA 30 - A - CORRELAÇÃO ENTRE TESTOSTERONA E VESÍCULA SEMINAL. **B -** CORRELAÇÃO ENTRE TESTOSTERONA E EPIDÍDIMO 67
FIGURA 31 - A - CORRELAÇÃO ENTRE PESO DO MÚSCULO EDL E TESTOSTERONA **B -** CORRELAÇÃO ENTRE PESO DO MÚSCULO EDL E PESO DA VESÍCULA SEMINAL 67
FIGURA 32 - INCORPORAÇÃO DE D-[U-14C]-GLICOSE EM LIPÍDEOS EM ADIPÓCITOS ISOLADOS SUB E RP. 68
FIGURA 33 - CURVA LIPOLÍTICA DOSE-REPOSTA POR CÉLULAS EM ADIPÓCITOS ISOLADOS DO TECIDO SUB.E RP 69
FIGURA 34 - ATIVIDADE LIPOLÍTICA POR CÉLULAS EM ADIPÓCITOS ISOLADOS DO TECIDO SUB E RP.....70
FIGURA 35 - SENSIBILIDADE LIPOLÍTICA POR CÉLULAS (LOG EC50) NO TECIDO ADIPOSO SUB E RP. 70
FIGURA 36 - CORRELAÇÃO ENTRE ÁREA DO ADIPÓCITO E LIPÓLISE MÁXIMA DO TECIDO SUB.E RP 71
FIGURA 37 - CURVA LIPOLÍTICA DOSE-REPOSTA POR ÁREA EM ADIPÓCITOS ISOLADOS DO TECIDO SUB E RP. 71
FIGURA 38 - ATIVIDADE LIPOLÍTICA POR ÁREA EM ADIPÓCITOS ISOLADOS DO TECIDO SUB E RP. 72
FIGURA 39 - SENSIBILIDADE LIPOLÍTICA POR ÁREA (LOG EC50) NO TECIDO ADIPOSO SUB E RP. 72
FIGURA 40 - EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR ADRENÉRGICO B-1 NO TECIDO SUB E RP. 73
FIGURA 41 - EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR ADRENÉRGICO B-2 NO TECIDO SUB E RP. 74
FIGURA 42 - EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR ADRENÉRGICO B-3 NO TECIDO SUB E RP 74
FIGURA 43 - EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR ADRENÉRGICO ALFA-2A NO TECIDO SUB **E** RP 75
FIGURA 44 - EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA LIPOLÍTICA HSL NO TECIDO SUB E RP. 76

FIGURA 45 - EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA PERILIPINA-1 NO TECIDO SUB E RP.....76
FIGURA 46 - EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA AQUAPORINA-7 NO TECIDO SUB E RP 77
FIGURA 47 - EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA FABP-4 NO TECIDO SUB E RP.....77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 19
2 REVISÃO DA LITERATURA..... 21
2.1 Lipólise: mecanismos gerais..... 21
2.1.1 Os Mensageiros..... 21
2.1.2 Enzimas, Proteínas e Co-ativadores..... 23
2.1.3 Transporte de AGL e Glicerol..... 25
2.1.4 Re-esterificação..... 27
2.1.5 Diferenças entre depósitos de tecido adiposo branco..... 28
2.2 Exercício físico e adiposidade..... 29
2.3 Melatonina e adiposidade..... 33
3 JUSTIFICATIVA..... 37
4 OBJETIVO..... 38
5 MATERIAIS E MÉTODOS..... 39
5.1 Animais..... 39
5.2 Procedimentos experimentais..... 39
5.3 Tratamento com melatonina..... 39
5.4 Programa de treinamento físico..... 40
5.5 Avaliações pré e pós eutanásia..... 41
5.6 Experimentos "*in vitro*"..... 42
5.6.1 Isolamento dos adipócitos e análise morfométrica..... 42
5.6.2 Teste de Avaliação da Sensibilidade Lipolítica Frente a Estímulo com Isoproterenol..... 43
5.6.3 Teste de Incorporação de D-[U-14C]-Glicose em Lipídeos em Adipócitos Isolados..... 44
5.7 Determinações Bioquímicas e Hormonais..... 44
5.7.1 Glicose, Triacilglicerol (TAG), Lipoproteína de Alta Densidade (HDL-c), Colesterol Total, Lipoproteina de Baixa Densidade (LDL-c) e Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (VLDL-c)..... 44
5.7.2 Insulina, Leptina e Adiponectina..... 45
5.7.3 Avaliação da Sensibilidade Insulínica periférica pelo Modelo de Análise Homeostática ($HOMA_{IR}$)..... 45

5.8 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativo – qPCR..... 45
5.8.1 Extração de RNA total.....45
5.8.2 Síntese de cDNA por transcrição reversa..... 46
5.8.3 PCR quantitativo (real time)..... 47
5.8.4 Quantificação relativa – Método de CT comparativo (ΔΔCT)..... 47
5.8.5 Seleção de controladores endógenos (housekeeping genes)..... 48
5.9 Tratamento Estatístico dos Dados..... 48
6 RESULTADOS.....50
6.1 Peso corporal.....50
6.2 Consumo.....51
6.3 Treinamento Físico.....52
6.4 Coxins Adiposos.....53
6.5 Estruturas Reprodutoras.....56
6.6 Músculo Esquelético.....58
6.7 Determinações Bioquímicas e Hormonais.....59
6.7.1 Glicose, Insulina..... 59
6.7.2 Colesterolemia.....61
6.7.3 Trigliceridemia..... 63
6.7.4 Leptina e adiponectina..... 64
6.7.5 Testosteronemia.....66
6.8 Ensaios com Adipócitos Isolados..... 68
6.8.1 Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em lipídeos de adipócitos isolados..... 68
6.8.2 Avaliação da Sensibilidade Lipolítica Frente a Estímulo com Isoproterenol.....69
6.9 Expressão Gênica..... 73
6.9.1 Receptores Adrenérgicos.....73
6.9.2 Lipase Sensível a Hormônio e Perilipina-1.....76
6.9.3 Transporte de Ácidos Graxos e Glicerol.....77
7 DISCUSSÃO..... 78
8 CONCLUSÃO..... 87
REFERENCIAS.....88
APÊNDICE A - Protocolo de Treinamento.....101
APÊNDICE B - Tabelas.....102

1 INTRODUÇÃO

O tecido adiposo (TA) é o maior reservatório de energia de que dispomos, sendo durante muito tempo considerado um tecido cuja finalidade era apenas esta. Na última década do século passado, descobriu-se que, além de ser abundante fonte de energia, o TA era também um importante produtor de substâncias biologicamente ativas, passando então a ser reconhecido como órgão endócrino, desempenhando um papel ativo na regulação do metabolismo energético[1,2].

O interesse por seu estudo mais aprofundado se deveu, em parte, ao aumento epidêmico da obesidade nas mais diversas sociedades contemporâneas. A combinação de hábitos alimentares constituídos por dietas ricas em gorduras e açucares e o sedentarismo é responsável pelo número crescente de pessoas com sobrepeso e obesidade, sendo hoje um dos maiores problemas de saúde no mundo ocidental, atingindo, em certos casos, um terço da população [3,4,5,6].

Este fato fez com que houvesse maior necessidade de pesquisas que possibilitassem melhor entendimento da funcionalidade do tecido adiposo. Estudos *in vivo* e *in vitro* realizados tanto em animais como em humanos, uso de técnicas como microdiálise, assim como avanços na área da biologia molecular culminaram em maior entendimento a respeito da fisiologia do tecido adiposo. Estes estudos, além de buscarem elucidar aspectos e fatores que interferem no controle metabólico como dieta, exercício, patologias, idade, fármacos, estresse, etc, procuram ainda entender o reflexo de um aumento ou de uma diminuição da adiposidade, localizada ou generalizada no organismo como um todo.

As duas principais ações metabólicas do tecido adiposo branco são a lipólise (mobilização ou hidrólise do triacilglicerol) e lipogênese (armazenamento ou síntese de ácidos graxos). A importância dessas ações conferiu ao tecido adiposo papel fundamental no controle metabólico[7]. Tanto a lipólise como a lipogênese são reguladas pela integração dos mecanismos endócrino e neural, que cooperam para manter a massa adiposa relativamente constante frente às condições habituais. Inúmeros trabalhos científicos já evidenciaram o reflexo do exercício físico no metabolismo energético, e principalmente sua contribuição na redução ou na contenção de um aumento da adiposidade.

Nas duas últimas décadas, pesquisadores passaram a demonstrar uma considerável participação na melatonina no metabolismo energético. Alguns

trabalhos evidenciaram sua influência na regulação da adiposidade. Entretanto, ainda há perguntas a serem respondidas sobre os impactos, positivos e negativos que seu uso, na reposição ou no tratamento, pode causar ao organismo. Devido ao fato de alguns estudos, citados posteriormente, demonstrarem um efeito central desse hormônio com repercussões gonádicas, adotamos o modelo animal de suplementação com melatonina, objetivando avaliar os efeitos no metabolismo do adipócito, assim como nas estruturas que compõem o sistema reprodutor.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A ênfase desse estudo foi direcionada a melhor compreensão da ação lipolítica frente ao exercício físico e ao tratamento com melatonina. Desta maneira, nesta breve revisão, elucidaremos mais amplamente o mecanismo lipolítico, assim como o papel de ambas intervenções utilizadas, na adiposidade.

2.1 Lipólise: mecanismos gerais

No tecido adiposo se encontra o maior reservatório energético, armazenado sob a forma de triacilgliceróis (TAG). Sua mobilização fornece "combustível" para outros órgãos e isto ocorre por meio do processo metabólico chamado lipólise.

Durante períodos de privação de nutrientes, estresse ou durante a prática de exercícios físicos, a lipólise é estimulada promovendo a hidrólise de estoques de TAG presentes no interior dos adipócitos. Estes estoques constituem uma grande gota lipídica que está rodeada por uma monocamada fosfolipídica, além de proteínas estruturais, enzimas e coativadores[8]. De maneira geral, a atividade lipolítica culmina na liberação sistêmica de três moléculas de ácidos graxos não esterificados e uma molécula de glicerol. Os AGL liberados na corrente sanguínea são usados como fonte de energia por outros tecidos, como coração e músculo esquelético.

Para que ocorra esta liberação sistêmica de AGL e glicerol, é necessária uma série de eventos extra e intracelulares, a começar pela presença de substâncias (hormônios) que irão sinalizar aos adipócitos a necessidade de liberação de substratos energéticos para suprir uma demanda aumentada ou, no caso de privação de nutrientes, visando poupar a utilização de glicose, menos prioritária para certos territórios do organismo, uma vez que esta é crucial para o adequado funcionamento do sistema nervoso central.

2.1.1 Os Mensageiros

As catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) e a insulina são os principais reguladores de ação rápida da lipólise em humanos[9]. Entretanto, existe outras vias

responsáveis pela estimulação lipolítica e anti-lipolítica. Por exemplo, a via dependente de peptídeos natriuréticos (NPs), que além de exercer efeitos sobre os sistemas cardiovascular e renal também exerce ação importante na estimulação da lipólise *in vivo* e *in vitro*[10].

Efeitos lipolíticos estimulados por hormônio de crescimento (GH), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), IL-6, paratormônio e glicorticóides também já foram demonstrados[11,12,13,14,15,16,17]. Existem ainda hormônios derivados da pró-opiomelanocortina (POMC) como, adrenocorticotropina (ACTH) e o hormônio estimulante dos melanócitos-alfa (αMSH) que exercem atividade lipolítica em adipócitos de roedores, mas não em humanos[18].

De qualquer forma, mesmo com a descoberta de outras substâncias, as catecolaminas ainda integram a principal via fisiológica para a estimulação da lipólise em adipócitos. Especialmente em humanos, durante o jejum, as catecolaminas são os principais hormônios que atuam na estimulação da lipólise. Os efeitos reguladores da lipólise promovidos pelas catecolaminas ocorrem em decorrência da sinalização intracelular desencadeada por ativação de receptores adrenérgicos (β-1, β-2, β-3 e α-2). Em roedores, o receptor adrenérgico β-3 é o principal regulador lipolítico, sendo que, em seres humanos, apenas os receptores adrenérgicos β-1, β-2, e α-2 exercem ação reguladora[19,20]. Os receptores adrenérgicos possuem uma região extracelular e uma região transmembrânica com sete domínios hidrofóbicos que estão acoplados na porção intracelular a proteínas reguladoras ligadas a GTP/GDP ou, como são mais conhecidas, proteínas G (figura 2). Os receptores β-adrenérgicos, estão acoplados a proteínas G_S, que exercem ação estimulatória sobre a adenilato ciclase, enzima intracelular aderida à membrana plasmática que catalisa a formação de AMPc a partir do trifosfato de adenosina (ATP)[21]. Diferentemente, os receptores adrenérgicos α-2 estão acoplados a proteínas G_I, que exerce ação inibitória e que, sendo assim, inibe a atividade da enzima adenilado ciclase, impedindo a formação de AMPc. A noradrenalina possui maior afinidade para receptores adrenérgicos α-2 do que para β-adrenérgicos, sugerindo a existência de um papel para a via adrenérgica-α na regulação da lipólise no tecido adiposo subcutâneo em humanos sob condições de exercício ou estresse[22,23].

Os efeitos desencadeados pelos mensageiros químicos envolvidos na atividade lipolítica do tecido adiposo como as catecolaminas, insulina, peptídeos

natriuréticos, assim como os outros citados anteriormente, estão relacionados com a síntese ou degradação de segundos mensageiros, como por exemplo, AMPc e GMPc, que atuam na ativação de enzimas responsáveis pelo controle lipolítico.

2.1.2 Enzimas, Proteínas e Co-ativadores

O aumento da concentração intracelular de AMPc e GMPc culmina na ativação de quinases proteicas dependentes deles (PKA e PKG). Essas são enzimas capazes de transferir grupos fosfatos de moléculas doadoras de alta energia como ATP, para outras moléculas-alvo (fosforilação). A PKA possui quatro subunidades, duas reguladoras e duas catalíticas. Na presença de seus ativadores a subunidade reguladora sofre mudanças conformacionais resultando na ativação da catalítica[24].

Logo, a via β-adrenérgica, como descrito anteriormente, promove a ativação da PKA por aumentar a concentração de AMPc. Uma vez ativada, a PKA fosforila sítios de serina da hidrolase lipase hormônio sensível (HSL), ativando-a[25] (figura 2). Uma vez ativa, a HSL transloca-se do citosol para a gota lipídica onde se une a uma proteína de ligação de ácidos graxos-4 (FABP4 ou ALBP ou aP2) e então realiza a hidrólise de TAG, diacilgliceróis (DAG) e monoacilgliceróis (MAG) sendo sua taxa relativa de hidrólise 1:10:05 respectivamente[26,27]. Estudos demonstram que adipócitos de camundongos com deficiência de HSL, apresentam diminuição moderada na lipólise estimulada e um acúmulo de DAG em vários tecidos, indicando que a ação da HSL é limitante para a hidrólise de DAG[28,29]. A ação da PKA não para apenas na fosforilação e consequente ativação da HSL. É responsável por fosforilar uma proteína presente na superfície da gota lipídica, chamada perilipina, promovendo seu deslocamento para o citoplasma, ou seja, no sentido inverso da translocação da HSL, permitindo uma interface de contato entre a hidrolase e a gota lipídica[30]. A perilipina faz parte de um grupo de proteínas chamadas de PAT que inclui a perilipina (atualmente denominada perilipina-1), a adipofilina, também chamada de proteína relacionada à diferenciação do adipócito (atualmente denominada como perilipina-2), a proteína de interação caudal-47 kDa (TIP-47 atualmente denominada perilipina-3), a S3-12 (denominada perilipina-4) e OXPAT/MLDP (denominada perilipina-5). Há ainda a presença da proteína específica de gordura - 27 (FSP-27)[31]. Essas proteínas recobrem a gota lipídica

regulando e coordenando o armazenamento dos estoques lipídicos no estado basal e mediando a lipólise estimulada[28,29,30]. Um estudo realizado por Sztalryd *et al.* mostrou que, para a translocação da HSL durante a atividade lipolítica, é essencial a presença e a fosforilação da perilipina-1, uma vez que adipócitos isolados de camundongos que não expressavam perilipina-1 apresentavam uma perda quase que total da atividade lipolítica por estimulação β-adrenérgica[32]. Embora a perilipina-1 restrinja o acesso da HSL ao estoque de TAG, reduzindo assim a lipólise basal, sua presença fosforilada é essencial para a atividade hidrolase da HSL durante a lipólise estimulada[33].

Em 2004, três grupos independentes relataram a existência de uma segunda enzima, que pode ser chamada de lipase de TAG do tecido adiposo (ATGL), desnutrina ou fosfolipase A2 dependente de cálcio (iPLA2). Com isso, a HSL perdeu seu posto de única enzima responsável por hidrolisar TAG em mamíferos, passando a dividir então essa especialidade com outra enzima tão importante quanto[34,35]. A ATGL é altamente expressa em humanos e roedores, e possui uma especificidade em hidrolisar o substrato TAG[34]. No estudo realizado em 2006 por Haemmerle G. et al, foi demonstrado que camundongos *knockout* (KO) para ATGL apresentavam diminuição na liberação de AGL de mais de 75%, com consequente acúmulo ectópico muscular de TAG, o que causava uma grave miopatia no músculo cardíaco e uma deficiência geral no equilíbrio energético, com consequente morte do animal[36].

Os mecanismos moleculares que regulam a atividade da ATGL em resposta à estimulação β-adrenérgica não estão completamente esclarecidos. Embora possa ser fosforilada, não se sabe se esta modificação tem relevância para a sua atividade[30]. Entretanto, sabe-se que a sua atividade aumenta grandemente na presença de um co-ativador denominado CGI-58 (*comparative gene identification-58*) também conhecido como ABHD5 (*alpha/beta-hydrolase domain-containing protein 5*)[37]. Evidências sugerem um mecanismo envolvendo a perilipina-1 e o CGI-58, onde a disponibilidade do co-ativador é dependente da fosforilação da perilipina-1 (figura 1). Em adipócitos sem estimulação lipolítica, o CGI-58 está localizado na superfície da gota lipídica junto à perilipina-1, ao passo que, no estado estimulado a perilipina-1 sofre a fosforilação mediada pela PKA ou PKG, o que provoca seu deslocamento para o citoplasma e a dissociação do co-ativador CGI-58, deixando-o disponível para sua interação e ativação da ATGL[30,38,39]. Foi demonstrado ainda que

presença da proteína FSP-27, colocalizada junto a gota lipídica, exerce papel importante no controle da atividade lipolítica. Tanto a diminuição da expressão de perilipina-1 como a de FSP-27 resultam em elevação da lipólise basal[40]. Em um elegante estudo, observou-se que perilipina-1 e FSP-27 coordenadamente trabalham controlando a capacidade lipolítica dos adipócitos[41]. A FSP-27 atua limitando a presença da ATGL junto a gota lipídica, enquanto que a perilipina-1 age de maneira crucial no controle da resposta lipolítica da ATGL mediada por hormônio beta-adrenérgico, uma vez que no estado basal a perilipina-1 detém o co-ativador responsável pela ativação enzimática da ATGL[41]. Existe ainda uma proteína identificada como produto proteico do gene G0/G1 switch gene 2 (G0S2), que ao interagir com a lipase ATGL modula sua ação, inibindo sua atividade[42]. Juntas, ATGL e HSL são responsáveis por mais de 95% da hidrólise de TAG em adipócitos de camundongos[43].

A outra hidrolase encontrada do adipócito é a lipase de monoacilglicerol (MGL). Diferentemente da ATGL e da HSL, a MGL não hidrolisa TAG e DAG, ela possui ação específca para a hidrólise de monoacilglicerol (MAG)[44.] Embora a sua ação se mostre necessária para a completa hidrólise do TAG *in vitro*, o fato da HSL também ser hábil em hidrolisar MAG não deixa claro se *in vivo* a presença da MGL seja relevante[44,30]. Sua atividade promove a dissociação do último AG e do glicerol da molécula de TAG. Não há evidências de que sua expressão e atividade celulares sejam reguladas por hormônios ou estado energético celular.

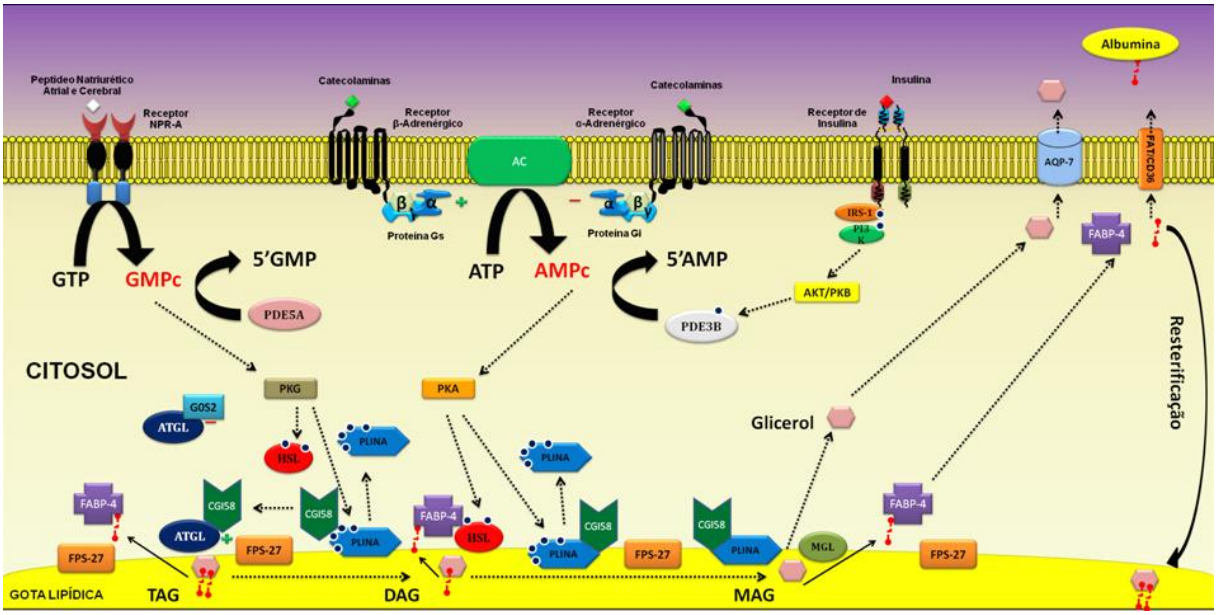
De maneira sucinta, a hidrólise do TAG ocorre a partir de um estímulo que gera a atuação de mensageiros, proteínas, co-atividores e enzimas, principalmente as hidrolases, culminando primeiramente na ação da ATGL sobre o TAG gerando DAG e AGL, em seguida a ação da enzima multifuncional HSL que é capaz de hidrolizar TAG, DAG e MAG, mas que é passo limitante para hidrólise de DAG gerando MAG e AGL e por fim a ação da MGL, eficiente na clivagem de MAG e liberação de AGL e glicerol.

2.1.3 Transporte de AGL e Glicerol

Como já assinalado, após a hidrólise completa do TAG, há liberação dos AGL e glicerol no citoplasma. A etapa final da lipólise é o efluxo destes produtos. O AGL,

por ser pouco hidrossolúvel, representa um problema físicoquímico, além de seu acúmulo poder resultar em toxicidade para a célula. Esse problema é contornado por sua ligação à FABP-4 (proteína de ligação de ácido graxo) que os transporta para a membrana plasmática[45]. Em parte, o seu transporte através da membrana se dá por difusão passiva[46]. No entanto, existem proteínas transportadoras que facilitam este efluxo, como a ácido graxo translocase (FAT/CD36) e proteína transportadora de ácido graxo (FATP) que também funcionam como mediadores da captação de AGL[47]. Entretanto, a participação dessas proteínas no efluxo de AGL ainda não está clara. Uma vez no sangue, ácidos graxos se ligam à albumina e são transportados através da circulação para suprir as necessidades energéticas de vários tecidos[48]. Quanto ao glicerol, este deixa a célula por um canal específico, a aquaporina-7 (AQP_7), presente na membrana dos adipócitos. As aquaporinas são proteínas integrais de membrana que funcionam como canais, permitindo o movimento da água através delas[49,50]. São permeadas pela água e, em graus variados, por alguns solutos orgânicos como o glicerol[49]. A aquaporina-7, por ser permeável a ambos, é uma aquagliceroporina. Animais deficientes em AQP_7 (AQP_7-KO) apresentaram uma liberação de glicerol prejudicada, assim como obesidade durante o envelhecimento[50]. Isto porque o glicerol retido na célula é re-fosforilado pela ação da enzima gliceroquinase (GyK) cuja atividade se apresentou aumentada nestes animais. Isto resulta em re-esterificação intensa e acúmulo de TAG, com conseqüente hipertrofia dos adipócitos em associação com o defeito[47,50,51,52].

Figura 1- Principais vias envolvidas da regulação lipolítica. Vias de transdução de sinal de catecolaminas via receptores adrenérgicos, receptores inibitórios e de peptídeos natriuréticos atrial via receptor tipo A



A hidrólise do TAG por vias adrenérgicas tem início na ligação de catecolaminas ao receptores adrenérgicos, que por sua vez, via proteína Gs, promove um aumento da atividade da Adenilato Ciclase (AC) promovendo um aumento na concentração de AMPc intracelular, o que ativa a proteína quinase (PKA) e que promove a fosforilação de proteínas como a HSL e perilipina. A fosforilação da perilipina induz uma alteração física importante da superfície da gota, que facilita a ação de HSL além de liberar o co-ativador (CGI-58), que interage e ativa a hidrolase ATGL. A ação da ATGL sobre o TAG gera DAG e AGL. A fosforilação da HSL promove sua ativação e translocação do citosol para a superfície das gotículas de gordura onde é capaz de hidrolisar TAG, DAG e MAG, mas que é passo limitante para hidrólise de DAG, gerando MAG e AGL. Por fim, a ação da MGL, que é eficiente na clivagem de MAG e liberação de AGL e glicerol. A proteína quinase (PKA e PKG) envolvidas na fosforilação de proteínas alvo. O efeito antilipolítico da insulina, tem início através da estimulação de receptores de insulina estimulando a fosfodiesterase-3B que promove a degradação do AMPc, impedindo a ativação da PKA. PDE-5A, fosfodiesterase 5A; ATGL, Lipase de triacilgliceróis do tecido adiposo; FABP-4, proteína de ligação de ácidos graxos dos adipócitos 4; GC, da guanilato ciclase, Gi, proteína G inibitória; Gs, proteína G estimulatória; HSL, lipase hormônio-sensível; PLINA, perilina; FPS-27, proteína específica de gordura-27; G0S2, produto proteico do gene G0/G1 switch gene 2. MGL, lipase de monoacilglicerol; AGL, ácidos graxos não-esterificados; NPR-A, receptor tipo A de peptídeos natriuréticos; TAG, triacilgliceróis; DAG, diacilgliceróis; MAG, monoacilgliceróis.

2.1.4 Re-esterificação

A re-esterificação nada mais é que a ressíntese do TAG a partir de AGL liberados após a hidrólise de moléculas de TAG durante a lipólise. Esse fenômeno é também um exemplo de "ciclo fútil", uma vez que ácidos graxos liberados pela lipólise e que não foram usados como substrato energético por outros tecidos são re-esterificados em TAG a expensas de ATP[53]. Em seres humanos em jejum, foi estimado que 60% dos AGs liberados na lipólise são re-esterificados, sendo o tecido

adiposo responsável por boa parte deste processo[54]. Para a ressíntese da molécula de TAG, além dos AGL é preciso também da molécula de glicerol-3-fosfato (G3P). No TAB, encontramos três vias para a geração de G3P: a via glicolítica, a gliceroneogênese e a fosforilação da molécula de glicerol. Admitia-se que a principal via durante o estado alimentado fosse a glicolítica[55]. Por esta hipótese, a glicose seria a principal precursora do G3P, o qual é essencial para o armazenamento dos AGL advindos da dieta, no TAB e no fígado[53]. No entanto, demonstrou-se recentemente que, mesmo em animais alimentados com dieta rica em sacarose, a gliceroneogênese é a via de geração de G3P mais importante[55]. Já no jejum, onde a atividade lipolítica é aumentada, e a baixa concentração de insulina limita o uso da glicose, a gliceroneogênese passa a ser ainda mais intensa[53]. Nesta, ocorre a síntese *de novo* de G3P a partir de piruvato, lactato, alanina e ânions orgânicos do ciclo de Krebs, precursores diferentes da glicose e do glicerol[56]. A principal enzima dessa via é a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCKc)[56]. A outra via de geração de G3P é a da fosforilação direta da molécula de glicerol[57]. Esta via é dependente da enzima GyK (glicerol-quinase), cuja expressão no TAB é apontada por alguns estudos como sendo muito baixa, sendo considerada uma via pouco importante para a re-esterificação[43]. Entretanto, há estudos mostrando que, em certas condições fisiológicas, esta via é uma fonte importante de glicerol[58,59,60].

2.1.5 Diferenças entre depósitos de tecido adiposo branco

Além de toda complexidade já observada na maquinaria que envolve a atividade metabólica do tecido adiposo branco, é importante lembrar que os depósitos de tecido adiposo branco demonstram ter características peculiares entre uma localização anatômica e outra, principalmente em relação a regulação da atividade lipolítica[61]. Em estudos realizados em adipócitos isolados da região visceral de humanos, observou-se maior atividade lipolítica em resposta à estimulação adrenérgica do que em células da região subcutânea[62]. Evidenciou-se também que células da região visceral são menos sensíveis aos efeitos anti-lipolíticos promovidos por agonista de receptor alfa-2 adrenérgico[63]. Estudos *in vivo*, utilizando a técnica de microdiálise, demonstraram que o tecido adiposo epididimal (visceral) é mais responsivo a lipólise via estimulação beta-adrenérgica do que

depósitos de gordura da região subcutânea inguinal[64]. Do mesmo modo, foi mostrado que a expressão gênica e proteica de proteínas lipolíticas tais como ATGL, HSL e lipogênicas como Acetil-Coenzima-A Carboxilase (ACC1), Ácido Graxo Sintase (FAS) apresentam quantidades distintas entre gorduras das regiões subcutânea e visceral, e até entre depósitos com similar localização anatômica (tecido adiposo mesentérico e retroperitoneal, ambos viscerais)[65]. Tais evidências sobre as diferenças entre depósitos de tecido adiposo, são importantes pois ajudam a entender não apenas mecanismos envolvidos na fisiologia do tecido adiposo saudável, mas seu funcionamento em pacientes acometidos por patologias como, síndrome de Cushing, obesidade, lipodistrofia dentre outras. Nesses casos, as alterações na expressão de proteínas, co-ativadores, receptores, enzimas, disponibilidade de substratos, possivelmente ocorrem levando a modificações dos processos metabólicos de mobilização, incorporação de lipídeos e distribuição do tecido adiposo branco, provocando assim um reflexo no organismo como um todo.

2.2 Exercício físico e adiposidade

No mundo contemporâneo, são vários os fatores que favorecem um estilo de vida mais sedentário. A grande parte dos trabalhadores realizam suas funções em seus empregos sem muito gasto de energia, os avanços tecnológicos possibilitam para atividades do dia-a-dia maior conforto com menor gasto energético (carro com direção hidráulica, controle remoto, elevadores, computadores, e outros). O estresse psicológico ou físico da vida moderna devido ao acúmulo de tarefas a serem cumpridas em um só dia reflete-se em falta de tempo para prática de exercício físico regular que, somada à ingestão de alimentos, com elevado teor calórico e baixo valor nutritivo, permite que cada vez mais adultos jovens e crianças tornem-se obesos.

Evidências sugerem que grande parte da obesidade é devida principalmente ao baixo gasto energético e ao alto consumo de alimentos que, associados ao sedentarismo da vida moderna, parecem constituir o maior fator etiológico do crescimento dessa doença nas sociedades industrializadas[66]. Tal sedentarismo é muitas vezes justificado pela falta de um local adequado para uma prática regular de exercício físico, pela questão financeira, e principalmente pela falta de tempo. Hoje,

em meio a tantas formas de comunicação, a comodidade mais do que a falta de informação sobre a importância do exercício físico, parece ser a principal causa da sua não prática.

Como fonte de energia diária, o organismo faz uso de nutrientes presentes nos alimentos. Carboidratos, gorduras e proteínas são os nutrientes que fornecem a energia necessária para manter as atividades orgânicas em repouso e durante o exercício. No exercício, os principais nutrientes utilizados na obtenção de energia são as gorduras e carboidratos, pois as proteínas contribuem em menor proporção para a energia total utilizada [67,68].

Os carboidratos e lipídeos são as principais fontes de energia para o trabalho muscular, fornecendo 4 e 9 kcal/g, respectivamente. Os lipídeos, constituídos predominantemente por moléculas de TAG, após a digestão e absorção, são reconstituídos na mucosa intestinal e secretados para linfa na forma de quilomícrons, e então transportados para a circulação. Os TAG aí contidos são hidrolisados pela lipase de lipoproteínas, dando origem a três moléculas de ácidos graxos livres (AGL) e uma de glicerol.

A capacidade de armazenamento corporal de energia é muito limitada para os carboidratos enquanto que, para os lipídios, pode ser mais de cem vezes maior, o que significa que comparativamente pode ser considerada quase ilimitada. Assim, a maior parte das reservas energéticas no corpo humano é armazenada como TAG no tecido adiposo[67,68]. Exemplificando, adultos magros possuem mais de 80.000 kcal de energia potencial armazenada como TAG. Essa energia corresponde 40 ou mais vezes a quantidade de energia armazenada como glicogênio na musculatura esquelética e no fígado. Para usar este recurso abundante de energia, os triacilgliceróis são primeiramente hidrolisados, e os ácidos graxos resultantes são então transportados para os tecidos onde serão oxidados. Consequentemente, o uso de triacilgliceróis do tecido adiposo como um combustível durante o exercício exige uma regulação, coordenando a lipólise, a circulação sanguínea, e o transporte dos ácidos graxos até a mitocôndria no músculo esquelético[69].

Durante o exercício de baixa-intensidade (consumo máximo do oxigênio de 25%; VO_{2max}), a lipólise no tecido adiposo (medida como a taxa de aparecimento do glicerol na circulação) aumenta de duas a quatro vezes em relação aos valores de repouso[70,71]. Ao mesmo tempo, a taxa de re-esterificação do ácido graxo diminui, tendo por resultado uma proporção maior de ácidos graxos liberados para a

oxidação no músculo esquelético[72]. A taxa lipolítica permanece relativamente estável com o aumento da intensidade do exercício, mas aumenta progressivamente durante o prolongamento do exercício de baixa ou moderada intensidade[73]. Embora a taxa lipolítica permaneça relativamente elevada com o aumento da intensidade do exercício, a liberação de ácidos graxos na circulação declina (AGL plasmático)[73]. Isto pode parecer ineficaz, reduzindo a disponibilidade de uma fonte rica de energia usada como combustível no momento em que as demandas de energia estão alcançando o seu máximo, mas durante o exercício de alta intensidade, os músculos utilizam predominantemente estoques intramusculares de carboidrato e gordura. De fato, mesmo quando os lipídios são infundidos intravenosamente durante exercícios de alta intensidade, aumentando assim as concentrações de ácidos graxos no plasma, a taxa de oxidação é ainda menor do que aquela encontrada em exercícios de baixa intensidade[74].

Percebe-se que o sedentarismo contribui com o desequilíbrio energético, fazendo com que o indivíduo passe a ter armazenamento maior do que a mobilização energética, induzindo assim aumento na massa adiposa corporal. Além disso, o indivíduo sedentário deixa de contar com algumas contribuições fisiológicas que são promovidas pelo exercício, como por exemplo, captação de glicose independente da insulina, a qual envolve mecanismos que culminam em um aumento da translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática[73.]

O aumento na atividade física é fator importante na melhora das condições cardiovasculares, respiratórias e emocionais, além de melhorar a composição corporal e a saúde mental[75]. São ainda incluídos como benefícios decorrentes de um exercício físico regular: diminuição da pressão arterial, melhora da capacidade vital, diminuição ou supressão da sensação de fome, diminuição da resistência à insulina além de outros[76,77].

A melhor maneira de tratar o excesso de adiposidade é mudar o estilo de vida através da prática regular de exercício físico e da reeducação alimentar, para que assim o gasto supere o consumo energético diário[78]. Da mesma maneira que estudos demonstram relações importantes entre exercício físico e adiposidade, também apontam relações diretas entre exercício físico e sensibilidade à insulina. Há menores níveis e maior sensibilidade à insulina em atletas, em comparação aos seus congêneres sedentários[78].

No que diz respeito aos mecanismos moleculares responsáveis por uma melhora da sensibilidade à insulina, uma única sessão de exercício aumenta tanto a atividade dependente de insulina como o número de transportadores de glicose GLUT-4 na membrana plasmática[79], bem como o conteúdo e a atividade do RNA mensageiro da hexocinase II[80]. Os efeitos do treinamento físico poderiam ser explicados em parte pelo efeito residual da última sessão de exercício, mas também poderiam ser explicados pelo efeito crônico induzido pelo treinamento no número de transportadores de glicose, na proliferação capilar e no número de fibras IIa (oxidativas) que, por sua vez, possuem maior teor de GLUT-4[81].

Durante e após sessões repetidas de exercício aeróbio em humanos, observou-se que, juntamente com o aumento da lipólise no tecido adiposo, a insulinemia estava significativamente reduzida e havia um aumento de catecolaminas, hormônio de crescimento (GH) e cortisol[82]. A presença desses hormônios contrarreguladores é responsável por aumentar a disponibilidade de ácidos graxos livres e glicerol, e que uma vez disponibilizados, passam a ser utilizados como substrato energético pela maioria das células, principalmente as musculares esqueléticas.

Outros autores atentam também para a influência do exercício na produção da interleucina-6 (IL-6) e da cinase protéica ativada por AMP (AMPK). A IL-6 é um hormônio que possui ações pró- e anti-inflamatórias e é sintetizado e secretado em grandes quantidades por fibras musculares esqueléticas durante o exercício[83,84]. A AMPK desempenha papel importante na regulação do metabolismo lipídico. Os efeitos decorrentes da sua ativação são aumento na oxidação de ácidos graxos e redução da síntese de glicero-lipídeos[84]. Esses resultados são relevantes para a manutenção dos estoques de glicogênio muscular nos momentos de recuperação que se seguem ao exercício, assim como para a redução da adiposidade e ainda aumento da sensibilidade à insulina[84].

Apesar das contribuições atribuídas ao exercício físico, em estudos realizados anteriormente, a dieta hipercalórica (modelo cafeteria) foi eficiente em causar obesidade e esteatose hepática nos animais, sendo que o treinamento físico isoladamente não foi capaz de atenuar todos os danos promovidos por uma dieta de alto valor calórico, porém mostrou-se um importante atenuador do ganho de peso em massa adiposa[85,86].

2.3 Melatonina e adiposidade

A melatonina (5-metoxi-N-acetiltriptamina) é sintetizada e secretada pela glândula pineal em um ritmo circadiano. Ela é sintetizada a partir de reações localizadas no pinealócito e que convertem primeiramente o triptofano em 5-hidroxitriptofano (realizada pela enzima triptofano 5-hidroxilase), 5-hidroxitriptofano em serotonina (realizada por uma descarboxilase inespecífica), serotonina em N-acetilserotonina (realizada pela enzima aril-alquilamina-N-acetiltranferase - AANAT) e por último N-acetilserotonina em melatonina (realizada pela enzima hidroxindol - O - metiltranferase - HIOMT)[87] (figura 2).

Sua secreção é dependente da ausência de fotoperíodo, ou seja, à noite. Em humanos, o início de sua secreção ocorre 2 horas antes do horário habitual de dormir e atinge valores máximos 03:00-04:00 após adormecer, variando com o cronotipo do indivíduo[87,88]. O tempo de duração de sua secreção é proporcional à duração do período de escuridão[89,90,91].

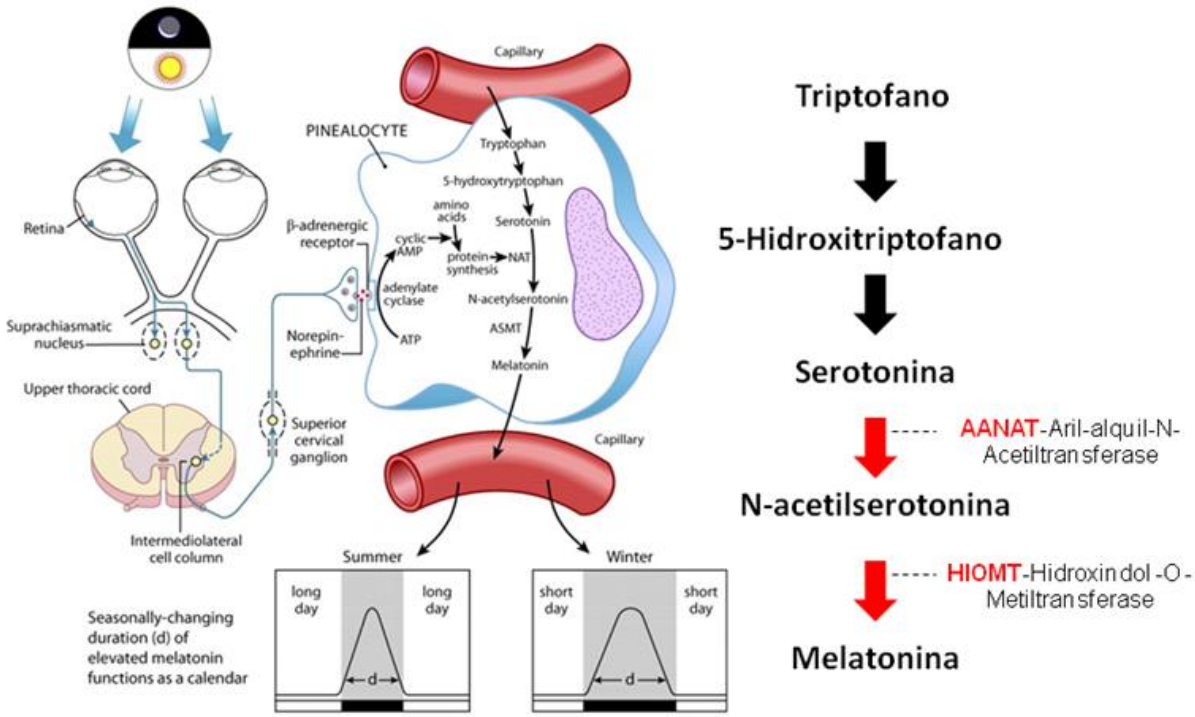
Como a melatonina é dependente da ausência de luz, sua concentração circulante é variável, uma vez que podemos ter noites mais longas ou mais curtas dependendo da estação do ano[87]. Assim sendo é atribuída à glândula pineal a função de sinalizar ao organismo, por meio da melatonina, se é noite ou dia e através da duração de sua secreção, qual é a estação do ano vigente[90].

A melatonina é uma molécula hidro e lipossolúvel, ou seja, no seu conjunto, anfifílica, e isso lhe permite atingir todos os compartimentos do organismo, acessando sítios nucleares e citosólicos, incluindo a mitocôndria, para mediar vários de seus efeitos[90,91,92]. O receptor nuclear conhecido para a melatonina é um dos receptores órfãos da família dos receptores de ácido retinóico do tipo RZR/ROR-α[93]. Alguns dos efeitos atribuídos a essa interação está na expressão da enzima lipo-oxigenase, de enzimas anti-oxidantes e da síntese de interleucina-2[94]. Uma vez na circulação a melatonina possui meia vida de 20 minutos, sendo sua metabolização realizada principalmente pelo fígado.

A melatonina, além de possuir efeitos diretos como antioxidante, também age nas células através de receptores de membrana específicos de alta afinidade, MT1 e MT2[95]. Ambos estão principalmente acoplados a proteína G_i, reduzindo assim a produção de AMPc. Entretanto, o receptor MT1 também possui afinidade por

proteína G_q, o que pode desencadear uma sinalização em cascata que culmina em um aumento na concentração de cálcio intracelular e consequente aumento da atividade da proteína cinase C (PKC)[96]. Ambos receptores de alta afinidade são encontrados difusos por todo organismo inclusive no tecido adiposo.

Figura 2 - Regulação claro e escuro do relógio biológico (núcleo supraquiasmático), produção de melatonina por pinealócitos no verão e inverno



FONTE: Adaptado de Reiter et al. (2009)[97].

Um elo funcional entre a glândula pineal e o tecido adiposo se tornou mais evidente após estudos pioneiros envolvendo adipócitos isolados de tecido adiposo branco incubados com melatonina. Este estudo mostrou que este hormônio aumenta a sensibilidade à insulina medida através de testes de captação de glicose[98], e que a pinealectomia leva ao desenvolvimento de resistência à insulina, com redução do conteúdo e da expressão gênica de GLUT4 neste tecido[99]. A pinealectomia provoca resistência insulínica e hipercorticosteronemia em todos os horários estudados ao longo das 24h do dia, e ainda, provoca uma alteração diária nos parâmetros metabólicos dos adipócitos de forma a resultar num quadro de inadequação entre os

requerimentos energéticos e a capacidade de mobilizá-los de acordo com o ciclo diário de atividade-repouso[100]. Esse mesmo efeito de desorganização rítmica metabólica provocada pela pinealectomia foi constatado quando se estudou resposta secretória de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas frente a um estímulo glicêmico[101].

A glândula pineal, por atuar como um sincronizador interno do metabolismo energético e como um elo de conexão entre o meio ambiente e o organismo do animal, parece funcionar em conjunto com o tecido adiposo como um grande sistema da adaptação metabólica aos desafios ambientais e ao estresse[7]. Mesmo em animais treinados por 8 semanas, o quadro de resistência insulínica provocado pela pinealectomia persistiu, assim como uma piora geral do quadro metabólico[102].

A melatonina atua também como uma reguladora do peso corporal em um modelo de obesidade animal, induzido por dieta hiperlipídica, reduzindo a eficiência alimentar de ratos tratados com melatonina durante 3 semanas[103]. Além da redução do peso, o tratamento impediu efeitos secundários causados pela dieta no metabolismo, tal como diminuição da sensibilidade à insulina[103]. Foi demonstrado ainda que a melatonina não tem efeito em ratos com peso corporal normal, mas altera a massa adiposa de animais com peso elevado pelo envelhecimento[104].

Estudos anteriores demonstraram que a glândula pineal possui um papel muito importante na regulação do metabolismo do adipócito e que sua remoção causa uma alteração severa na adaptação metabólica durante o treinamento físico, influenciando o balanço entre lipogênese e lipólise[102,105]. A glândula pineal é essencial na adaptação do metabolismo dos adipócitos frente às demandas de energia criadas pelo treinamento físico[105]. Distintos trabalhos demonstram que a melatonina tem um papel no gasto energético, no ritmo circadiano da glicemia, na regulação da massa corporal e sobre a secreção e ação da insulina periférica[98,99,100,106].

Há algumas evidências de que a melatonina tenha um efeito inibitório na lipólise basal nos ensaios *in vitro* com adipócitos isolados de rato[107,108]. Reforçando esta evidência, já foi demonstrado que a pinealectomia aumenta a resposta lipolítica do adipócito ao isoproterenol[105].

A administração noturna de melatonina a ratos maduros (10 meses de idade) por período prolongado de 12 semanas, melhora a atividade física, reduz o peso corporal e os níveis de insulina e leptina sanguíneos sem alterar a quantidade de

alimento ingerido[106]. As evidências descritas anteriormente sobre a influência da melatonina no ganho de peso e em perfis metabólicos fazem com que ela seja uma possível alternativa na redução de adiposidade, embora tenha efeitos inibitórios na resposta lipolítica basal em adipócitos isolados.

Conquanto muitos trabalhos evidenciem um efeito positivo do tratamento com melatonina, outros trabalhos *in vivo* chamam a atenção por apontar em outra direção.

Em publicação recente, nosso grupo evidenciou um significante hipogonadismo provocado por um efeito colateral do tratamento de ratos diabéticos com melatonina[109]. Reduções na massa testicular e na concentração plasmática de testosterona também foram observadas em roedores tratados com melatonina[110].

O hipotálamo, a hipófise e os testículos integram o eixo responsável pela secreção adequada de esteroides androgênicos, assim como de uma espermatogênese normal. Os componentes endócrinos do sistema reprodutor masculino são integrados por meio de uma regulação endócrina clássica, as alças de retroalimentação[111]. O hipotálamo secreta GnRH, que estimula a produção das gonadotrofinas (hormônio luteinizante - LH e hormônio folículo estimulante - FSH). O FSH age nos testículos, nas células de Sertoli, estimulando o desenvolvimento de células germinativas presentes. Já o LH estimula a produção de testosterona pelas células de Leydig. A testosterona além de estimular a produção de espermatozoides e promover a virilização, regula a secreção de GnRH pelo hipotálamo através do mecanismo de retroalimentação[111]. Assim sendo, o hipogonadismo é caracterizado por um comprometimento da função testicular que pode afetar a espermatogênese assim como a síntese de testosterona, resultante de um distúrbio primário (testicular) ou secundário (eixo hipotálamo-hipófise)[111].

Em seu trabalho, Wolden-Hanson (2000), mostrou que animais de "meia-idade" tratados com melatonina apresentaram uma redução da massa magra quando comparados aos controles[106]. Recentemente foi sugerido, uma relação entre a melatonina e o aumento da expressão e liberação de um hormônio inibitório de gonadotrofinas (GnIH)[112], o que pode explicar as observações dos trabalhos citados anteriormente.

3 JUSTIFICATIVA

Diante aos fatos relatados anteriormente, onde procuramos mostrar o processo metabólico lipolítico, e as repercussões do exercício físico e da melatonina no organismo, principalmente na composição corporal, entendemos que é de grande importância a investigação da ação conjunta dessas intervenções sobre o tecido adiposo, uma vez que, existem fortes evidências da ação de ambos, na redução do peso corporal e da adiposidade, além de possíveis efeitos gonádicos atribuídos a melatonina. Dessa maneira faz-se necessário uma melhor compreensão da influência do exercício físico e da suplementação com melatonina, sobre aspectos importantes como perfis morfofisiológicos de regiões adiposas distintas, função testicular, controle glicêmico e insulinêmico assim como perfis hormonais e lipoproteicos.

4 OBJETIVO

Os objetivos foram os de averiguar se o treinamento físico somado a suplementação com melatonina modifica a adiposidade dos animais, com ênfase na regulação da atividade lipolítica nos tecidos adiposos, localizados nas regiões subcutânea inguinal e retroperitoneal, além de avaliar os possíveis efeitos antigonadotróficos decorrentes do tratamento com melatonina.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e passaram por aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo n°009).

Foram utilizados 24 ratos machos *Wistar* (7 semanas de idade) fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Foram acondicionados em caixas coletiva de polipropileno (46x24x20 cm com 1 animal/caixa), sob condições de temperatura ambiental controlada de 25 ± 2 °C, ciclo invertido de iluminação escuro/claro 12/12 h (período claro iniciando às 18 h) e exaustão de amônia controlada.

5.2 Procedimentos experimentais

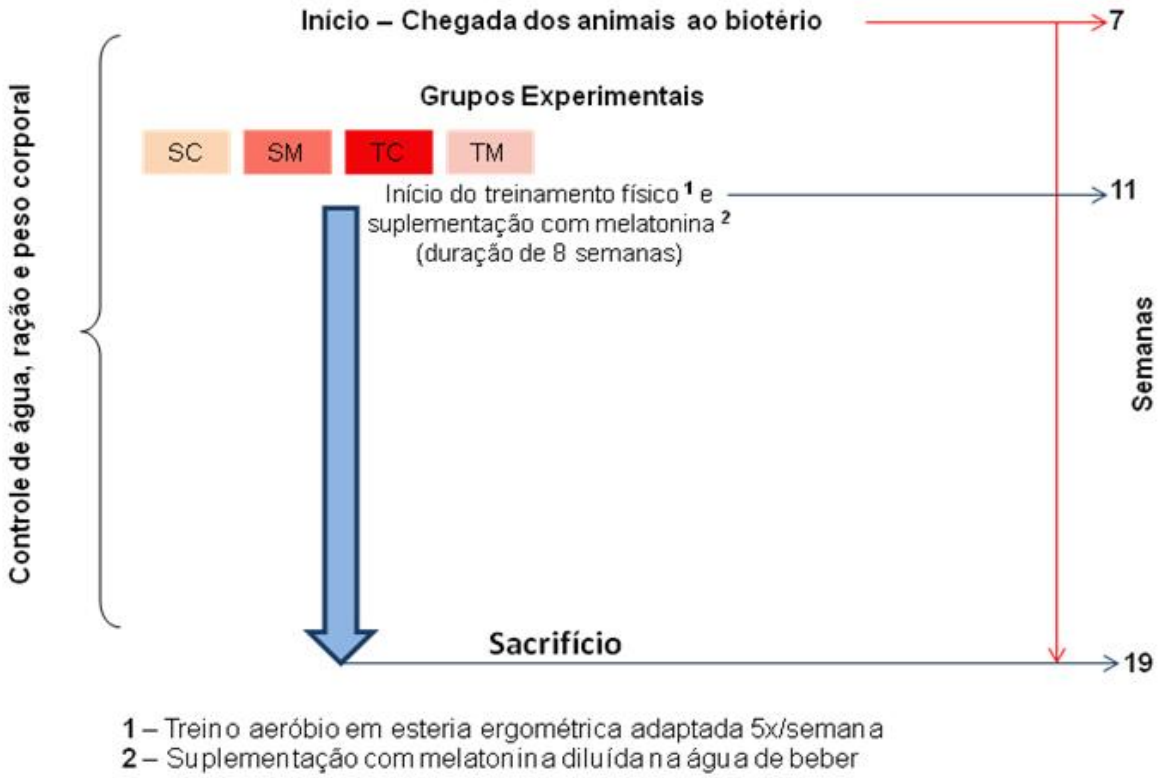
Foram selecionados 20 animais (11 semanas de idade) que apresentavam capacidade para correr em esteira ergométrica. Estes foram divididos em 4 grupos (n=5), sedentário controle (SC), sedentário melatonina (SM), treinado controle (TC) e treinado melatonina (TM). Todos foram alimentados com dieta padrão (Nuvilab). Realizamos o protocolo de intervenção com o treinamento físico e/ou tratamento com melatonina por 8 semanas.

5.3 Tratamento com melatonina

A suplementação com melatonina (Sigma-Aldrich) foi realizada na água de beber (melatonina dissolvida em etanol 0,04 % e diluída na água de beber na dose de 0,2 mg/Kg/dia), a melatonina era preparada duas vezes por semana[104,106,113]. O consumo alimentar e hídrico foram acompanhados 2 vezes/semana e a evolução do peso dos animais 1 vez/semana. O treinamento físico e a suplementação com

melatonina iniciaram no período das 11 semanas de vida dos animais e tiveram duração de 8 semanas (Figura 3).

Figura 3 - Desenho Experimental



5.4 Programa de treinamento físico

O exercício físico consistiu de corridas em esteira ergométrica (Inbrasport®, Porto Alegre, RS, Brasil), com velocidade programável e adaptada com 10 raias para o treinamento de 10 animais simultaneamente. As raias são de acrílico transparente, pintadas em sua extremidade dianteira de preto, criando um ambiente para o qual os ratos são atraídos durante as sessões de treinamento. Esta adaptação facilita o treinamento dos ratos sem a necessidade de uso de choques elétricos. Foram realizados entre e 9:00 e 12:00 horas (as sessões de treinamento ocorreram na fase noturna do ciclo dia/noite, horário em que a espécie é habitualmente mais ativa), por um período de 8 semanas, precedida por um período de seleção-adaptação. No período de seleção-adaptação os animais foram selecionados por sua habilidade de andar/correr a velocidades variando entre 0,3 a

0,6 km/h em esteira, por cerca de 10 a 15 minutos por dia. Os animais considerados inaptos a andar ou correr na esteira foram excluídos sendo que apenas os ativos foram utilizados neste experimento.

Testes de esforço foram realizados ao final da adaptação (fase inicial), no meio e no fim do período experimental. O teste consistiu de incrementos de velocidade de 0,3 km/h a cada 3 minutos iniciando-se com 0,3 km/h até o ponto em que o animal se recusou a correr. Os resultados foram utilizados para cálculo da velocidade media de "*endurance*" no grupo treinado (50-60 % da capacidade máxima).

Os ratos do grupo treinado foram submetidos a um protocolo de treinamento que consiste de um programa de exercício até 1 hora/dia, 5 dias/semana, iniciando-se com tempos curtos e velocidades baixas que gradativamente aumentam até se atingir a intensidade estabelecida (50-60 % da capacidade/velocidade máxima)(ver Anexo A). Na quarta e oitava semanas, foram realizados novos testes de esforço máximo para ajustar a intensidade do treinamento e para se aferir a melhora da capacidade física do animal, respectivamente. A intensidade de treinamento foi aumentada gradualmente pela combinação da velocidade e da duração (a inclinação da esteira foi mantida a 0 ^{o}).

Os ratos alocados ao grupo sedentário foram mantidos sedentários por igual período de tempo. Estes também realizaram testes de capacidade máxima no mesmo período que os treinados.

O protocolo de treinamento que foi utilizado foi adaptado de acordo com Negrão et al.[114] e estabelecido por Dufloth et al.[115] e consistiu de corridas 5 vezes/semana com variações de duração, correspondendo 15 a 60 minutos de treinamento, e de intensidade corrigida por meio de teste de exaustão.

5.5 Avaliações pré e pós eutanásia

Para avaliar se o treinamento e/ou o tratamento com melatonina modificou a adiposidade assim como a atividade lipolítica, foram realizados procedimentos quantitativos pré e pós a eutanásia dos animais.

No decorrer das oito semanas do protocolo experimental, foi realizado o acompanhamento da evolução do peso corporal assim como de ingestão alimentar e hídrica. Após as oito semanas, os grupos foram submetidos a jejum de 15 h,

posteriormente anestesiados (Tiopentax - 4 mg/100 g p.c. i.p.) e sacrificados por decapitação. Foi coletado sangue e posteriormente realizadas as determinações bioquímicas (Glicemia, AGL, TAG, colesterol total e frações) e hormonais (insulina, leptina, adiponectina). Foram coletados, também para a pesagem e/ou estocagem em freezer -80 ºC, os músculos *soleus* (fibras de contração lenta) e extensor digital longo (EDL - fibras de contração rápida), epidídimo, vesícula seminal, testículos e canal deferente. Para a retirada dos tecidos, foi realizada a laparotomia mediana e, em seguida, removidos e pesados os tecidos adiposos retroperitoneal (RP), subcutâneo da região inguinal (SUB), periepididimal (PE) e mesentérico (MS).

Uma parte dos coxins de gordura RP e SUB foi retirada para isolamento e determinação do diâmetro e número de adipócitos, assim como para a avaliação da sensibilidade lipolítica *in vitro*, através da curva dose resposta com isoproterenol e incorporação de glicose em lipídeos. Uma segunda parte dos coxins foi armazenada em freezer -80 ºC e posteriormente avaliada a expressão gênica de enzimas, receptores e proteínas lipolíticas (Receptores Adrenérgicos Beta 1, 2, 3 e Alfa -2a; Aquaporina 7; Perilipina, HSL, FABP4).

Os músculos *soleus* e EDL foram rapidamente retirados e pesados em balança analítica para a obtenção do peso úmido. Em seguida, as amostras foram colocadas em estufa de secagem na temperatura de 37 ºC durante 3 dias para a desidratação dos mesmos. Posteriormente, os músculos foram pesados novamente em balança analítica. Ambos valores do peso úmido e seco foram divididos pelo comprimento da tíbia do animal para normalização e avaliação do peso muscular.

5.6 Experimentos "*in vitro*"

5.6.1 Isolamento dos adipócitos e análise morfométrica

Os adipócitos foram isolados mediante a técnica de digestão do tecido pela colagenase, descrita por Rodbell (1964)[116], com algumas modificações para adaptar o método às condições laboratoriais para realização do estudo. Em resumo, os coxins gordurosos retroperitoneal e subcutâneo foram retirados, picados em fragmentos e incubados em tampão digestivo (DMEM/HEPES 20 mM/BSA 4 %, colagenase II – Sigma-Aldrich - 1,0 mg/ml, pH=7,40) por cerca de 2 horas a 37 ^{o}C

em banho-maria com agitação orbital (150 rpm). Em seguida, as amostras foram filtradas em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e lavada por três vezes com 25 ml de tampão EARLE/HEPES 20 mM/BSA 1 %, piruvato de sódio 1 mM, sem glicose, pH 7,4 e mantido a 37 ºC (tampão EHB). Após a terceira lavagem a concentração foi ajustada para 80 % (lipócrito de 80 %, m:v). Para análise morfométrica, alíquotas de suspensão celular foram fotografadas em microscópio óptico acoplado a câmera digital 1.3 MP (Moticam 1000 - MOTIC). Foi utilizado o programa *Motic-Images Plus 2.0* para medição da área transversal celular, da qual se obteve o raio celular médio (foram medidas 80 células/animal/tecido). A partir deste valor, assumindo-se que o adipócito isolado é esférico, foi calculado o volume e a área de superfície celular média de acordo com as fórmulas proposta por Fine & Girolamo (1997)[117].

5.6.2 Teste de Avaliação da Sensibilidade Lipolítica Frente a Estímulo com Isoproterenol

No teste foram pipetados 20 uL da suspensão celular (80 %) em tampão Earle/Hepes 20 mM/BSA 1 % com glicose 5 mM, pH 7,4 na presença ou ausência de isoproterenol (agente lipolítico). As células foram previamente tratadas por 30 min com adenosina (0,2 uM). Em seguida, foi acrescentada adenosina deaminase (20 mU/mL) juntamente com isoproterenol. A adenosina deaminase possibilita a degradação da adenosina, pois esta tem ação anti-lipolítica e pode mascarar os resultados. O isoproterenol foi adicionado em concentrações crescentes (10^{-12} à $5x10^{-6}$ M) e o tempo de incubação foi de 30 min a 37 °C. Ao final, a mistura de incubação (volume total= 200 uL) foi centrifugada em microcentrífuga refrigerada a 4 °C por 5 min a 7000 rpm. Alíquotas (120 uL) do infranadante foram coletadas para a determinação da concentração de glicerol liberado pelas células (método enzimático-colorimétrico) pelo Kit de Determinação de Glicerol Livre (Sigma-Aldrich)

5.6.3 Teste de Incorporação de D-[U-14C]-Glicose em Lipídeos em Adipócitos Isolados

Adipócitos (conc. final 30-40 %) em tampão Krebs/Ringer/Fosfato/BSA 1 % /glicose 1 mM, pH=7,4 a 37 ^{o}C, saturado de uma mistura gasosa de carbogênio 5 %, foram pipetados em tubos de ensaio de polipropileno 17x100 mm contendo D-[U-^{14}C]-glicose (0,05 uCi/tubo), com ou sem insulina (10 nM). Estes tubos foram vedados com um recipiente plástico emborcado no banho. A seguir, o recipiente foi enriquecidos de uma atmosfera com 95 % de O_2 5 % de CO_2 e incubados por 120 minutos em banho-maria a 37 ^{o}C.

Em seguida, foi realizada a extração dos lípides mediante a adição de 2,5 mL de reativo de DOLE (isopropanol:n-heptano:H_2SO_4 8N, 4:1:0.25 v:v:v) no meio de incubação[118]. Foram adicionados 1,5 mL de n-heptano e 1,5 mL de água deionizada. Após a agitação em vórtex, deixou-se a mistura decantar e alíquotas de 0,5 mL da fase superior (contendo os lipídeos extraídos no n-heptano) foram transferidas para flaconetes contendo 2,5 mL de coquetel de cintilação biodegradável (EcoLume^{TM}, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, EUA) para contagem da radioatividade beta incorporada[116,119]. Os resultados foram expressos em nmol.10^{-6} células. h^{-1}.

5.7 Determinações Bioquímicas e Hormonais

5.7.1 Glicose, Triacilglicerol (TAG), Lipoproteína de Alta Densidade (HDL-c), Colesterol Total, Lipoproteina de Baixa Densidade (LDL-c) e Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (VLDL-c)

A concentração sérica de glicose foi determinada pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase descrito por LOTT et al[120]. O ensaio foi realizado utilizando o kit Glicose Enzimático (Glicose liquiform - referência 133-1 - LABTEST).

O TAG foi determinado pelo método enzimático. Para este ensaio foi utilizado o kit Triglicerídeos (Triglicérides liquiform - referência 87-2/ 100 - LABTEST).

Para a determinação do HDL-c foi utilizado o kit HDL Colesterol Precipitante (Colesterol HDL liquiform - referência 13-50 - LABTEST).

O Colesterol Total foi determinado pelo método enzimático. Para este ensaio foi utilizado o kit Colesterol (Colesterol liquiform - referência 76-2 / 100 - LABTEST).

As concentrações de LDL-c e VLDL-c foram calculadas através da equação de Friedewald, como segue a seguir:

- VLDL-c = TAG / 5
- LDL-c = Colesterol Total - (HDL-c + VLDL-c)

5.7.2 Insulina, Leptina e Adiponectina

Foram utilizadas técnicas de radioimunoensaio. As concentrações séricas de insulina, leptina, adiponectina foram determinadas usando kits comerciais específicos para rato. Insulina (kit RI-13K, Millipore Corporation, St Charles, MO, EUA):sensibilidade de 0,0329 ng/dL. Leptina (kit RL-83K, Millipore Corporation): sensibilidade de 0,639 ng/dL. Adiponectina (kit MADP-60HK, Millipore Corporation): sensibilidade de 1 ng/dL.

5.7.3 Avaliação da Sensibilidade Insulínica periférica pelo Modelo de Análise Homeostática ($HOMA_{IR}$) [121]

Calculado a partir da fórmula: glicemia* (mmo/l) x insulinemia* (µU/ml)/22,5.
*** valores em jejum**

5.8 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativo – qPCR

5.8.1 Extração de RNA total

Amostras de 200 mg dos tecidos adiposos SUB e RP foram homogeneizadas em Polytron (PT 3100, Kinematica AG) por 30 segundos com trizol (Trizol Reagent®, Invitrogen, Life Technologies, PA, EUA), na proporção de 1 mL para cada 100 mg de amostra, seguindo-se as especificações do fabricante. A seguir, os homogenatos foram aliquotados em tubos de 1 mL e armazenados a -80 ºC para posterior extração.

Na etapa da extração, as amostras foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente (15-25 ºC) para permitir a completa dissolução dos complexos

nucleoproteicos. Em seguida, 0,2 ml de clorofórmio foram adicionados aos tubos, agitando-se vigorosamente em vórtex, por 15 segundos, com posterior incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. A mistura foi centrifugada a 1200 *g* por 15 minutos a 4 ºC, e ao final foram formadas 3 fases. A fase aquosa superior, contendo RNA, foi transferida para outro tubo e a purificação do RNA foi feita por coluna, seguindo o protocolo do kit manufaturado PureLink RNA Mini kit® (Cat. No. 12183-018 A, Ambion by Life Technologies, Carlsbad, CA, 92008, USA).

O RNA total foi quantificado em leitura espectrofotométrica em Nanodrop 2000 (Nano-drop Technologies, Wilmington, DE) a 260 nm. Para análise da pureza do RNA, adotou-se o cálculo da razão do valor da absorbância a 260 nm pelo valor da absorbância a 280 nm (comprimento de onda definido para leitura de proteínas), onde se estipula como razão ideal para aceitação da amostra o intervalo entre 1,6-2,0. Alíquotas de 1 uL de amostras contendo 2 ug de RNA total diluído em água DEPC foram armazenadas a -80 ºC.

5.8.2 Síntese de cDNA por transcrição reversa

Na etapa inicial, dilui-se a DNAse, pipetou-se 1 uL de tampão de DNAse (10x) e 2 uL da enzima DNAse (1 U/1 uL) e 7 uL H_2O RNAse Free. Na etapa seguinte. foi pipetado em tubos 0,32 uL da DNAse diluída, 1,68 uL MgCl2 (50mM), 2 ug de RNA total completando-os para 20 uL com H_2O RNAse Free. A mistura foi incubada a 37 ºC por 30 minutos seguidos de 10 minutos a 75 ºC e posteriormente colocada em gelo. Isto foi feito com a finalidade de evitar uma possível amplificação de DNA genômico, que pode contaminar o RNA extraído. Na etapa seguinte (síntese de DNA), pipetou-se nos tubos contendo 20 uL de amostra tratada com DNAse 10 uL de Randon Primer [0,75 ug/uL], 20 uL de mistura de dNTPs 10 mM, 20 uL tampão da enzima transcriptase reversa (5x), 10 uL de ditiotreitol DTT 0,1 M, 1uL da ezima transcriptase reversa (Superscript® III, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e 19 uL de H_2O RNAse Free tendo assim um volume final de 100 uL. Os tubos foram incubados a 25 ºC por 10 minutos, 55 ºC por 50 minutos e 70 ºC por 15min. As incubações foram realizadas em termociclador (Eppendorf®, Hamburg, HH, Alemanha). O material obtido (cDNA) foi então mantido em freezer a -20 ºC até a realização da próxima etapa – amplificação por PCR.

5.8.3 PCR quantitativo (real time)

Alíquotas de 2 uL de amostra de cDNA (40 ng) obtidas a partir da reação de RT foram adicionadas a um *mix* contendo 2,65 uL de água DEPC autoclavada, 0,5 uL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, código do produto: 4304437, São Paulo, SP, Brasil), 0,35 uL de TaqMan® Gene Expression Assay Mix 20x (para rato e específico para cada gene) contendo os dois primers para PCR e uma sonda MGB TaqMan® marcada com FAM e um mix preformulado na concentração de 20x, na concentração final 1x de 250 nM de sonda e 900 nM de cada primer (a tabela 1 mostra a lista dos kits invetoriados utilizados com seus respectivos números de catálogo). As reações de PCR foram realizadas em aparelho StepOnePlus® Real Time PCR System (Applied Biosystems). A reação de PCR inicia-se com um período de 2 minutos para ativação da AmpErase® UNG seguida de 10 minutos a 95 ºC para a ativação da AmpliTaq Gold® DNA Polymerase. Essa fase só ocorre no primeiro ciclo de reação. As etapas seguintes envolvem desnaturação da fita de cDNA a temperatura de 95 ºC por 15 segundos, seguida da fase de anelamento do *primer* e extensão da fita por 1 minuto na temperatura de 60 ºC. Essas 2 fases se repetiram a cada ciclo por 40 ciclos.

A análise da expressão gênica foi realizada por quantificação relativa pelo método de CT comparativo ($\Delta\Delta C_T$).

5.8.4 Quantificação relativa – Método de CT comparativo (ΔΔCT)

Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa, utilizando um gene constitutivo como referência. A seguinte fórmula foi usada para calcular a quantidade relativa do gene alvo:

$$\Delta C_T = C_T(\text{alvo}) - C_T(\text{constitutivo})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{amostra}) - \Delta C_T(\text{média controle})$$

$$\text{Quantidade relativa} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\text{Normalização} = 2^{-\Delta\Delta CT}(\text{amostra}) / 2^{-\Delta\Delta CT}(\text{média controle})$$

Tabela 1 - Lista de kits invetoriados (Applied Biosystems, TaqMan® Gene Expression Assay Mix 20x)

Gene	Sigla de catálogo	Nº de catálogo
Lipase Sensível a Hormônio	Lipe	Rn_00563444_m1
Perilipina-1	Plin1	Rn_00558672_m1
Receptor Adrenérgico Beta-1	Adrb1	Rn_00824536_s1
Receptor Adrenérgico Beta-2	Adrb2	Rn_00560650_s1
Receptor Adrenérgico Beta-3	Adrb3	Rn_00565393_m1
Receptor Adrenérgico Alfa-2a	Adra2a	Rn_00562488_s1
Aquaporina-7	Aqp7	Rn_01764624_g1
Proteína de Ligação de Ácidos Graxos-4	FABP4	Rn_04219585_m1
Beta-2 Microblobulina	B2m	Rn_00560865_m1
Beta Actina	Actb	Rn_00667869_m1

FONTE: http://www.appliedbiosystems.com.br

5.8.5 Seleção de controladores endógenos (housekeeping genes)

Realizou-se reações de qPCR para cada possível controle endógeno: Beta-Actina (Actb) e Beta-2 Microblobulina (B2m), utilizando-se amostras dos animais submetidos ao protocolo experimental da pesquisa. As amostras de controle endógeno com menor variação para o protocolo experimental da pesquisa nesses tecidos e para esse modelo experimental, foi o B2m.

5.9 Tratamento Estatístico dos Dados

O teste ANOVA *Two Way* foi utilizado para avaliar a existência de diferenças entre os grupos (SC, SM, TC e TM). Para análise da evolução de peso, consumo e estado de condicionamento físico (teste de esforço máximo), foi utilizado ANOVA *Three Way* com uma medida repetida. O teste Bonferroni foi empregado como pós-teste, com o intuito de comparar diferenças entre os grupos. Para análise de correlação, foi empregado o teste de Person. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), o grau de significância adotado foi de 5 % ($p <$

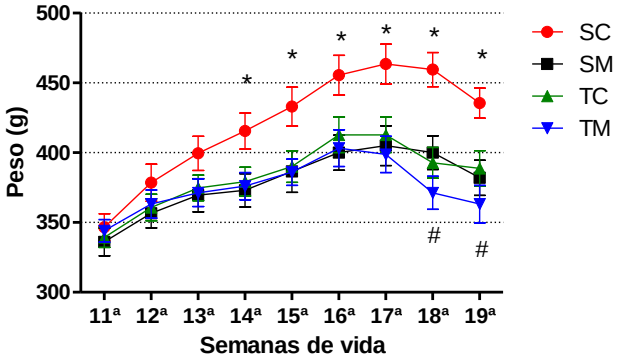
0,05). As análises foram feitas a partir do software Sigma Plot para windows versão 10.0 (Systat Software, Alemanha, 2006) e GraphPad Prism para windows versão 5.0 (GraphPad SoftwareSan Diego California USA).

6 RESULTADOS

6.1 Peso corporal

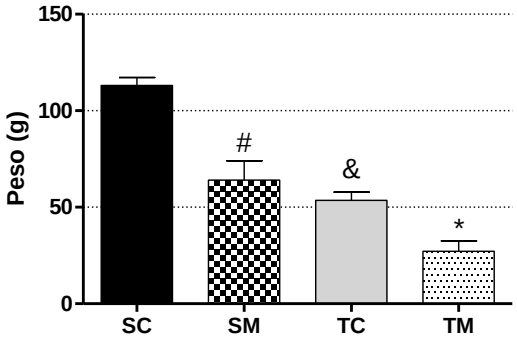
Em relação ao peso corporal, os animais tratados e/ou treinados, apresentaram redução significativa (figura 4 e tabela B.1), sendo evidenciado no ganho de peso total (figura 5 e tabela B.2). Sedentário controle (SC), sedentário melatonina (SM), treinado controle (TC) e treinado melatonina (TM).

Figura 4 - Curva de Peso Corporal



Valores expressos em gramas representam a média ± EPM (n=4-5). (*) SC vs demais grupos (#) TM vs. SC ou TC (p<0,05).

Figura 5 - Ganho de Peso Corporal

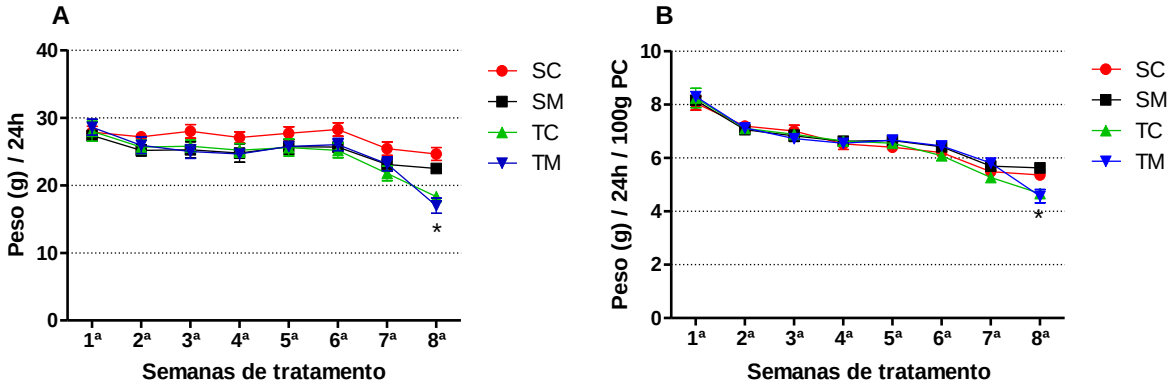


Valores expressos em gramas representam a média ± EPM (n=4-5). (*) vs. demais grupos (#) vs. SC (&) vs. SC (p<0,05).
FONTE: (Proença, 2013).

6.2 Consumo

Todos os grupos ao longo das 8 semanas, apresentaram uma ingestão alimentar similar, sendo que somente na última semana foi observado diferença estatística (figura 6 e tabela B.3 e 4) entre grupos treinados (T) e sedentários (S).

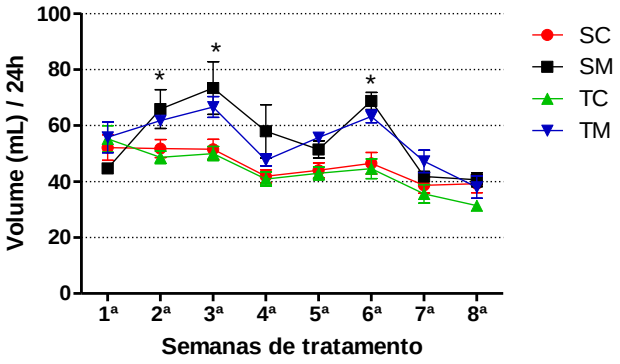
Figura 6 - Ingestão Alimentar



Em A os dados representam o valor absoluto da ingestão por dia. Em B os dados foram normalizados por 100g de peso corporal. Valores expressos em gramas representam a média ± EPM (n=4-5).
(*) vs. S (p<0,05).

O consumo hídrico nas semanas 2, 3 e 6 apresentaram diferença significativa entre os grupos tratados com melatonina (M) e não tratados (C) (figura 7 e tabela B.5).

Figura 7 - Consumo Hídrico

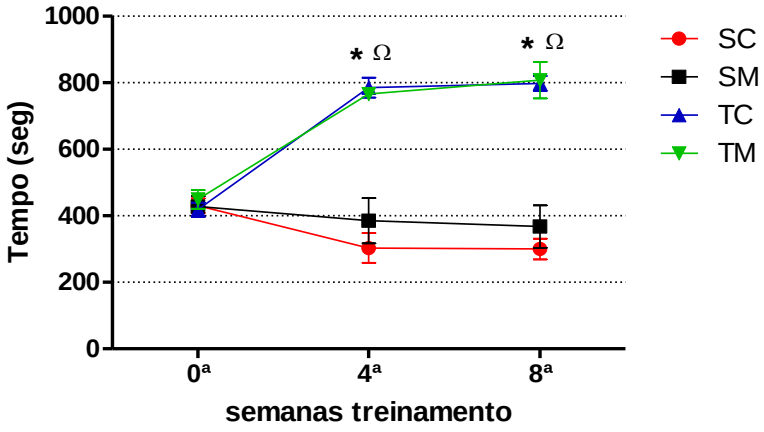


Valores expressos em mL representam a média ± EPM (n=4-5). (*) vs. C (p<0,05).
FONTE: (Proença, 2013).

6.3 Treinamento Físico

A eficácia do treinamento físico foi avaliada através de testes de esforço máximo. O teste de esforço máximo foi realizado em esteira ergométrica no início, meio e fim dos protocolos, sendo representada como tempo máximo atingido durante o teste (em segundos). A figura 8 (tabela B.6) demonstra que, ao início dos protocolos (semana zero), os animais tanto os dos grupos treinados quanto os dos sedentários apresentavam mesma capacidade física. Observa-se um aumento significativo no tempo máximo alcançado pelos ratos treinados na 4ª e 8ª semana em comparação aos que se mantiveram sedentários. Esse resultado nos indica que o treinamento físico aeróbio de baixa intensidade (50-60 % da capacidade máxima) aumentou em até 100 % a capacidade física dos grupos treinados em relação aos grupos sedentários. Houve uma melhora significativa no desempenho dos animais dos grupos treinados quando se comparam as semanas inicial e final do treinamento, independentemente da comparação com os sedentários.

Figura 8 - Teste de Esforço Máximo

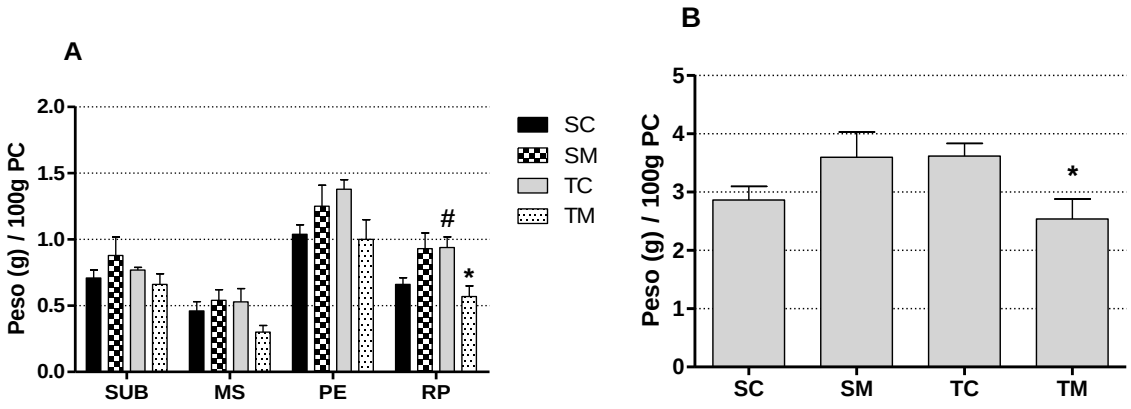


Tempo máximo alcançado durante o teste de esforço realizado no início, na quarta e oitava semanas, nos ratos sedentários e treinados. Valores expressos em (segundos) correspondem a média ± EPM (n=4-5). (*) vs. S (Ω) vs semana 0ª (p<0,05).

6.4 Coxins Adiposos

Após a eutanásia dos animais, as gorduras – SUB, MS, PE e RP – foram retiradas e pesadas. O grupo TM apresentou redução significativa apenas no coxim de gordura RP (figura 9A e tabela B.7). No entanto, observamos uma redução no peso total de todos os coxins (figura 9B e tabela B.7). De maneira curiosa, o grupo SC apesar de ter tido um peso corporal final maior, isso não se refletiu no peso dos coxins adiposos.

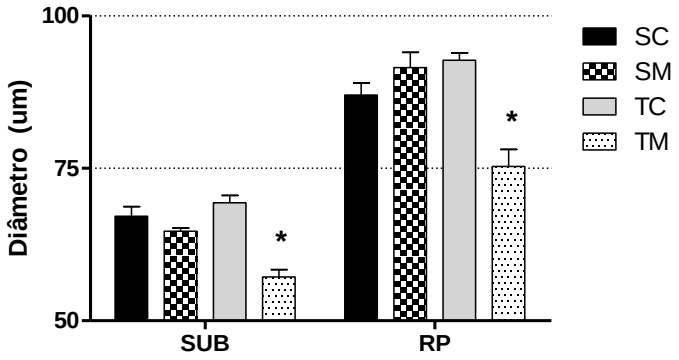
Figura 9 - A - Coxins Adiposos (SUB, MS, PE e RP). **B -** Coxim Adiposo Total



Valores expressos em (g / 100g de peso corporal). As barras representam as médias ± EPM). Em A os dados foram agrupados de maneira a demonstrar o peso dos coxins adiposos das regiões SUB, MS, PE e RP dos grupos SC, SM, TC e TM, normalizados por 100g de peso corporal (n=4-5). (*) vs. TC ou SM (#) vs. SC ($p<0,05$). Em B os dados representam a soma de todos os coxins, normalizados por 100g de peso corporal (*) vs. TC ou SM ($p<0,05$).

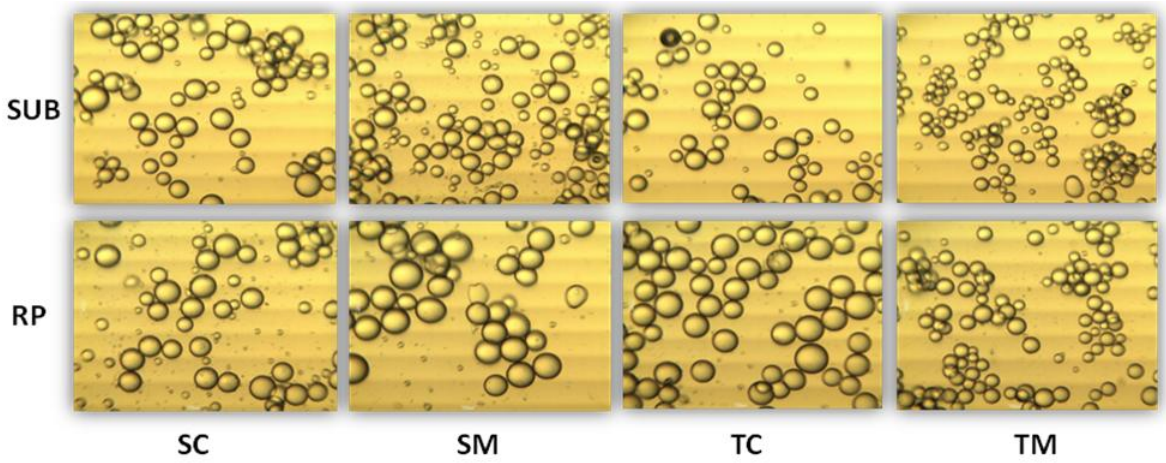
Depois de isolados, os adipócitos tiveram o diâmetro mensurado. O grupo TM apresentou significativamente adipócitos menores nas regiões SUB e RP comparados aos demais grupos (figuras 10 e 11 e tabela B.8). Por meio de uma estimativa da quantidade de adipócitos presentes nos coxins SUB e RP, foi observado que os animais tratados com melatonina (M) apresentaram maior quantidade de adipócitos no tecido SUB quando comparados aos controle (C) (figura 12 e tabela B.9).

Figura 10 - Diâmetro dos Adipócitos Isolados (SUB e RP)



Foram determinados os diâmetros médios de adipócitos isolados dos coxins SUB e RP. As barras representam média ± EPM. Valores expressos em µm (n=4-5). (*) vs. demais grupos (p<0,05).

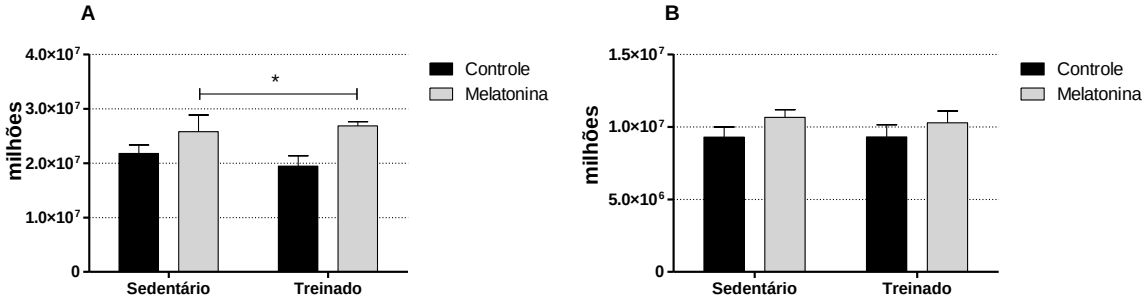
Figura 11 - Microfotografia dos Adipócitos Isolados



Imagens representativas do diâmetro médio dos adipócitos de dos tecidos SUB e RP dos respectivos grupos (SC;SM;TC e TM).

Figura 12 - A - Número de Adipócitos no tecido SUB

B - Número de Adipócitos no tecido RP

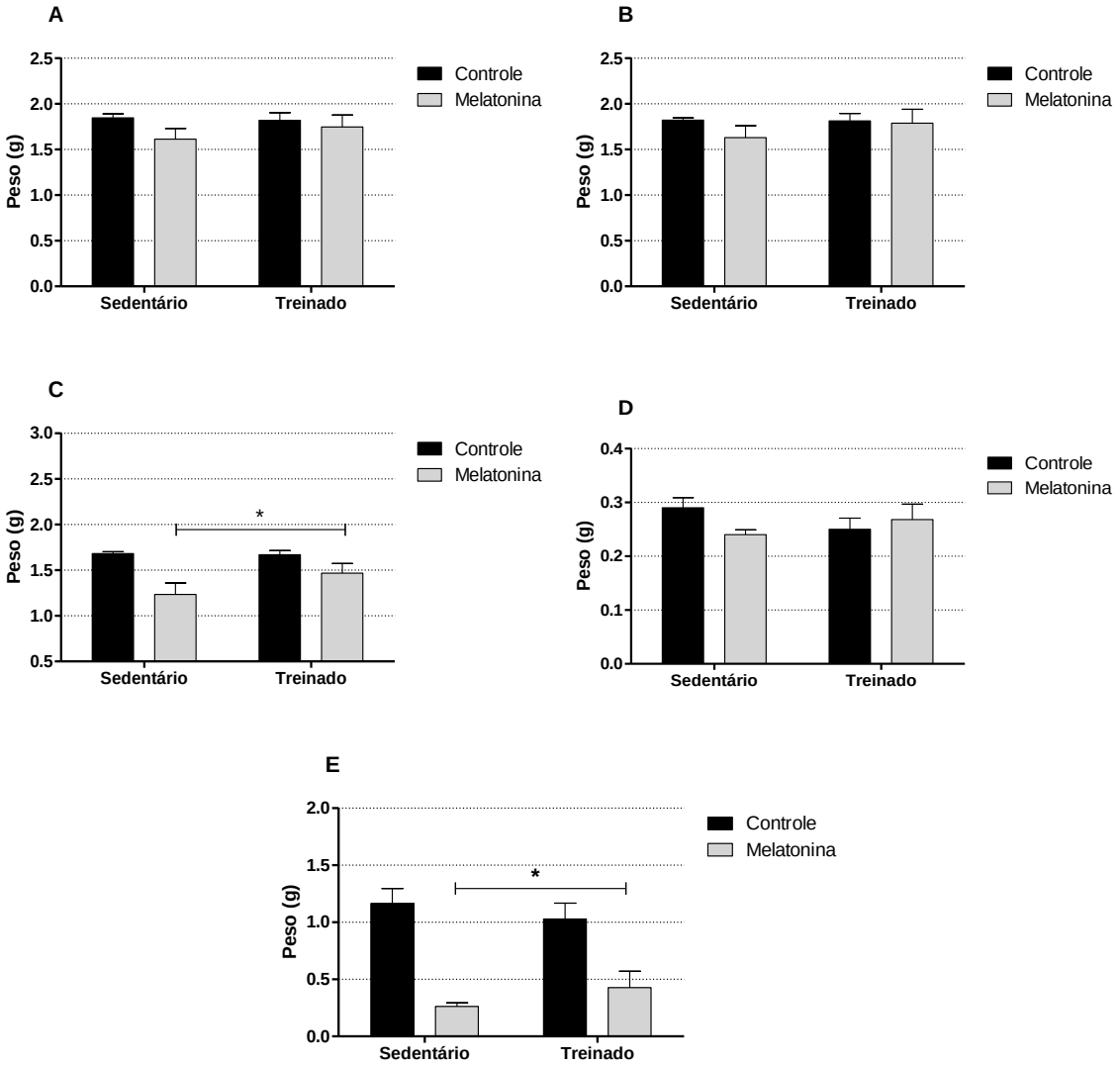


Comparação do número estimado de adipócitos presentes em cada tecido, medida expressa em milhões de células. As barras representam à média ± EPM dos grupos, (n=4-5). (*) vs C ($p<0,05$).

6.5 Estruturas Reprodutoras

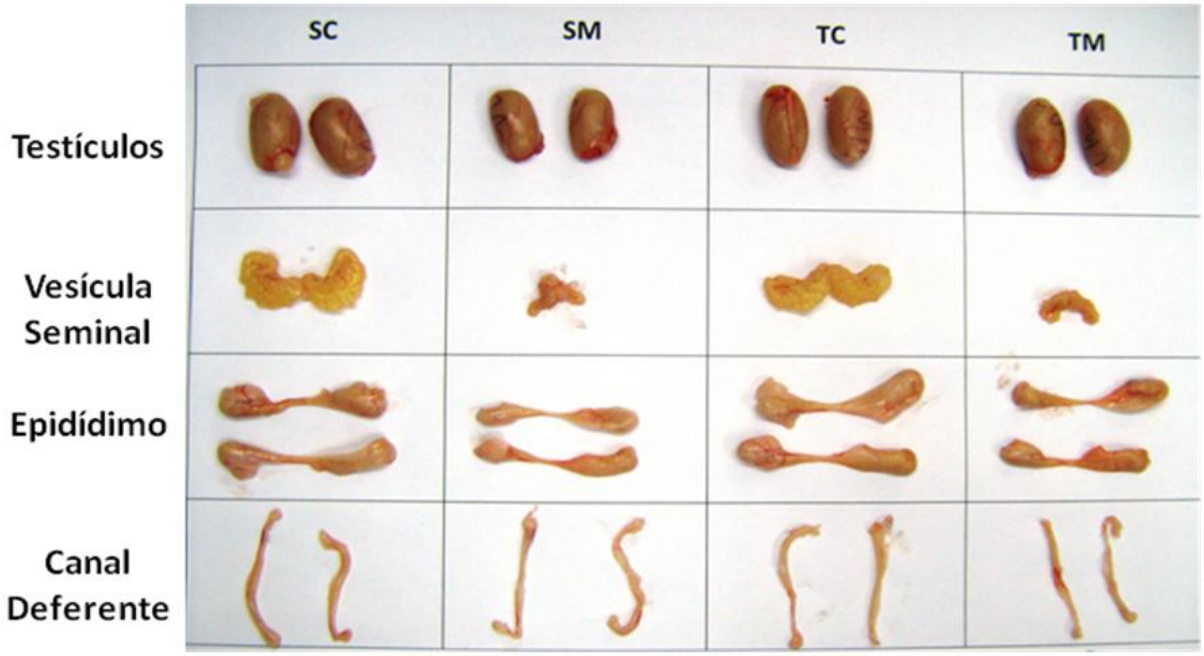
As estruturas reprodutoras (testículo, epidídimo, canal deferente, e vesícula seminal) foram retiradas e pesadas. Os animais que foram tratados com melatonina (M) apresentaram reduções significativas dos epidídimos e vesículas seminais (figuras 13 e 14 e tabela B.10). Na figura 13 é possível observar que o tratamento com melatonina promoveu uma hipotrofia principalmente na vesícula seminal.

Figura 13 - Estruturas reprodutoras. **A -** Testículo direito. **B -** Testículo esquerdo. **C -** Epidídimo. **D -** Canal deferente. **E -** Vesícula seminal.



As estruturas foram extraídas e pesadas**.** Valores representam a média ± EPM e expressos em gramas (n=4-5). (*) vs. C (p<0,05).

Figura 14 - Imagem das Estruturas Reprodutoras

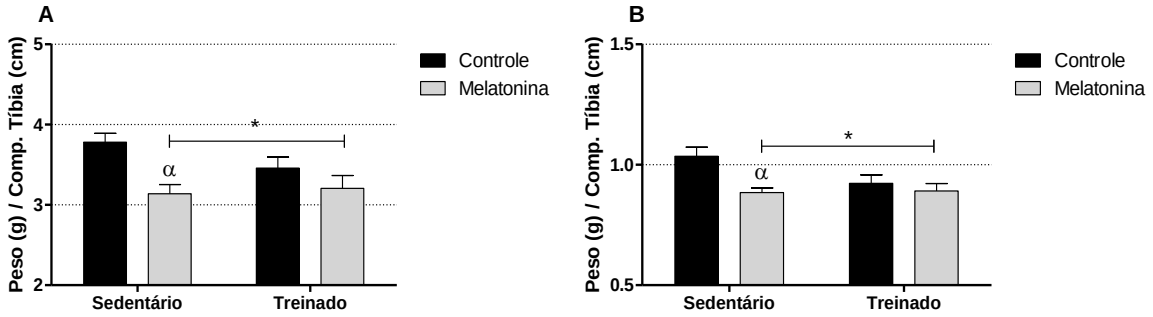


Grupos: SC – Sedentário Controle; SM – Sedentário Melatonina; TC – Treinado Controle e TM – Treinado Melatonina.

6.6 Músculo Esquelético

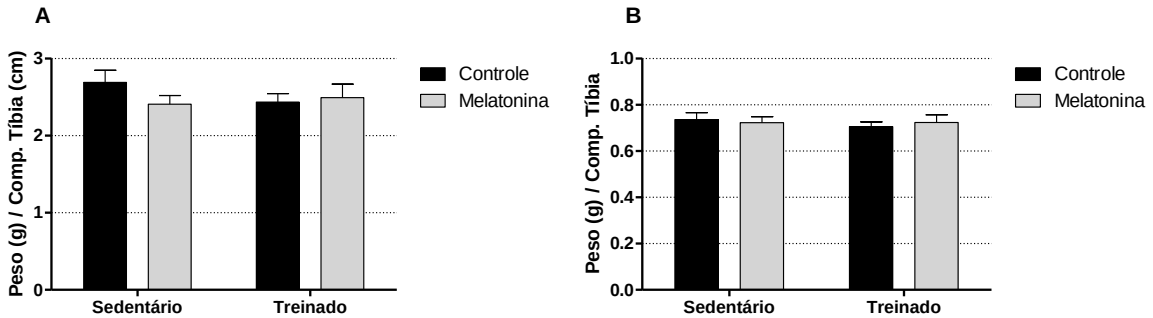
Os músculos sóleo e o extensor digital longo (EDL) foram removidos e pesados após o sacrifício. Posteriormente, foram colocados em estufa para desidratação e novamente pesados. Observamos que os animais tratados com melatonina apresentaram peso seco e úmido do EDL menor, comparado aos animais controle (figura 15 e tabela B.11). Em relação ao músculo sóleo, não foram observadas diferenças (figura 16 e tabela B.11).

Figura 15 - A - Peso úmido do músculo EDL. **B -** Peso seco do músculo EDL



Valores representam a média ± EPM e expressos em gramas (n=4-5). Em A é demonstrado o peso úmido do EDL normalizado pelo comprimento da tíbia. Em B é demonstrado o peso seco do EDL normalizado pelo comprimento da tíbia (*) vs. C (α) vs. SC (p<0,05).

Figura 16 - A - Peso úmido do m. *soleus*. **B -** Peso seco do m. *soleus*



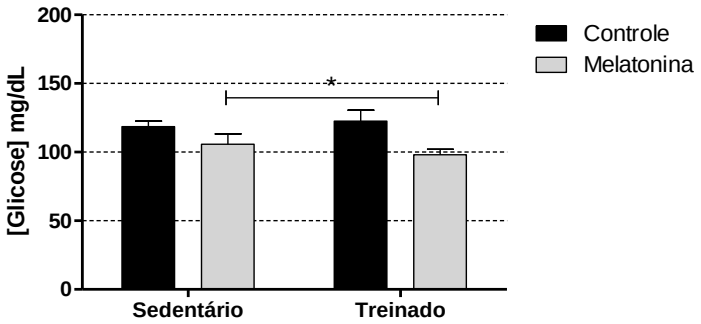
Valores representam a média ± EPM e expressos em gramas (n=4-5). Em A é demonstrado o peso úmido do sóleo normalizado pelo comprimento da tíbia. Em B é demonstrado o peso seco do EDL normalizado pelo comprimento da tíbia. Não foram constatadas diferenças significativas.

6.7 Determinações Bioquímicas e Hormonais

6.7.1 Glicose, Insulina

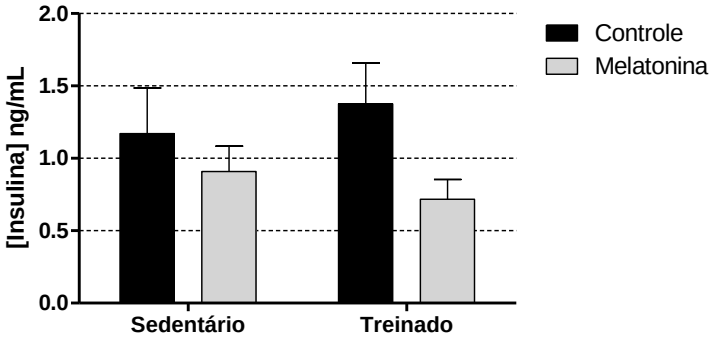
A figuras 17 (tabela B.12) mostra que os animais tratados com melatonina apresentaram menor concentração de glicose plasmática em jejum. A insulinemia, apesar de apresentar-se reduzida nos animais tratados com melatonina, não se mostrou significativamente diferente (figura 18 e tabela B.13). No entanto, utilizando o índice HOMA-IR, verificamos uma possível influência da melatonina sobre o controle da homeostase glicídica pela insulina (figura 19 e tabela B.14). O resultado do HOMA-IR indicou que os animais tratados com melatonina apresentavam uma melhor resposta à insulina.

Figura 17 - Glicose Plasmática



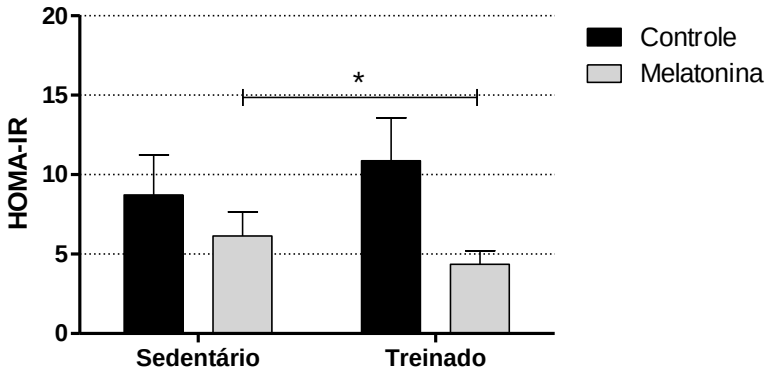
Valores expressos em [mg/dL] representam a média ± EPM (n=4-5). (*) vs. C (p<0,05).

Figura 18 - Insulina Plasmática



Valores expressos em [ng/mL] representam a média ± EPM (n=4-5). Não foram constatadas diferenças significativas.

Figura 19 - HOMA-IR

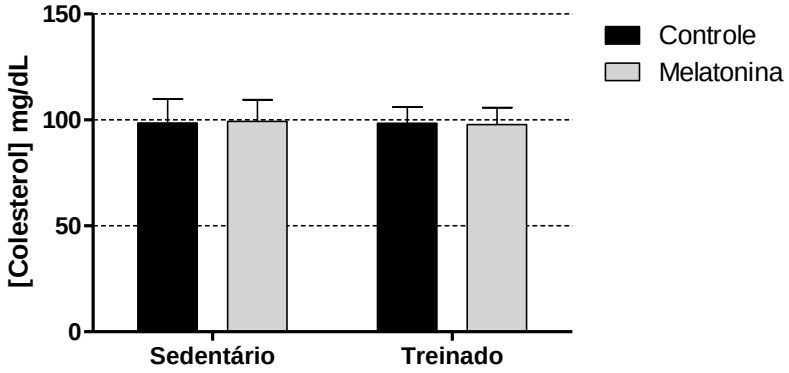


Valores e expressos em [(glicose/insulina) x 10^{-4}] representam a média ± EPM (n=4-5). (*) vs. C ($p<0,05$).

6.7.2 Colesterolemia

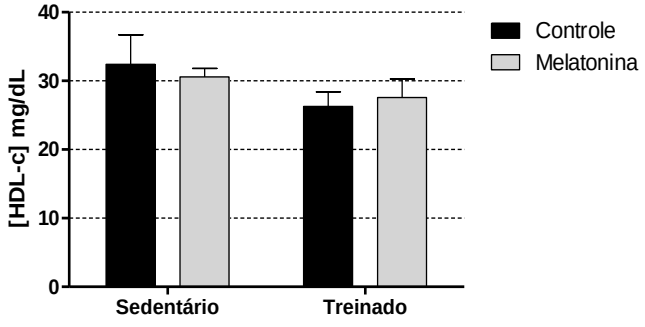
Em relação a colesterolemia (colesterol total, HDL-c, LDL-c e VLDL-c), os animais apresentaram diferença somente na concentração estimada de VLDL-c entre os animais treinados (T) vs sedentários (S) (figura 23 e tabela B.15), sendo que os animais treinados apresentaram valores reduzidos com relação aos grupos sedentários.

Figura 20 - Colesterol Total



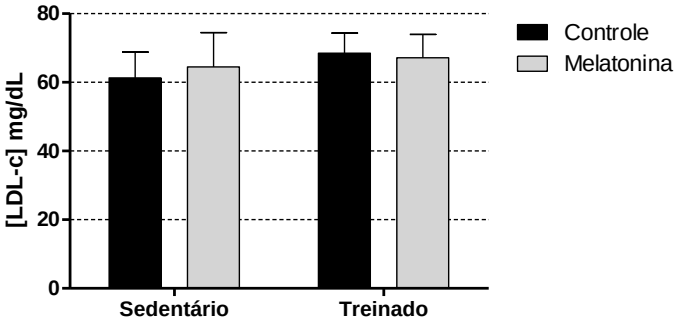
Valores expressos em [mg/dL] representam a média ± EPM (n=4-5). Não foram constatadas diferenças significativas.

Figura 21 - HDL-c



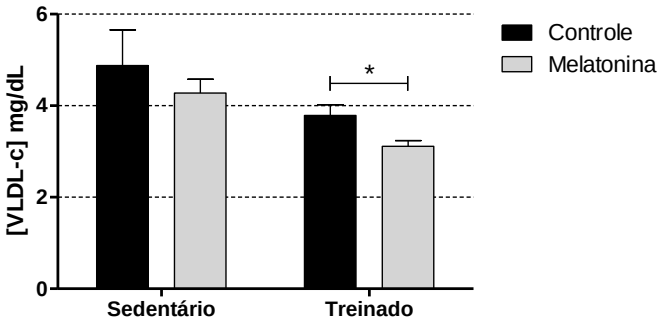
Valores expressos em [mg/dL] representam a média ± EPM (n=4-5). Não foram constatadas diferenças significativas.

Figura 22 - LDL-c



Valores expressos em [mg/dL] representam a média ± EPM (n=4-5). Não foram constatadas diferenças significativas.

Figura 23 - VLDL-c

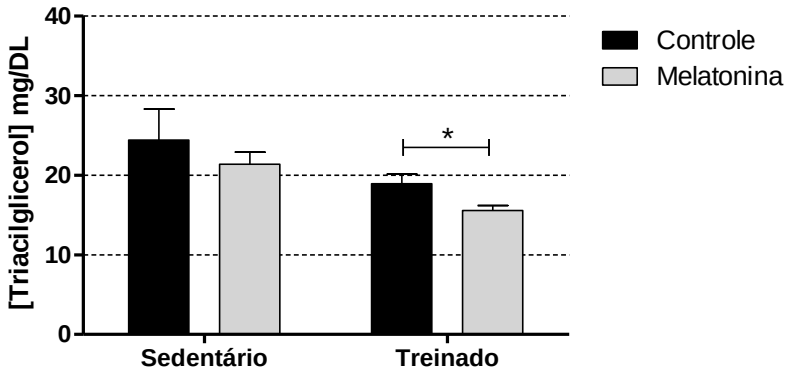


Valores expressos em [mg/dL] representam a média ± EPM (n=4-5). (*) vs. S (p<0,05).

6.7.3 Trigliceridemia

O metabolismo TAG encontrava-se alterado nos grupos estudados. A figura 24 (tabela B.16) mostra que à concentração sérica de TAG, estava reduzida nos grupos submetidos ao treinamento físico, e que a melatonina não provocou alterações nesse parâmetro.

Figura 24 - TAG

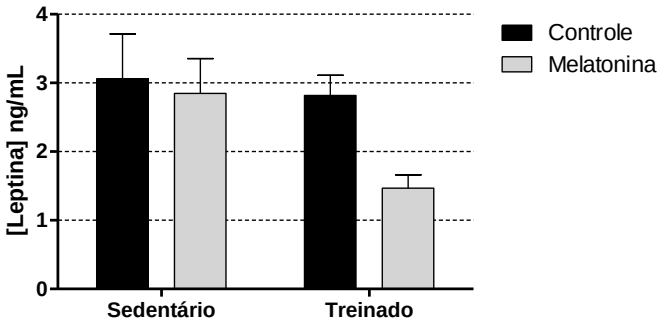


Valores expressos em [mg/dL] representam a média ± EPM (n=4-5). (*) vs. S (p<0,05).

6.7.4 Leptina e adiponectina

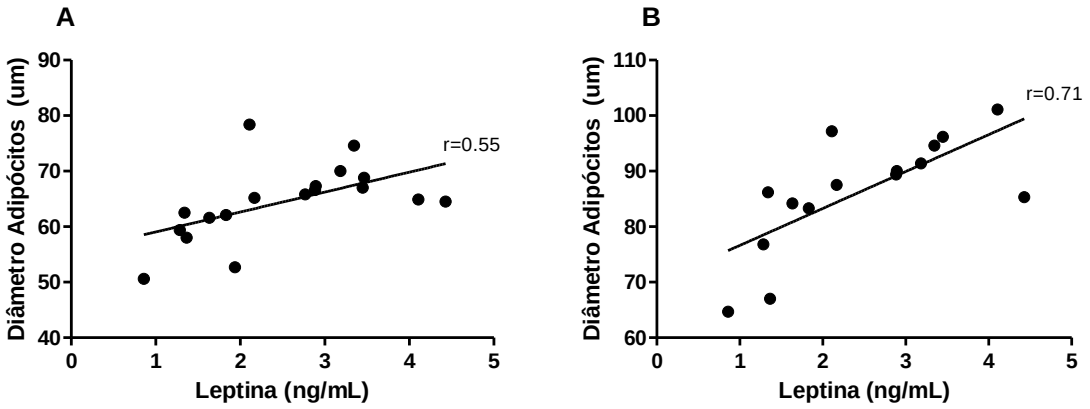
Em relação a concentração das adipocinas - leptina e adiponectina, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (figuras 25 e 28 e tabelas B.17 e 18). Entretanto, os animais que treinaram e foram tratados com melatonina, apresentaram valores de leptina que tenderam a ser mais reduzidos. Utilizando um teste de correlação, observamos que há uma correlação positiva entre diâmetro dos adipócitos ou peso do coxim total com a concentração de leptina (figuras 26 e 27).

Figura 25 - Leptina



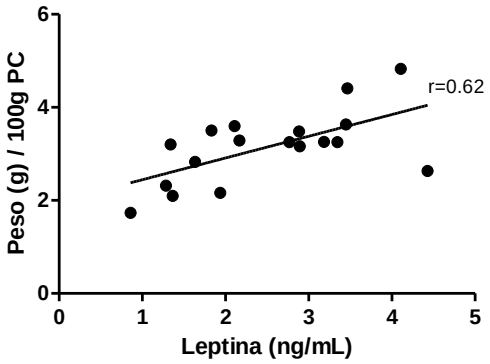
Valores expressos em [ng/mL] representam a média ± EPM (n=4-5). Não foram constatadas diferenças significativas.

Figura 26 - A - Correlação entre Leptinemia e Diâmetro Adipócitos do Tecido SUB.
B - Correlação entre Leptinemia e Diâmetro Adipócitos do Tecido RP



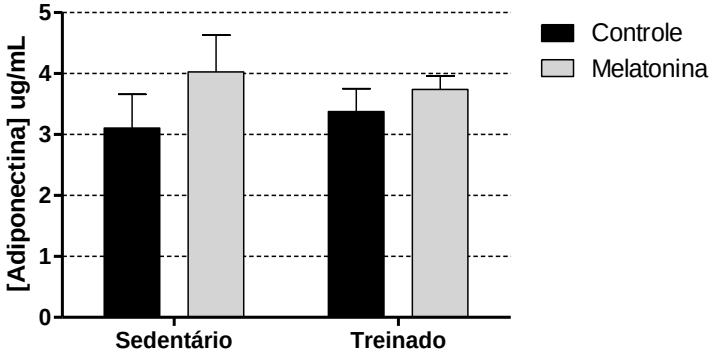
As marcações nos gráficos (círculos preenchidos) representam os valores absolutos obtidos de cada animal. Em A e B eixo y = diâmetro adipócitos (µm) e no eixo x = concentração leptina plasmática (ng/mL) n=18 (p<0,05).

Figura 27 - Correlação entre Leptinemia e Peso do Coxim Adiposo Total



As marcações no gráfico (círculos preenchidos) representam os valores absolutos obtidos de cada animal. No eixo y = peso coxim adiposo total (g)/100g de peso corporal e no eixo x = concentração leptina plasmática (ng/mL) n=18 ($p<0,05$).

Figura 28 - Adiponectina

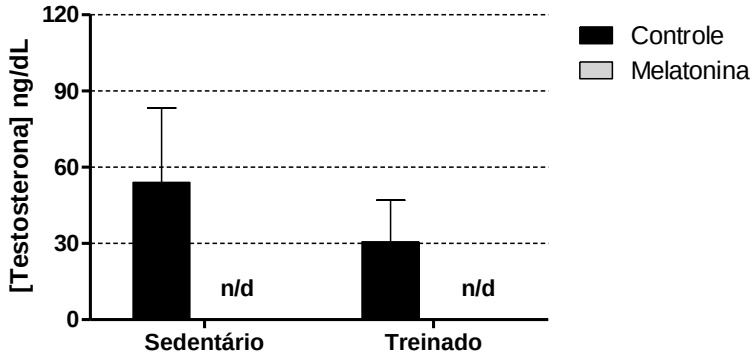


Valores expressos em [ug/mL] representam a média ± EPM (n=4-5). Não foram constatadas diferenças significativas.

6.7.5 Testosteronemia

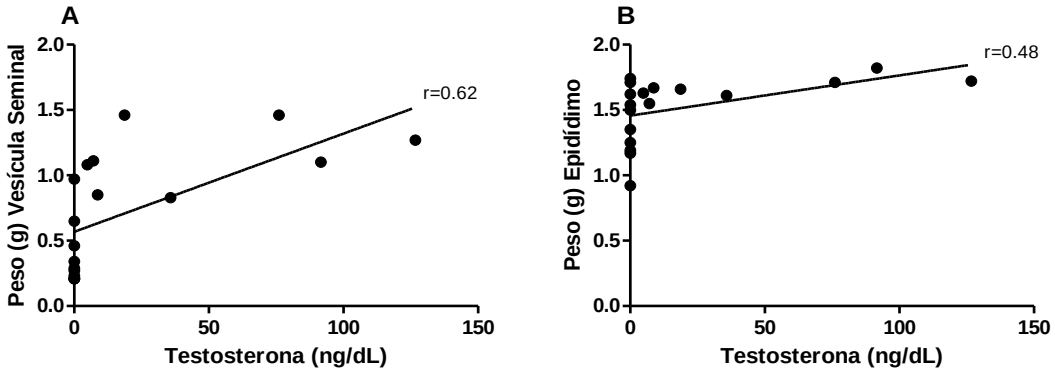
A dosagem de testosterona plasmática corrobora com a hipotrofia encontrada nas estruturas reprodutoras dos animais mostradas anteriormente nas figuras 13 e 14. Isso evidencia o efeito da suplementação com melatonina no eixo reprodutor, mesmo que em baixa concentração (figura 29 e tabela B.19). Para confirmar tal relação, realizamos testes de correlação entre concentração de testosterona e peso da vesícula seminal ou peso do epidídimo, que apontaram uma correlação positiva (figura 30). Além disso, realizamos também testes de correlação entre a concentração de testosterona e o peso do músculo EDL, e entre o peso do músculo EDL e o peso da vesícula seminal, ambos apresentaram correlação positiva (figura 31).

Figura 29 - Testosterona



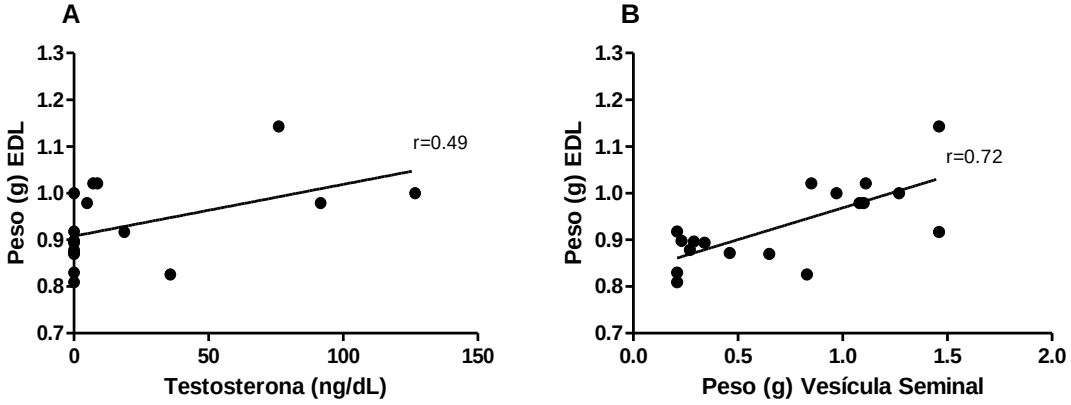
Valores expressos em [ng/dL] representam a média ± EPM (n=4-5). Os grupos SM e TM apresentaram valores não detectáveis (N/d).

Figura 30 - A - Correlação entre Testosterona e Vesícula Seminal.
B - Correlação entre Testosterona e Epidídimo



As marcações nos gráficos (círculos preenchidos) representam os valores absolutos obtidos de cada animal. Em A eixo y = peso vesícula seminal (g) e no eixo x = concentração testosterona plasmática (ng/dL). Em B eixo y = peso epidídimo (g) e no eixo x = concentração testosterona plasmática (ng/dL) n=18 ($p<0,05$).

Figura 31 - A - Correlação entre peso do músculo EDL e testosterona
B - Correlação entre peso do músculo EDL e peso da vesícula seminal



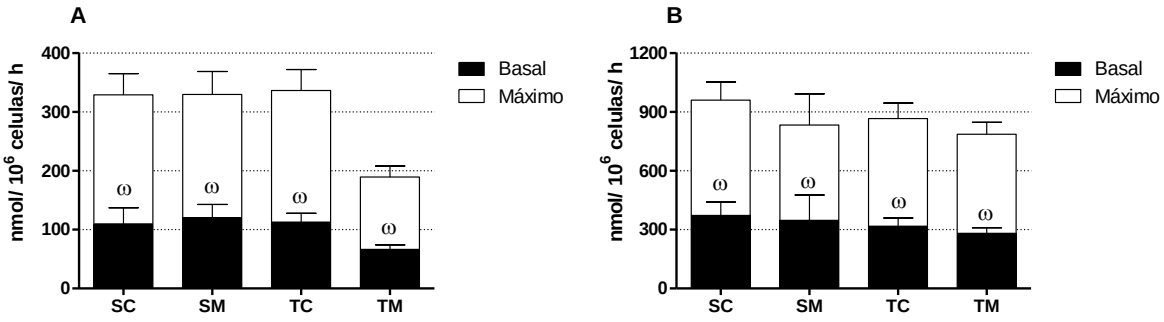
As marcações nos gráficos (círculos preenchidos) representam os valores absolutos obtidos de cada animal. Em A eixo y = peso EDL (g) e no eixo x = concentração testosterona plasmática (ng/dL). Em B eixo y = peso EDL (g) e no eixo x = peso da vesícula seminal (g) n=18 ($p<0,05$).

6.8 Ensaios com Adipócitos Isolados

6.8.1 Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em lipídeos de adipócitos isolados

No teste de incorporação de glicose em lipídeos (figura 32 e tabelas B.20 e 21), apenas diferenças entre as respostas basal e estimulada por insulina (10 µM), foram detectados, mas não houve alterações nestas respostas entre os grupos. Observamos respostas basal e insulino-estimulada aparentemente diminuídas no grupo TM no tecido SUB, mas sem apresentar diferença significante.

Figura 32 - A - Incorporação de D-[U-14C]-Glicose em Lipídeos em Adipócitos Isolados SUB. **B -** Incorporação de D-[U-14C]-Glicose em Lipídeos em Adipócitos Isolados RP

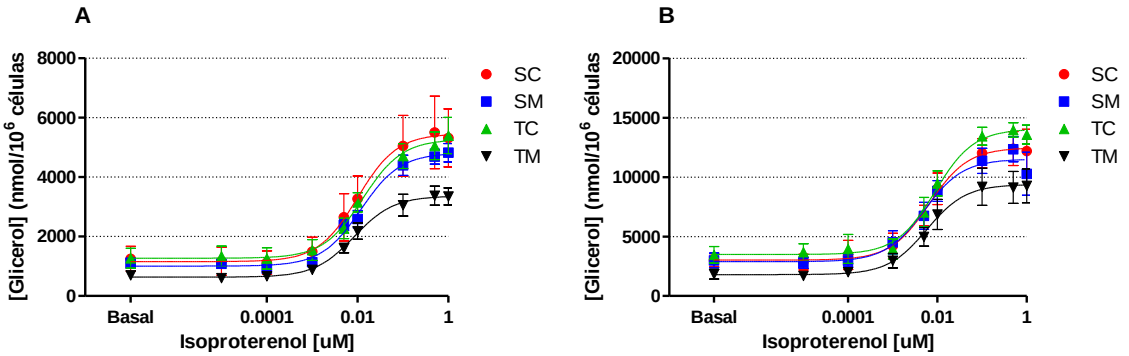


Cada valor corresponde à média ± EPM do grupo na situação basal e na estimulada por insulina. Valores expressos em (nmol.10^{-6} células.h^{-1}) (n=4-5). (ω) vs. máximo (insulina) ($p<0,05$).

6.8.2 Avaliação da Sensibilidade Lipolítica Frente a Estímulo com Isoproterenol

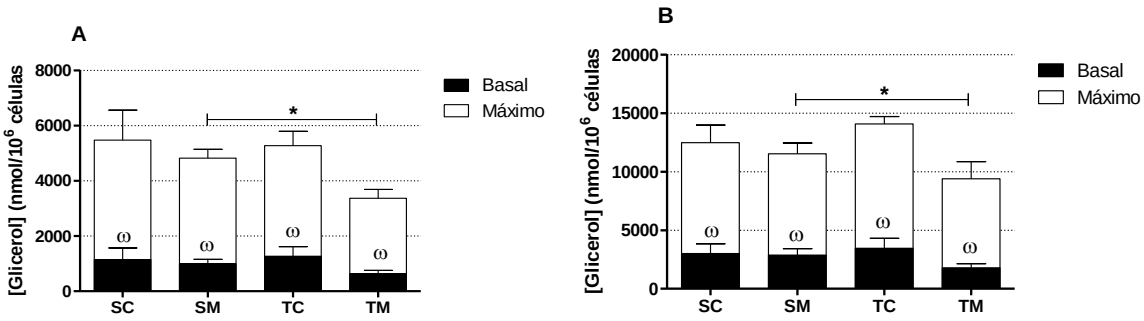
Para avaliação da atividade lipolítica, foi realizada uma curva dose-resposta ao isoproterenol. Primeiramente utilizamos como normalizador dos cálculos o número de células, ou seja, a liberação de glicerol em um milhão de células (figura 33). Para observar a sensibilidade de resposta de cada grupo, foi calculada então a concentração de isoproterenol que induz metade do efeito máximo, também chamado de EC50 (figura 35 e tabela B.24). Além da sensibilidade foi determinada a capacidade lipolítica basal e a maximamente estimulada por isoproterenol. A diferença entre estes dois valores determina a responsividade das células incubadas (figura 34 e tabelas B.22 e 23). Não se observou aumento ou diminuição da sensibilidade frente ao treinamento e/ou tratamento com melatonina. Entretanto, em ambos os tecidos, a resposta máxima ao isoproterenol nas células de animais tratados com melatonina se apresentava diminuída. Por meio do teste de correlação, observamos que a área do adipócito apresentava correlação positiva com a resposta máxima obtida no teste de lipólise (figura 36).

Figura 33 - A - Curva Lipolítica Dose-Reposta por células em adipócitos isolados do tecido SUB. **B -** Curva Lipolítica Dose-Reposta por células em adipócitos isolados do tecido RP



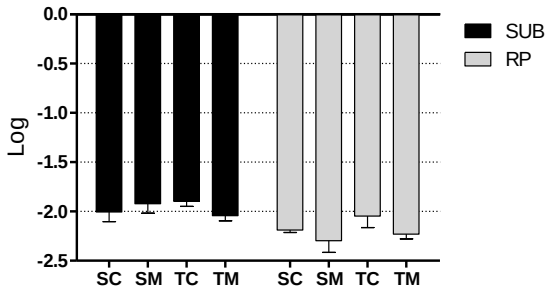
Cada valor corresponde à média da concentração de glicerol liberadas no estado basal e em cada ponto de estímulo com isoproterenol. Valores expressos em (nmol/10^6 células).

Figura 34 - A - Atividade Lipolítica por células em adipócitos isolados do tecido SUB
B - Atividade Lipolítica por células em adipócitos isolados do tecido RP



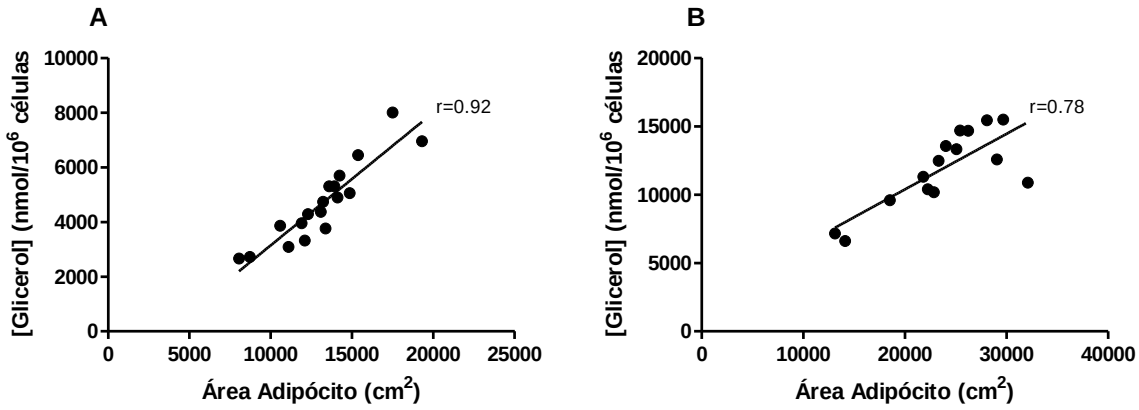
Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal e na estimulada por isoproterenol (n=4-5). Valores expressos em (nmol/10^{-6} células). (*) vs. C (ω) vs. máximo ($p<0,05$).

Figura 35 - Sensibilidade Lipolítica por Células (Log EC50) no Tecido Adiposo SUB e RP



Cada valor corresponde à média ± EPM da EC50 de cada grupo de ambos os tecidos SUB e RP(n=4-5). Valores expressos em Log. Não foram constatadas diferenças significativas.

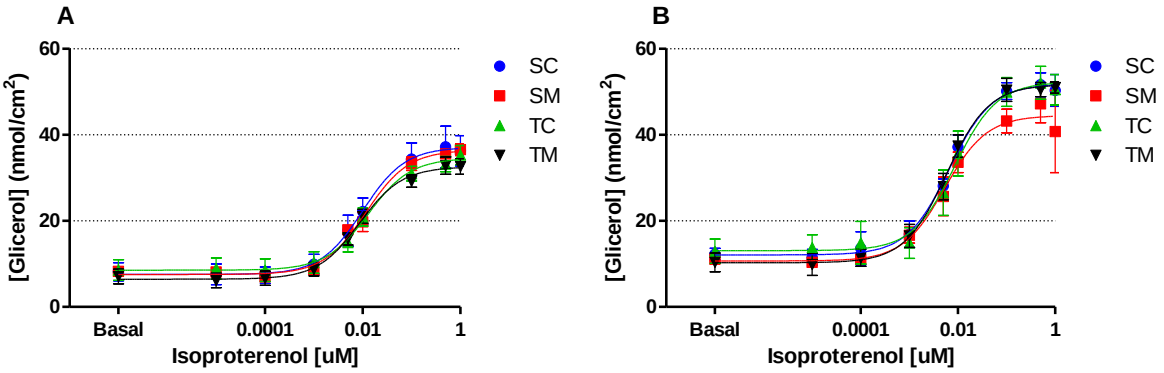
Figura 36 - A - Correlação entre área do adipócito e lipólise máxima do tecido SUB **B -** Correlação entre área do adipócito e lipólise máxima no tecido RP



As marcações nos gráficos (círculos preenchidos) representam os valores absolutos obtidos de cada animal. Em A e B eixo y = [glicerol] nmol/10^6 células e no eixo x = área do adipócito (cm^2) n=18 p<0,05.

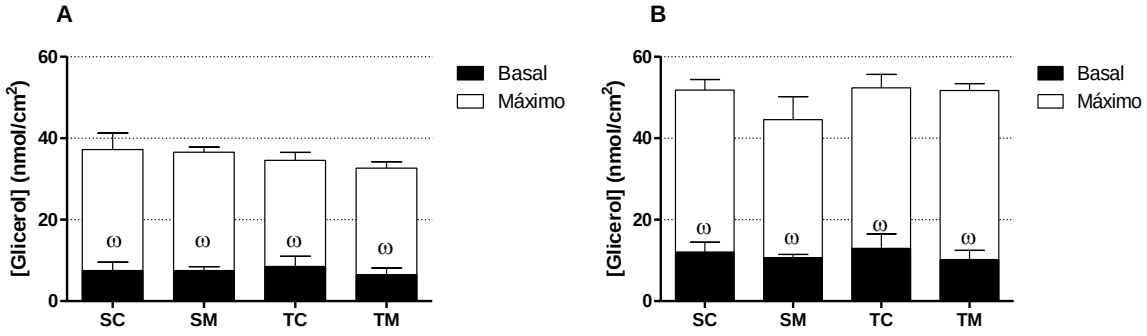
Após termos observado correlação positiva entre área do adipócito e a resposta máxima obtida no teste de lipólise, substituímos a normalização de número de células para área de membrana. Todas as análises foram refeitas, e os resultados obtidos por cm^2 não apresentaram diferenças na responsividade (figura 38 e tabelas B.25 e 26) ou sensibilidade(figura 37 e 39 e tabela B.27).

Figura 37 - A - Curva Lipolítica Dose-Reposta por área em adipócitos isolados do tecido SUB. **B -** Curva Lipolítica Dose-Reposta por área em adipócitos isolados do tecido RP



Cada valor corresponde à média da concentração de glicerol liberadas no estado basal e em cada ponto de estímulo com isoproterenol. Valores expressos em (nmol/cm^2).

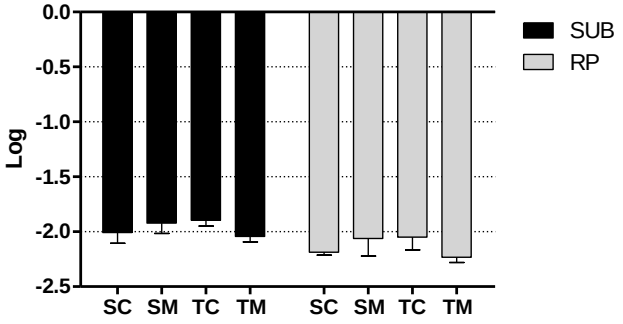
Figura 38 - A - Atividade Lipolítica por área em adipócitos isolados do tecido SUB **B -** Atividade Lipolítica por área em adipócitos isolados do tecido RP



.

Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal e na estimulada por isoproterenol (n=4-5). Valores expressos em (nmol.cm^2). (ω) vs. máximo (p<0,05).

Figura 39 - Sensibilidade Lipolítica por área (Log EC50) no Tecido Adiposo SUB e RP



Cada valor corresponde à média ± EPM da EC50 de cada grupo de ambos os tecidos SUB e RP(n=4-5). Valores expressos em Log. Não foram constatadas diferenças significativas.

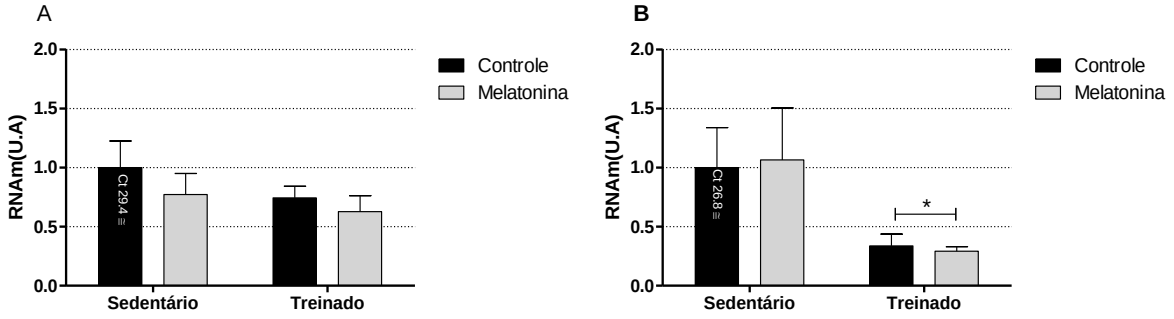
6.9 Expressão Gênica

A expressão do RNAm de proteínas importantes para a atividade lipolítica foi avaliada nos tecido adiposo SUB e RP.

6.9.1 Receptores Adrenérgicos

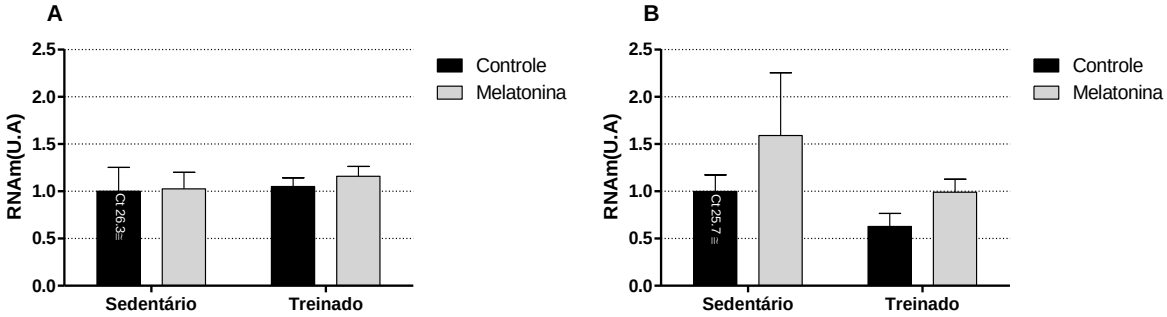
Em relação a expressão gênica dos receptores adrenérgicos beta 1,2,3 e alfa-2a nos tecidos SUB e RP, o treinamento físico promoveu alterações na expressão gênica dos receptores adrenérgicos beta-1 e alfa-2a. A expressão do receptor adrenérgico beta-1 se mostrou diminuída no coxim RP dos animais submetidos ao treinamento físico (figura 40 e tabela B.28). Já a expressão do receptor alfa-2a, se mostrou aumentada no tecido SUB. (figura 43 e tabela B.31).

Figura 40 - A - Expressão Gênica do Receptor Adrenérgico β-1 no tecido SUB
B - Expressão Gênica do Receptor Adrenérgico β-1 no tecido RP



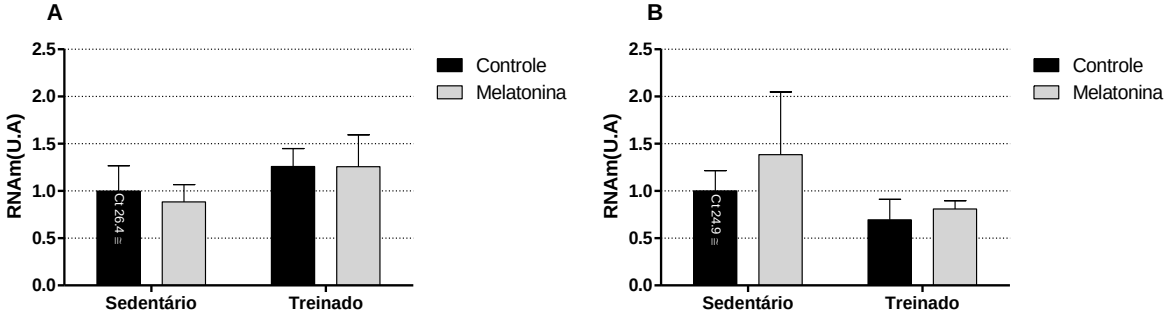
As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação do β-1 e do gene constitutivo Beta-2m, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos (n=5) (*) vs. S ($p<0,05$).

Figura 41 - A - Expressão Gênica do Receptor Adrenérgico β-2 no tecido SUB
B - Expressão Gênica do Receptor Adrenérgico β-2 no tecido RP



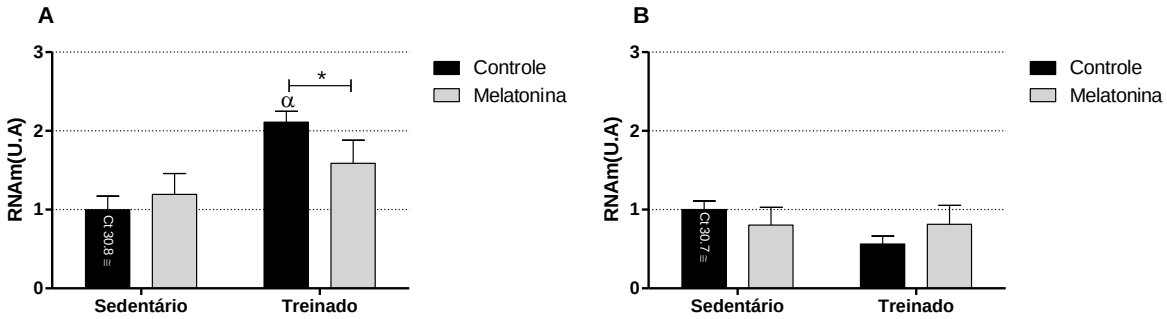
As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação do β-2 e do gene constitutivo Beta-2m, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos (n=5). Não foram constatadas diferenças significativas.

Figura 42 - A - Expressão Gênica do Receptor Adrenérgico β-3 no tecido SUB
B - Expressão Gênica do Receptor Adrenérgico β-3 no tecido RP



As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação do β-3 e do gene constitutivo Beta-2m, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos (n=5). Não foram constatadas diferenças significativas.

Figura 43 - A - Expressão Gênica do Receptor Adrenérgico Alfa-2a no tecido SUB
B - Expressão Gênica do Receptor Adrenérgico Alfa-2a no tecido RP

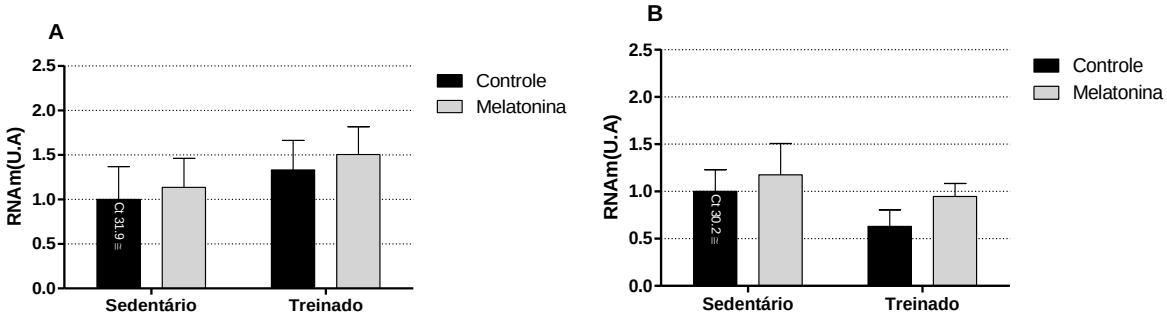


As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação do Alfa-2a e do gene constitutivo Beta-2m, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos (n=5). (*) vs. S (α) vs. SC ($p<0,05$).

6.9.2 Lipase Sensível a Hormônio e Perilipina-1

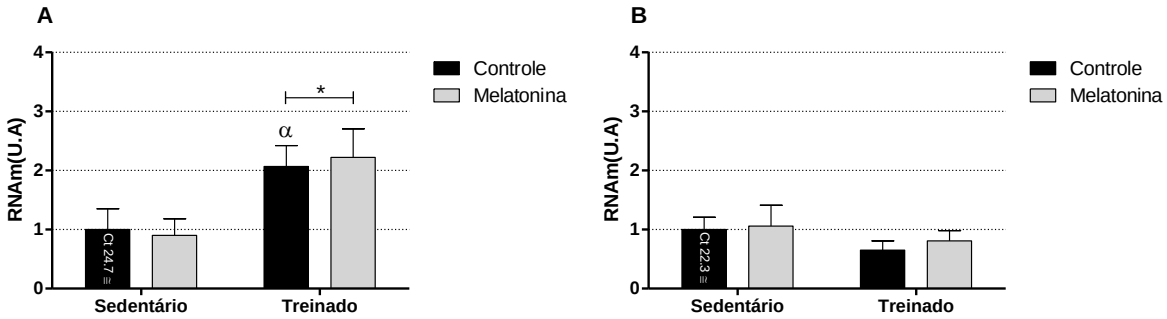
A expressão do RNAm da HSL, lipase responsável principalmente por hidrolisar diacilglicerol, não sofreu modificações frente ao treinamento físico e/ou tratamento com melatonina em ambos tecidos avaliados (figura 44 e tabela B.32). Já a expressão do RNAm da perilipina-1, proteína que recobre a gota lipídica e uma das responsáveis por regular e coordenar os estoques lipídicos, se mostrou aumentada no tecido SUB em animais submetidos ao treinamento físico (figura 45 e tabela B.33).

Figura 44 - A - Expressão Gênica da Enzima Lipolítica HSL no tecido SUB
B - Expressão Gênica da Enzima Lipolítica HSL no tecido RP



As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação da HSL e do gene constitutivo Beta-2m, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos (n=5). Não foram constatadas diferenças significativas.

Figura 45 - A - Expressão Gênica da Proteína Perilipina-1 no tecido SUB
B - Expressão Gênica da Proteína Perilipina-1 no tecido RP

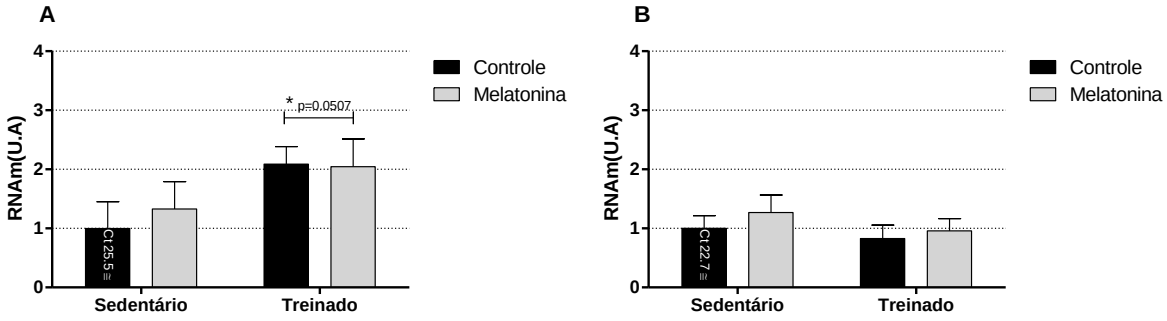


As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação da Perilipina-1 e do gene constitutivo Beta-2m, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos (n=5). (*) vs. S (α) vs. SC ($p<0,05$).

6.9.3 Transporte de Ácidos Graxos e Glicerol

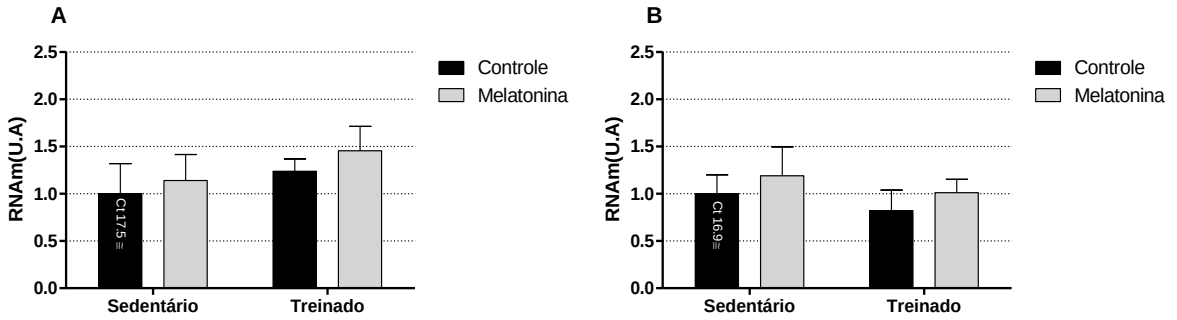
A expressão do RNAm da aquaporina-7, uma proteína que funciona como canal permeável a água e glicerol, se mostrou aumentada no tecido SUB em animais submetidos ao treinamento físico (figura 46 e tabela B.34). Já a expressão do RNAm da FABP-4, proteína de ligação de ácido graxo e responsável pelo seu transporte para a membrana plasmática, não sofreu modificações frente ao treinamento físico e/ou tratamento com melatonina em ambos tecidos avaliados (figura 47 e tabela B.35).

Figura 46 - A - Expressão Gênica da Proteína Aquaporina-7 no tecido SUB
B - Expressão Gênica da Proteína Aquaporina-7 no tecido RP



As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação da Aquaporina-7 e do gene constitutivo Beta-2m, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos (n=5). (*) vs. S (p=0,0507).

Figura 47 - A - Expressão Gênica da Proteína FABP-4 no tecido SUB
B - Expressão Gênica da Proteína FABP-4 no tecido RP



As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação da FABP-4 e do gene constitutivo Beta-2m, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos (n=5). Não foram constatadas diferenças significativas. Não foram constatadas diferenças significativas.

7 DISCUSSÃO

O protocolo de treinamento se mostrou eficiente em estabelecer a diferença de condicionamento entre os grupos treinados (TC e TM) e os grupos sedentários (SC e SM), isso foi demonstrado utilizando o teste de esforço máximo, o qual refletiu uma melhora no desempenho dos animais treinados, sugerindo assim uma adaptação metabólica frente ao exercício. Esse resultado corrobora outros estudos que utilizaram protocolos de treinamento e teste de esforço máximo similares[114,115,122,123]. Entretanto observamos um fato curioso: animais de 5 semanas quando submetidos ao mesmo protocolo de treinamento físico, permaneciam em média um maior tempo na esteira durante os testes de esforço máximo (teste 1 = 12,5 min teste 2 = 17,0 min teste 3 = 18,0 min)[122], quando comparados aos animais com 11 semanas de idade utilizados nesse estudo (teste 1 = 7,0 min teste 2 = 13,0 min teste 3 = 13,3 min). Esses dados sugerem que a idade dos animais possa interferir no desempenho dos mesmos frente ao treinamento físico.

Não foram observadas alterações na ingestão alimentar dos animais submetidos ao treinamento físico ou tratamento com melatonina. Entretanto observamos diferença no consumo hídrico de animais tratados com melatonina. Tal diferença foi decorrente ao modelo de garrafa utilizado, o qual possibilitava uma maior extravazamento de água, em última análise acreditamos que isso não comprometeu o estudo.

Os animais que apenas foram tratados com melatonina, apesar de apresentarem um peso corporal menor do que o grupo controle, possuíam quantidades de coxins adiposos iguais, assim como o diâmetro dos adipócitos de ambos tecidos estudados, independente do consumo alimentar. Em seu trabalho, Wolden-Hanson (2000), mostrou que animais de "meia-idade" tratados com melatonina apresentaram uma redução da massa magra quando comparados aos controles[106]. No estudo de Zanuto et al (2013), ratos *Wistar* de "meia-idade" (12 meses) tratados com melatonina (0,5 mg/Kg/dia) por 8 semanas apresentavam quantidades de coxim adiposo da região periepididimal semelhantes aos animais do grupo controle, sendo que os animais tratados por 12 semanas apresentaram reduções significativas do peso corporal assim como do coxim adiposo[124]. Em outro trabalho recente, e também utilizando ratos *Wistar de meia-idade*, a suplementação

com 1,0 mg/Kg/dia durante 8 semanas, promoveu redução do peso corporal assim como do coxim adiposo da região periepididimal[123]. Foi mostrado também, em outro estudo, que a suplementação com melatonina por 10 semanas em animais também de 12 meses de idade promovia reduções da adiposidade não observadas em animais de 5 meses de idade[104]. A luz do exposto acima, a idade dos animais, o tempo de tratamento, assim como a dose utilizada, parecem interferir nas repercussões zoométricas promovidas por tais intervenções.

Os animais que apenas foram treinados, também apresentavam peso corporal menor que o grupo controle e quantidades semelhantes de adiposidade. Temos observado que assim como o relatado sobre o tratamento com melatonina, a idade pode influenciar as repercussões promovidas pelo treinamento físico. Animais de 7 e de 5 semanas de idade quando exercitados em esteira por 8 semanas, 5x/semana, apresentaram uma redução significativa dos coxins adiposos e do diâmetro dos adipócitos[102,122]. Em nosso estudo, apesar de usarmos o mesmo protocolo de treinamento físico, não observamos as mesmas reduções encontradas nos trabalhos citados anteriormente. Porém, Mendes et al. (2013), utilizando protocolo de treinamento similar, mostraram que animais de 12 meses de idade exercitados por 8 semanas, apresentaram reduções do peso corporal, assim como do coxim adiposo periepididimal[123]. No entanto, em nosso estudo, o grupo que realizou o tratamento com melatonina e treinamento físico apresentou além do peso corporal, quantidade de coxins menores e diâmetro celular reduzido das regiões estudadas, evidenciando assim um efeito conjunto de ambas as intervenções. Foi observado também, através de uma estimativa do número de adipócitos, que os animais tratados apresentavam quantidades maiores de adipócitos no tecido adiposo subcutâneo. A massa adiposa é determinada tanto pelo número como pelo volume de células[125]. O número de células reflete o balanço entre aquisição e perda de células, ou seja, o aumento ocorre via replicação e diferenciação de pré-adipócitos e a redução via apoptose de preadipócitos e adipócitos[126]. Já o volume representa o balanço entre lipólise e a lipogênese[127]. O diâmetro dos adipócitos dos animais treinados e tratados com melatonina era menor, assim como a massa média. Mesmo tendo o sugestivo aumento em relação ao número de adipócitos no tecido SUB, constatamos que a redução da massa adiposa desses animais ocorreu devido a uma hipotrofia dos adipócitos, que consequentemente culminou em uma redução da massa de tecido

adiposo. Atribuímos esse resultado à ação combinada do treinamento físico e suplementação com melatonina.

Em relação à diminuição das estruturas reprodutoras, nosso grupo, em publicação recente, evidenciou um significante hipogonadismo provocado por um efeito colateral do tratamento de ratos diabéticos com melatonina[109]. Reduções na massa testicular e na concentração plasmática de testosterona também foram observadas em hamsters siberianos tratados com melatonina através de injeções sistêmicas aplicadas diariamente, as quais buscavam mimetizar dias tipicamente de inverno (dias curtos e noites longas)[110].

Outros estudos sugerem que aumento na concentração de melatonina pode inibir secreção de esteroides em humanos, ratos e hamsters[128,129,130,131]. Em nosso trabalho, em que obtivemos redução da concentração plasmática de testosterona, e correlação positiva entre testosteronemia e vesícula seminal e testosteronemia e epidídimo, a explicação seria também um efeito antigonadotrófico da melatonina. Em estudo realizado por grupo japonês, foi demonstrado de maneira elegante em aves, que a melatonina pode estar relacionada não apenas com a estimulação da expressão, mas também com a liberação do hormônio inibitório de gonadotrofinas (GnIH)[112]. Eles utilizaram codornas machos (*Japanese quail*) e, através de manipulação endógena de melatonina (dias curtos/noites longas) e ensaios *in vitro*, demonstraram que a concentração de melatonina está diretamente relacionada a expressão e liberação de GnIH, promovendo redução na concentração plasmática do hormônio luteinizante (LH) e consequentemente no peso testicular, sugerindo assim um efeito antigonadotrófico da melatonina[112]. Em nossos resultados, dois fatos nos chamaram a atenção. O primeiro é que os animais eram adultos, ou seja, o tratamento com melatonina ocorreu em animais pós-puberes, o que poderia ser um fator determinante para a redução das estruturas. O segundo é que a dose de melatonina administrada diariamente era 5 vezes menor que a geralmente utilizada por alguns estudos, incluindo o nosso citado anteriormente. Um fato curioso, é que, embora alguns estudos descritos aqui mostrem efeitos da melatonina no eixo hipofise-hipotálamo-gônadas, outros utilizando o mesmo tratamento, nada relataram sobre alterações envolvendo esse eixo. De qualquer maneira, em nosso modelo, sinais claros de hipogonadismo foram evidenciados, sugerindo assim um efeito antigonadotrófico da suplementação com melatonina na dose de 0,2 mg/Kg/dia.

Reduções da testosteronemia, como descrito anteriormente, estão relacionadas ao hipogonadismo, assim como reduções na massa corporal magra e aumento do percentual de gordura[132]. Em nosso trabalho, observamos que os animais tratados com melatonina, além do hipogonadismo e de valores plasmáticos de testosterona não detectáveis, apresentaram peso menor do músculo EDL quando comparado ao dos animais controles. Realizamos também testes de correlação entre EDL e testosteronemia e entre EDL e vesícula seminal, em ambos obtivemos resultado positivo. Importante lembrar, que a vesícula seminal, nos serve como "histórico" da testosteronemia, nos fornecendo informações sobre seu comportamento em um período de tempo anterior e crônico. Tanto em humanos como em ratos, a deficiência de testosterona está associada com a redução de IGF-1 circulante e a expressão de IGF-1 intramuscular[133,134,135]. A via de sinalização IGF/Akt/mTORC1 é uma via reguladora importante da síntese e degradação proteica do músculo esquelético[136]. Embora fosse necessário empregar técnicas mais precisas para determinar alterações na composição corporal, nossos dados indicam que há possivelmente uma repercussão secundária do tratamento com melatonina sobre o músculo EDL.

Em relação ao perfil plasmático de glicose, insulina e leptina, estudo realizado em ratos (Sprague Dawley), o tratamento com melatonina em animais de "meia idade" foi responsável por promover reduções na glicemia, insulinemia e leptinemia[106]. Foi também demonstrado por outro estudo que administração aguda intracerebroventricular de melatonina diminui os níveis de insulina no plasma e melhora a sensibilidade à insulina em ratos[137]. No presente trabalho, nós também encontramos reduções nesses parâmetros em animais tratados com melatonina. Observamos que os animais tratados com melatonina apresentaram uma glicemia e uma insulinemia reduzida, sendo que, em relação à insulina, não foi encontrada diferença estatística. No entanto, por meio do índice Homa-IR, observamos que os animais tratados com melatonina apresentaram melhora na sensibilidade à insulina. Este resultado vai ao encontro de estudos *in vitro*, que mostraram que a melatonina melhora a captação de glicose em adipócitos e em miócitos[138,139], e que possivelmente podem estar relacionados ao fato de a melatonina estimular o transporte de glicose via IRS-1/PI-3 quinase, contribuindo assim para a homeostase glicêmica[140]. No estudo de Mendes et al. (2013), foi demonstrado que o treinamento

somado ao tratamento com melatonina promoveu aumento na expressão hepática de proteínas envolvidas na via de sinalização intracelular da insulina, assim como de GLUT-4 no músculo, sendo que, independente do condicionamento, a melatonina promoveu uma melhor resposta ao teste de tolerância a glicose[123].

Ambas as concentrações de leptina e insulina tendem a ser positivamente correlacionadas com a adiposidade, embora possam ser reguladas diferencialmente por dieta, exercício físico, tratamento e idade[141,142,143]. A leptina além de possuir um papel importante na regulação do balanço energético, ela exerce efeitos na reprodução, imunidade, osteogênese, angiogênese e controle da pressão sanguínea[144]. No balanço energético, ela atua como um lipostato (mensurador de depósitos lipídicos no organismo), estimulando e inibindo vias que culminam em redução da ingestão alimentar, assim como no aumento do gasto energético total[7]. A massa de tecido adiposo assim como a celularidade possui relação positiva com a leptinemia[145]. Em nosso estudo, a concentração de leptina tendeu a ser reduzida no grupo que foi submetido ao treinamento físico e ao tratamento com melatonina. Apesar de não ter sido observada diferença estatística, tal dado corrobora com a redução da adiposidade e do diâmetro dos adipócitos encontrada nesse conjunto de animais. Foi observada correlação positiva entre leptina e adiposidade, e leptina e diâmetro dos adipócitos, o que nos permite considerar que a leptinemia estava reduzida nesses animais que foram treinados e tratados com melatonina.

Os animais submetidos ao treinamento físico apresentaram reduções nos triacilgliceróis plasmáticos, fenômeno evidenciado em outros estudos e atribuído ao treinamento físico[146,147,148]. Concordantemente, outros trabalhos evidenciaram que o tratamento com melatonina por 8 e 12 semanas em animais de 6 e 10 meses de idade respectivamente, foram eficientes em promover redução plasmática de traicilgliceróis[149,123]. Não foram observadas alterações importantes em relação a concentração de colesterol.

Não foi observada diferença significativa na taxa de incorporação de glicose em lipídeos entre os grupos, corroborando resultados anteriores de nosso grupo, nos quais animais pinealectomizados e controles, treinados ou não, apresentavam valores de incorporação de glicose em lipídeos semelhantes[105]. Entretanto, em um estudo realizado em camundongos, o tratamento com melatonina favoreceu a

deposição de gordura, por meio de um aumento no transporte intracelular de glicose[150]. O mesmo estudo mostrou também um aumento significativo na expressão de GLUT-4 e de receptores de insulina no músculo esquelético nos animais tratados comparados ao controle[150]. Em nosso trabalho a suplementação de melatonina em animais que tiveram preservada a produção endógena de melatonina, não provocou mudanças no padrão de incorporação de glicose em lipídeos.

No metabolismo lipídico, o sistema adrenérgico desempenha um papel importante na regulação da lipólise no tecido adiposo branco. As catecolaminas são capazes de estimular a lipólise através da ativação de receptores adrenérgicos-beta (beta-1,2,3) presentes nos adipócitos. Eles também podem aumentar o armazenamento de lipídios através do receptor adrenérgico-alfa (alfa-2a), impedindo a mobilização de lipídios através da inibição da produção de AMP-c[151]. A coexistência de receptores adrenérgicos que exercem funções antagônicas permite que as catecolaminas desempenhem um papel significativo na regulação do balanço energético[152]. Diversos estudos já evidenciaram a importância do equilíbrio entre receptores lipolíticos e anti-lipolíticos no controle da lipólise[151,153,154,155].

Em relação à atividade lipolítica, observamos que tanto o tratamento com melatonina como o treinamento físico não interferiram na sensibilidade lipolítica das células isoladas de ambos tecidos. Entretanto o tratamento com melatonina provocou uma redução da responsividade dos adipócitos ao isoproterenol, uma vez que a resposta máxima estava diminuída, tanto no tecido adiposo visceral (RP) quanto no tecido subcutâneo (SUB). Foi demonstrado que adipócitos isolados da região subcutânea inguinal de ratos controles, incubados com melatonina, apresentam uma inibição na resposta ao isoproterenol, sugerindo que tal fato se deva à ativação mediante proteína G_I, a qual estaria acoplada a receptores de melatonina (MT1 e MT2)[156]. No entanto, a diferença do tamanho dos adipócitos entre os grupos estudados, pode ter sido determinante para o resultado encontrado.

Em estudo realizado em 48 sujeitos (homens e mulheres) foi mostrado uma correlação positiva entre o volume do adipócito e a taxa lipolítica. Das 48 pessoas que faziam parte do estudo, 34 eram obesos e 14 eram eutróficos[157]. Um adipócito de um sujeito obeso é maior do que um adipócito de um sujeito magro. Foi constatado que o tamanho da célula influencia marcadamente a magnitude da taxa

de lipólise, quando calculado por célula. Como consequência, é difícil de resolver se as diferenças nas taxas de lipólise/células entre adipócitos grandes e pequenos refletem apenas diferenças no tamanho das células ou se os fatores independentes de tamanho também estão presentes. No estudo citado, assim como em outros, os autores passaram a normalizar por grama de lipídeos[157,158].

Em nosso estudo, também mostramos a existência de correlação positiva entre a lipólise normalizada por número de células e a área de superfície celular dos adipócitos. Para contornar tal influência, optamos por expressar liberação de glicerol por área de membrana celular (cm^2). Com isso, observamos que não houve qualquer diferença entre os grupos e em ambos os coxins adiposos estudados. A sensibilidade, assim como a responsividade foram similares entre os grupos. Isso nos revela que a capacidade lipolítica das células não sofreu alterações frente ao treinamento físico e/ou tratamento com melatonina. É importante destacar que o ensaio biológico de curva dose-resposta da lipólise *in vitro,* nos fornece um ótimo espectro de mobilização lipídica desses adipócitos, permitindo verificar capacidades basal e máxima assim como a sensibilidade do sistema. No entanto, não nos permite inferir sobre grau de atividade lipolítica que cada animal possui ao longo do dia, sendo isso uma limitação desse estudo. Nossos resultados não corroboram outros trabalhos que evidenciaram diminuição da massa adiposa assim como aumento da taxa lipolítica em animais controle treinados[105,159,160,161,162]. É importante destacar que, nos estudos citados, foram utilizados diferentes protocolos de treinamento assim como diferentes técnicas para avaliar as respostas lipolíticas. Além disso, os animais usados eram mais jovens e, em alguns casos, fêmeas. Infelizmente, devido à utilização de procedimentos diferentes em cada estudo, divergências de resultados podem ocorrer, mesmo que as coletas de resultados tenham sido adequadamente realizadas.

Além do ensaio biológico, nós realizamos a análise da expressão de RNAm de receptores, enzimas e transportadores importantes para atividade lipolítica no tecido adiposo branco. Embora não se tenham observado diferenças na atividade lipolítica frente ao treinamento e/ou tratamento com melatonina, nos verificamos que houve aumento da expressão gênica de AQP-7, perilipina-1 e receptor α-2a adrenérgico no tecido subcutâneo, assim como redução do receptor β-1 adrenérgico no tecido retroperitoneal, em animais submetidos ao treinamento físico. Em trabalho recente

foi demonstrado que camundongos-KO para perilipina-1 apresentaram aumento na taxa de oxidação lipídica durante o exercício[163]. Outros trabalhos mostraram que o bloqueio dos receptores adrenérgico-α2 com um inibidor (fentolamina) aumenta a resposta lipolítica durante o exercício[164] e que animais deficientes em AQP_7 apresentaram uma liberação de glicerol prejudicada[50]. Sendo assim, o aumento na expressão gênica da AQP_7 (proteína integral de membrana responsável pelo efluxo de glicerol do adipócito)[50], da perilipina-1 (proteína que regula e coordena os estoque lipídicos no estado basal e estimulado)[30] e do receptor adrenérgico α-2a (receptor acoplado a proteína Gi, com ação antilipolítica)[20] sugerem uma melhora no controle lipolítico inibitório frente a um aumento na mobilização lipídica provocada pelo exercício físico, o que também explicaria a diminuição na expressão gênica do receptor adrenérgico β-1 no tecido adiposo visceral. É importante ressaltar que, o aumento ou diminuição da expressão gênica de uma proteína alvo, não resulta necessariamente em um aumento ou diminuição da expressão proteica. Além disso, alterações no funcionamento celular, em muitos casos, podem ser controlados por mecanismos pós-traducionais, de ativação e inibição proteica, como por exemplo, as que envolvem fosforilação e desfosforilação.

Grupos espanhóis, em publicações recentes, demonstram repercussões decorrentes ao tratamento com melatonina, envolvendo aumento da atividade noturna dos animais, assim como um aumento de adipócitos do tecido adiposo marrom[113, 165]. Em relação ao aumento da atividade noturna, o estudo conduzido por Terrón et al (2013) mostrou que ratos *Wistar* tratados com aproximadamente 2 mg/Kg/dia de melatonina por 15 semanas, apresentaram um aumento na atividade motora noturna, o que foi relacionado a perda de peso corporal[165]. No outro estudo citado, os pesquisadores trataram tanto ratos *Zucker*, uma linhagem de ratos obesos, como ratos magros, com 10 mg/Kg/dia de melatonina por 6 semanas. Eles verificaram, em ambos os grupos, um aumento na expressão de marcadores de biogênese mitocondrial (UCP-1 e PGC-1a) na gordura subcutânea inguinal, assim como uma elevação na temperatura cutânea[113]. Foi observado também, o aparecimento, em meio ao tecido adiposo branco, de populações de adipócitos do tecido adiposo marrom[113]. Certamente, os resultados mostrados nestes estudos, lançam luz sobre efeitos do tratamento com melatonina, que ajudando-nos a entender melhor suas repercussões, principalmente relacionado à adiposidade.

Entretanto, ainda não é claro, se os efeitos no eixo hipófise-hipotálamo-gônadas são potencialmente problemáticos ao organismo.

8 CONCLUSÃO

Concluímos que, além das repercussões isoladas de cada intervenção, o uso concomitante do treinamento físico (50-60 % da capacidade máxima) e da suplementação com melatonina (0,2 mg/Kg/dia) durante 8 semanas em ratos *Wistar* de 11 semanas de idade, foi mais eficiente em promover reduções no diâmetro dos adipócitos e, consequentemente, na adiposidade do que o uso isolado do treinamento físico ou da suplementação com melatonina. Entretanto, não foram observadas alterações na atividade lipolítica, e nem na lipogênese, medidas em adipócitos isolados das regiões subcutânea inguinal e retroperitoneal.

Este trabalho reforça também que há uma necessidade em aprofundar os estudos sobre os impactos do uso de melatonina no eixo hipófise-hipotálamo-gônadas, uma vez que, mesmo em doses reduzidas, a suplementação promoveu hipogonadismo, com consequente redução da testosteronemia, além de uma redução da massa do músculo EDL.

REFERÊNCIAS*

1. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. Trends Endocrinol Metab. 2000;11:327-32.

2. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;280: 827-47.

3. Bouchard C. Obesidade e Atividade Física. São Paulo: Manole; 2003.

4. World health organization. Obesity – preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva: World Health Organization; 1998.

5. Monteiro CA. Epidemiologia da obesidade. In: Halpern A, et al. Obesidade. São Paulo: Lemos Editorial; 1998. p. 15–30.

6. Eloi R. Livre do “pesadelo” da obesidade mórbida. Mídia & Saúde; 2002. vol. 1, p. 16-17.

7. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. Arq Bras Endocrinol Metab. 2006;50.

8. Goodman JM. Demonstrated and inferred metabolism associated with cytosolic lipid droplets. J Lipid Res. 2009;50:2148–56.

9. Langin D, Lafontan M. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. In: Bray GA, Bouchard C, editors. Handbook of obesity. Etiology and pathophysiology. 2nd ed. New York: M Dekker; 2004. p. 515–32.

10. Sengenes C, Berlan M, de Glisezinski I, Lafontan M, Galitzky J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. FASEB J. 2000;14:1345–51.

11. Gravholt CH, Schmitz O, Simonsen L, Bülow J, Christiansen JS, Moller N. Effects of a physiological GH pulse on interstitial glycerol in abdominal and femoral adipose tissue. Am J Physiol. 1999;277:E848–54.

12. Heffernan MA, Jiang WJ, Thorburn AW, Ng FM. Effects of oral administration of a synthetic fragment of human growth hormone on lipid metabolism. Am J Physiol 2000; 279:E501–07.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [2011 July 15]. Available from: http://www.icmje.org

13. Gasic S, Tian B, Green A. Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. J Biol Chem. 1999;274:6770–5.

14. Ryden M, Dicker A, Van Harmelen V, et al. Mapping of early signalling events in TNF-α-mediated lipolysis in human fat cells. J Biol Chem. 2002; 277:1085–91.

15. Lafontan M. Fat cells: Afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2005;45:119–46.

16. Campbell JE, Peckett AJ, D'souza AM, Hawke TJ, Riddell MC. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. Am J Physiol Cell Physiol. 2011; 300:C198-209.

17. Xu C, He J, Jiang H, Zu L, Zhai W, Pu S, Xu G: Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. Mol Endocrinol. 2009;23:1161–70.

18. Kiwaki K, Levine JA. Differential effects of adrenocorticotropic hormone on human and mouse adipose tissue. J Comp Physiol B. 2003;173:675– 8.

19. Lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. J Lipid Res. 1993;34:1057–91.

20. Langin D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. Pharmacol Res. 2006;53:482–91.

21. Oka Y, Saraiva LR, Kwan YY, Korshing SI. The fifth class of G_ proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106:1484-9.

22. Lafontan M, Berlan M. Fat cell α2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. Endocrine Rev. 1995;16: 716-38.

23. de Glisezinski I, Larrouy D, Bajzova M, et al. Adrenaline but not noradrenaline is a determinant of exercise-induced lipid mobilization in human subcutaneous adipose tissue. J Physiol-London. 2009;587:3393–404.

24. Silva BV, Horta BAC, Alencastro RB, et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. Quim Nova. 2009;32:453-62.

25. Anthonsen MW, Rönnstrand L, Wernstedt C, Degerman E, Holm C. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. J Biol Chem.1998; 273:215–21.

26. Shen WJ, Liang Y, Hong R, Patel S, Natu V, Sridhar K, et al. Characterization of the functional interaction of adipocyte lipid-binding protein with hormone sensitive lipase. J Biol Chem. 2001;276:49443–8.

27. Lampidonis AD, Rogdakis E, Voutsinas GE, Stravopodis DJ. The resurgence of Hormone-Sensitive Lipase (HSL) in mammalian lipolysis. Gene. 2011;477:1–11.

28. Okazaki H, Osuga J, Tamura Y, et al. Lipolysis in the absence of hormone-sensitive lipase: evidence for a common mechanism regulating distinct lipases. Diabetes. 2002;51:3368–75.

29. Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, et al. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. J Biol Chem. 2002;277:4806–15.

30. Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R. Lipolysis—a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. Progress in Lipid Research. 2011;50:14–27.

31. Xu L, Zhou L, Li P CIDE Proteins and lipid metabolism. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012; 32:1094-8.

32. Sztalryd C, Xu G, Dorward H, et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. J Cell Biol. 2003;161:1093–103.

33. Vigouroux C, Caron-Debarle M, Le Dour C, Magré J, Capeau J. Molecular mechanisms of human lipodystrophies: From adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity. Int J Biochem Cell Biol. 2011;43:862-76.

34. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. Science 2004;306:1383–86.

35. Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. J Lipid Res. 2009;50:3–21.

36. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. Science. 2006;312: 734–7.

37. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, et al. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman syndrome. Cell Metab 2006; 3: 309–19.

38. Subramanian V, Rothenberg A, Gomez C, et al. Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem. 2004; 279:42062–71.

39. Granneman JG, Moore HP, Granneman RL, Greenberg AS, Obin MS, Zhu Z. Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. J Biol Chem. 2007;282:5726–35

40. Nishino N, Tamori Y, Tateya S, Kawaguchi T, Shibakusa T, Mizunoya W, et al. FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. J Clin Invest. 2008;118:2808-21.

41. Yang X, Heckmann BL, Zhang X, Smas CM, Liu J. Distinct mechanisms regulate ATGL-mediated adipocyte lipolysis by lipid droplet coat proteins. Mol Endocrinol. 2013;27(1):116-26.

42. Yang X, Lu X, Lombès M, Rha GB, Chi YI, Guerin TM, Smart EJ, Liu J. The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. Cell Metab. 2010;11(3):194-205.

43. Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. Prog Lipid Res. 2009;48:275–97.

44. Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. Biochim Biophys Acta. 1986; 876:288–93.

45. Shen WJ, Sridhar K, Bernlohr DA, Kraemer FB. Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipidbinding protein. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96:5528-32.

46. Hamilton JA, Kamp F. How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids?. Diabetes. 1999;48:2255–69.

47. Langin D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis.C R Biol. 2006;329:598–607.

48. Tansey JT, Sztalryd C, Hlavin EM, Kimmel AR, Londos C. The central role of perilipin A in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. IUBMB Life. 2004;56:379–85.

49. King LS, Kozono D, Agre P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5:687–98.

50. Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, et al. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:10993–8.

51. Maeda N, Funahashi T, Hibuse T, et al. Adaptation to fasting by glycerol transport through aquaporin 7 in adipose tissue. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101: 17801–6.

52. Hara-Chikuma M, Sohara E, Rai T, et al. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. J Biol Chem. 2005;280:15493–6.

53. Hanson RW, Reshef L. Glyceroneogenesis revisited. Biochimie. 2003;85:1199–205.

54. Jensen MD, Ekberg K, Landau BR. Lipid metabolism during fasting. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;281:E789.

55. Nye CK, Hanson RW, Kalhan SC.Glyceroneogenesis Is the Dominant Pathway for Triglyceride Glycerol Synthesis in Vivo in the Rat. J Biol Chem. 2008;283:27565–74.

56. Ballard FJ, Hanson RW, Leveille GA. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. J Biol Chem. 1967;242:2746–50.

57. Festuccia WT, Guerra-Sa R, Kawashita NH, et al. Expression of glycerokinase in brown adipose tissue is stimulated by the sympathetic nervous system. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003;284:R1536–41.

58. Chen JL, Peacock E, Samady WT, et al. Physiologic and pharmacologic factors influencing glyceroneogenic contribution to triacylglycerides glycerol measured by mass isotopomer distribution analysis. J Biol Chem. 2005;280:25396-402.

59. Brito SC, Festuccia WL, Kawashita NH, et al. Increased glyceroneogenesis in adipose tissue from rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet: role of dietary fatty acids. Metabolism. 2006;55:84-9.

60. Nye CK, Hanson RW, Kalhan SC. Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. J Biol Chem. 2008;283:27565-74.

61. Jensen MD: Lipolysis: contribution from regional fat. Annu Rev Nutr. 1997;17:127-39.

62. Rebuffe-Scrive M, Andersson B, Olbe L, Bjorntorp P: Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots of nonobese men and women. Metabolism. 1989; 38:453-58.

63. Vikman HL, Savola JM, Raasmaja A,Ohisalo JJ: Alpha 2A-adrenergic regulation of cyclic AMP accumulation and lipolysis in human omental and subcutaneous adipocytes. Int J Obes Relat Metab Disord. 1996; 20:185-(9).

64. Portillo MP, Villaro JM, Torres MI,Macarulla MT: In vivo lipolysis in adipose tissue from two anatomical locations measured by microdialysis. Life Sci. 2000; 67:437-45.

65. Palou M, Priego T, Sánchez J, Rodríguez AM, Palou A, Picó C. Gene expression patterns in visceral and subcutaneous adipose depots in rats are linked to their morphologicfeatures. Cell Physiol Biochem. 2009;24(5-6):547-56.

66. Gustat J, Srinivasan SR ,Elkasabany A, Berenson GS. Relation of self-rated measures of physical activity to multiple risk factors of insulin resistance síndrome in young adults: the Bogalusa Herat study. J Clin Epide. 2002;55:997-1006.

67. Mcclelland GB. Fat to the fire: The regulation of lipid oxidation with exercise and environmental stress. Comparative Biochem and Physiol. 2004;139:443-60.

68. Bonifácio NP, César TB. Metabolismo dos lípides durante o exercicio físico. R Bras Ci e Mov. 2005;13(4):101-6.

69. Horowitz JF. Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. Trends Endocrinol Metab*.* 2003;14:386–92.

70. Horowitz JF, Mora-Rodriguez R, Byerley LO, Coyle EF. Lipolytic suppression following carbohydrate ingestion limits fat oxidation during exercise. Am J Physiol. 1997;273:768–75.

71. Klein S, Coyle EF, Wolfe RR. Fat metabolism during low-intensity exercise in endurance trained and untrained men. Am J Physiol.1994;267:934–40.

72. Wolfe RR, Klein S, Carraro F, Weber JM. Role of triglyceride–fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. Am J Physiol.1990; 258:382–E38.

73. Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E, Wolfe RR. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity. Am J Physiol. 1993;265:380–91.

74. Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Zhang XJ, Wolfe RR. Relationship between fatty acid delivery and fatty acid oxidation during strenuous exercise. J Appl Physiol. 1995;79:1939–45.

75. Bouchard C, Deprés JP, Tremblay A. Exercise and obesity. Obesity Res. 1993;1:133-47.

76. King NA, Burley VJ, Blundell JE. Exercise- induced suppression of appetite. Effect on food intake and implication for energy balance. Eur J Clin Nutr. 1994;48:715-24.

77. Deprés JP. Obesity regional adipose tissue distribution effect of exercise. Japan Scien Soc Press. 1991;251-9.

78. Ciolac EG, Guimarães GV. Exercício físico e síndrome metabólica. Rev Brás de Méd do Esp. 2004;10:4.

79. Douen AG, Ramlal T, Cartee GD, Klip A. Exercise modulates the insulin-induced translocation of glucose transporters in rat skeletal muscle. FEBS Lett. 1990;261:256-60.

80. O'Doherty RM, Bracy DP, Osawa H, Wasserman DH, Granner DK. Rat skeletal muscle hexokinase II mRNA and activity are increased by a single bout of acute exercise. Am J Physiol. 1994;266:E171-8.

81. Ebeling P, Bourey R, Koranyi L, Tuominen JA, Groop LC, Henriksson J, Mueckler M, Sovijarvi A, Koivisto VA. Mechanism of enhanced insulin sensitivity in athletes: increased blood flow, muscle glucose transport protein (GLUT-4) concentration and glycogen synthase activity. J Clin Invest. 1993;92:1623-31.

82. Stich V, de Glisezinski I, Berlan M, Bulow J, Galitzky J, Harant I, et al. Adipose tissue lipolysis is increased during a repeated bout of aerobic exercise. J Appl Physiol. 2000;88:1277-83.

83. Ruderman NB, Keller C, Richard AM, Saha AK, Luo Z, Xiang X, et al. Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome. Diabetes. 2006;55(Suppl 2):S48-54.

84. Ruderman NB, Park H, Kaushik VK, Dean D, Constant S, Prentki M, Saha AK. AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. Acta Physiol Scand. 2003;178(4):435-42.

85. Nachbar RT, Proença ARG, Almeida FN, Masi LN, Natali MRM, Costa CEM, Moraes SMF. Efeito da dieta de cafeteria na indução de esteatose hepática em ratos treinados e sedentários. Rev da Educ Fís. 2007;18:85-9.

86. Negrao CE, Moreira ED, Santos MC, Farah VM, Krieger EM. Vagal function impairment after exercise training. J Appl Physiol. 1992;72:1749-53.

87. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. Sleep Med Rev. 2005;9:11-24.

88. Lack LC, Wright HR. Chronobiology of sleep in humans. Cell Mol Life Sci. 2007;64:1205-15.

89. Armstrong SM. Melatonin and circadian control in mammals. Experientia. 1989;45(10):932-8.

90. Cipolla-neto J, Afeche SC. Glandula pineal. In: Aires MM editor. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1999. p. 805-11.

91. Cagnacci A. Melatonin in relation to physiology in adult humans. J Pineal Res. 1996;21(4):200-13.

92. Cardinali DP, Golombek DA, Rosenstein RE, Cutrera RA, Esquifino AI. Melatonin site and mechanism of action: single or multiple? J Pineal Res. 1997 Aug;23(1):32-9.

93. Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. J Biol Chem 1994 269:28531–4.

94. Carlberg C, Wiesenberg I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. J Pineal Res. 1995 May;18(4):171-8.

95. Tan DX, Chen LD, Poegeller B, Manchester LC. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. Endocr J. 1993;1:57–60.

96. Tan DX, Manchester LC, Fuentes-Broto L, Paredes SD, Reiter RJ. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. Obes Rev. 2011;12(3):167-88.

97. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM. Melatonin and reproduction revisited. Biol Reprod. 2009;81(3):445-56.

98. Lima FB, Machado UF, Bartol I, et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. Am J Physiol. 1998;275:934-41.

99. Alonso-Vale MI, Borges-Silva CN, Anhê GF, et al. Light/dark cycle-dependent metabolic changes in adipose tissue of pinealectomized rats. Horm Metab Res. 2004;36:474-9.

100. la Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, van der Vliet J, Buijs RM. Role for the Pineal and Melatonin in Glucose Homeostasis: Pinealectomy Increases Night-Time Glucose Concentrations. J Neuroendocrinol. 2001;13:1025-32.

101. Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rats. J Pineal Res. 2002;33:172-7.

102. Borges-Silva CN, Alonso-Vale MI, Franzói-De-Moraes SM, et al. Pinealectomy impairs adipose tissue adaptability to exercise in rats. J Pineal Res. 2005;38:278-83.

103. Puchalski SS, Green JN, Rasmussen DD. Melatonin effect on rat body weight regulation in response to high-fat diet at middle age. Endocrine. 2003;21(2):163-7.

104. Rasmussen DD, Mitton DR, Larsen SA, Yellon SM. Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. J. Pineal Res. 2001;31:89–94.

105. Borges-Silva CN, Fonseca-Alaniz MH, Alonso-Vale MI, et al. Reduced lipolysis and increased lipogenesis in adipose tissue from pinealectomized rats adapted to training. J Pineal Res. 2005;39:178–84.

106. Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, et al. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intra-abdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. Endocrinology. 2000;141:487–97.

107. Zalatan F, Krause JA, Blask DE. Inhibition of isoproterenol-induced lipolysis in rat inguinal adipocytes in vitro by physiological melatonin via a receptor- mediated mechanism. Endocrinology. 2001;142:3783–90.

108. Ng TB, Wong CM. Effects of pineal indoles and arginine vasotocin on lipolysis and lipogenesis in isolated adipocytes. J Pineal Res. 1986;3:55–66.

109. de Oliveira AC, Andreotti S, Farias TS, et al. Metabolic Disorders and Adipose Tissue Insulin Responsiveness in Neonatally STZ-Induced Diabetic Rats Are Improved by Long-Term Melatonin Treatment. Endocrinology. 2012;153(5).

110. Leitner C, Bartness TJ. An intact dorsomedial hypothalamic nucleus, but not the subzona incerta or reuniens nucleus, is necessary for short-day melatonin signal-induced responses in Siberian hamsters. Neuroendocrinology. 2011;93(1):29-39.

111. Fraietta R, Zylberstejn DS, Esteves SC. Hypogonadotropic Hypogonadism Clinics (São Paulo). 2013;68(1).

112. Chowdhury VS, Yamamoto K, Ubuka T, Bentley GE, Hattori A, Tsutsui K. Melatonin Stimulates the Release of Gonadotropin-Inhibitory Hormone by the Avian Hypothalamus Endocrinology. 2010;151(1):271–80.

113. Jiménez-Aranda A, Fernández-Vázquez G, Campos D, Tassi M, Velasco-Perez L, Tan DX, Reiter RJ, Agil A. Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats. J Pineal Res. 2013 Aug 12. In press.

114. Negrão CE, Moreira ED, Santos MCLM, Farah VMA, Krieger EM. Vagal function impairment after exercise training. J Appl Physiol. 1992;72(5):1749-53.

115. Dufloth DL, Morris M, Michelini LC. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarii. Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol. 1997;42(4):R1271-82.

116. Rodbell M. Metabolism of Isolated Fat. I. Cells Effects of Hormones on Glucose Metabolism + Lipolysis. J Biol Chem. 1964;239(2)375.

117. Fine JB, DiGirolamo M. A simple method to predict cellular density in adipocyte metabolic incubations. Int J Obes Relat Metab Disord. 1997;21(9):764-68.

118. Dole VP, Meinertz H. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. J Biol Chem. 1960;235:2595-9.

119. Lima FB, Matsushita DH, Hell NS, Dolnikoff MS, Okamoto MM, Cipolla-Neto J. The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of the periodicity of food intake, time of day and melatonin. Braz J Med Biol Res. 1994;27(4):995-1000.

120. Lott JA, Turner K. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. Clin Chem. 1975;21:1754-60.

121. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assesment, insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucosa and insulin concentrations in man. Diabetologia. 1985;28(7): 412-29.

122. Almeida FN, Proença ARG, Chimin P, Marçal AC, Bessa-Lima F, Carvalho CR. physical exercise and pancreatic islets: acute and chronic actions on insulin secretion. Islets. 2012;4(4):296-301.

123. Mendes C, Lopes AM, do Amaral FG, Peliciari-Garcia RA, Turati Ade O, Hirabara SM, Scialfa Falcão JH, Cipolla-Neto J. Adaptations of the aging animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin. J Pineal Res. 2013;55(3):229-39.

124. Zanuto R, Siqueira-Filho MA, Caperuto LC, et al. Melatonin improves insulin sensitivity independently of weight loss in old obese rats. J Pineal Res. 2013; 55(2):156-65.

125. Wahlqvist ML, Hodgson JM, Ng FM, Hsu-Hage BH, Strauss BJ. The role of nutrition in abdominal obesity. Nutr Res. 1999;19(1):85-101.

126. Prins JB, O'Rahilly S. Regulation of adipose cell number in man. Clin Sci. 1997;92(1):3-11.

127. Despres J, Bouchard C, Savard R, Tremblay A, Marcotte M, Theriault G. The effect of a 20-week endurance training program on adipose-tissue morphology and lipolysis in men and women. Metabolism. 1984;33(3):235-39.

128. Rajmil O, Puig-Domingo M, Tortosa F, et al. Melatonin concentration before and during testosterone replacement in primary hypogonadic men. Eur J Endocrinol. 1997;137:48–52.

129. Luboshitzky R, Wagner O, Lavi S, Herer P, Lavie P. Abnormal melatonin secretion in male patients with hypogonadism. J Mol Neurosci. 1996;7(2):91-8.

130. Heideman PD, Bierl CK, and Sylvester CJ. Photoresponsive Fischer 344 Rats are reproductively inhibited by melatonin and differ in 2-[125I] lodomelatonin binding from nonphotoresponsive Sprague-Dawley rats. J Neuroendocrinol. 2001;13(3):223-32.

131. Rudeen PK. Apparent dualistic effects of twice daily melatonin administration on reproductive organs in male golden hamsters. Horm Res. 1981;15(2):99-108.

132. Katznelson L, Finkelstein JS, Schoenfeld DA, Rosenthal DI, Anderson EJ, Klibanski A. Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab. 1996; 81:4358–65.

133. Grinspoon S, Corcoran C, Lee K, et al. Loss of lean body and muscle mass correlates with androgen levels in hypogonadal men with acquired immunodeficiency syndrome and wasting. J Clin Endocrinol Metab.1996;81:4051–8.

134. Mauras N, Hayes V, Welch S, et al. Testosterone deficiency in young men: marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and adiposity. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1998;83:1886–92.

135. Oner J, Oner H, Sahin Z, Demir R, Ustunel I, 2008. Melatonin is as effective as testosterone in the prevention of soleus muscle atrophy induced by castration in rats. Anat Rec (Hoboken). 2008;291:448–55.

136. Frost RA, Lang CH. Protein Kinase B/ Akt: A Nexus of Growth Factor and Cytokine Signaling in Determining Muscle Mass. J Appl Physiol. 2007;103:378–87.

137. Shima T, Chun SJ, Niijima A, et al. Melatonin suppresses hyperglycemia caused by intracerebroventricular injection of 2-deoxy-d-glucose in rats. Neurosci Lett. 1997;226:119–22.

138. Ha E, Yim SV, Chung JH, et al. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. J Pineal Res. 2006;4:67–72.

139. Lima FB, Matsushita DH, Hell NS, et al. The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of the periodicity of food intake, time of day and melatonin. Braz J Med Biol Res. 1994;27:995–1000.

140. Ha E, Yim SV, Chung JH et al. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. J Pineal Res. 2006;41:67–72.

141. Bodkin NL, Nicolson M, Ortmeyer HK, Hansen BC Hyperleptinemia: relationship to adiposity and insulin resistance in the spontaneously obese rhesus monkey. Horm Metab Res. 1996;28:674–8.

142. Wolden-Hanson T, Marck BT, Smith L, Matsumoto AM. Cross-sectional and longitudinal analysis of age-associated changes in body composition of male Brown Norway rats: association of serum leptin levels with peripheral adiposity. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1999;54:B99–107.

143. Ríos-Lugo MJ, Cano P, Jiménez-Ortega V, et al. Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. J J Pineal Res. 2010;49(4):342-8.

144. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;280:E827-47.

145. Wahlen K, Sjölin E, Löfgren P. Role of fat cell size for plasma leptin in a large population based sample. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2011;119(5):291-4.

146. Kannan V. Diet, activity and diabetes. J Assoc Physicians India. 1999;47(8):761-3.

147. Rigla M, Sánchez-Quesada JL, Ordóñez-Lianos J, et al. Effect of physical exercise on lipoprotein (a) and low-density lipoprotein modifications in type-1 and type-2 diabetic patients. Metabolism. 2000;49(5):640-7.

148. Cheik NC, Guerra RLF, Viana FP, et al. Efeito de diferentes freqüéncias de exercício físico na prevencao da dislipidemia e da obesidade em ratos normo e hipercolesterolémicos. Rev bras Educ Fís Esp. 2006;20(2):121-9.

149. Bojková B, Orendás P, Friedmanová L, et al. Prolonged melatonin administration in 6-month-old Sprague-Dawley rats: metabolic alterations. Acta Physiol Hung. 2008;95(1):65-76.

150. Ha E, Yim SV, Chung JH, et al. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. J Pineal Res. 2006;41(1):67-72.

151. Lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. J Lipid Res. 1993;34:1057–91.

152. Lladó I, Rodríguez-Cuenca S, Pujol E, et al. Gender effects on adrenergic receptor expression and lipolysis in white adipose tissue of rats. Obes Res. 2002;10(4):296-305.

153. Carey GB. Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. Adv Exp Med Biol. 1998;441:157–70.

154. Valet P, Grujic D, Wade J, et al. Expression of human alpha 2-adrenergic receptors in adipose tissue of beta 3-adrenergic receptor-deficient mice promotes diet-induced obesity. J BiolChem. 2000;275:34797– 802.

155. Lafontan M, Berlan ML. Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. Endocr Rev.1995;16:716 –38.

156. Zalatan F, Krause JA, Blask DE. Inhibition of isoproterenol-induced lipolysis in rat inguinal adipocytes in vitro by physiological melatonin via a receptor-mediated mechanism. Endocrinology. 2001;142(9):3783-90.

157. Large V, Reynisdottir S, Langin D, et al. Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. J Lipid Res. 1999;40(11):2059-66.

158. Arner P. Regulation of lipolysis in fat cells. Diabetes Rev. 1996;4:450–63.

159. Enevoldsen LH, Stallknecht B, Langfort J et al. The effect of exercise training on hormone-sensitive lipase in rat intra-abdominal adipose tissue and muscle. J Physiol 2001;536:871–7.

160. Izawa T, Komabayashi T, Shinoda K et al. Possible mechanism of regulating adenylate cyclase activity in adipocyte membranes from exercise-trained male rats. Biochem Biophys Res Commum. 1988; 151:1262–68.

161. Shepherd RE, Noble EG, Klug GA et al. Lipolysis and cAMP accumulation in adipocytes in response to physical training. J Appl Physiol. 1981;50:143–8.

162. Enevoldsen LH, Stallknecht B, Fluckey JD, Galbo H. Effect of exercise training on in vivo lipolysis in intra-abdominal adipose tissue in rats Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000;279:E585–92.

163. Beylot M, Neggazi S, Hamlat N, Langlois D, Forcheron F. Perilipin 1 ablation in mice enhances lipid oxidation during exercise and does not impair exercise performance. Metabolism. 2012;61(3):415-23.

164. Stich V, de Glisezinski I, Crampes F, et al. Activation of antilipolytic alpha(2)-adrenergic receptors by epinephrine during exercise in human adipose tissue. Am J Physiol. 1999;277:R1076-083.

165. Terrón MP, Delgado-Adámez J, Pariente JA, Barriga C, Paredes SD, Rodríguez AB. Melatonin reduces body weight gain and increases nocturnal activity in male Wistar rats. Physiol Behav. 2013;13:118:8-13.

APÊNDICE A - Protocolo de Treinamento

Semanas/dias	Duração	Aquecimento		50% máx.		60% máx.		Recuperação	
	1º TESTE DE EXAUSTÃO								
Semana 1	min	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.
segunda	15	5	0,3	5	0,4	-		5	0,3
terça	17	5	0,3	7	0,4	-		5	0,3
quarta	20	5	0,3	10	0,4	-		5	0,3
quinta	25	5	0,3	15	0,4	-		5	0,3
sexta	30	5	0,3	20	0,4	-		5	0,3
Semana 2	min	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.
segunda	30	5	0,3	20	0,5	-		5	0,3
terça	30	5	0,3	15	0,5	5	0,6	5	0,3
quarta	30	5	0,3	15	0,5	5	0,6	5	0,3
quinta	35	5	0,3	15	0,5	10	0,6	5	0,3
sexta	40	5	0,3	20	0,5	10	0,6	5	0,3
Semana 3	min	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.
segunda	40	5	0,3	20	0,5	10	0,6	5	0,3
terça	45	5	0,3	25	0,5	10	0,6	5	0,3
quarta	45	5	0,3	25	0,5	10	0,6	5	0,3
quinta	50	5	0,3	25	0,5	15	0,6	5	0,3
sexta	60	5	0,3	30	0,5	20	0,6	5	0,3
Semana 4	min	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.
segunda	45	5	0,3	20	0,5	15	0,6	5	0,3
terça	60'	5	0,3	30	0,5	20	0,6	5	0,3
quarta	60'	5	0,3	30	0,5	20	0,6	5	0,3
quinta	60'	5	0,3	25	0,5	25	0,6	5	0,3
sexta	2º TESTE DE EXAUSTÃO								
Semana 5	min	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.
segunda	15	5	0,4	5	0,6	-		5	0,4
terça	17	5	0,4	7	0,6	-		5	0,4
quarta	20	5	0,4	10	0,6	-		5	0,4
quinta	25	5	0,4	15	0,6	-		5	0,4
sexta	30	5	0,4	20	0,6	-		5	0,4
Semana 6	min	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.
segunda	30	5	0,4	20	0,6	-		5	0,4
terça	30	5	0,4	15	0,6	5	0,7	5	0,4
quarta	30	5	0,4	15	0,6	5	0,7	5	0,4
quinta	35	5	0,4	15	0,6	10	0,7	5	0,4
sexta	40	5	0,4	20	0,6	10	0,7	5	0,4
Semana 7	min	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.
segunda	40	5	0,4	20	0,6	10	0,7	5	0,4
terça	45	5	0,4	25	0,6	10	0,7	5	0,4
quarta	45	5	0,4	25	0,6	10	0,7	5	0,4
quinta	50	5	0,4	25	0,6	15	0,7	5	0,4
sexta	60	5	0,4	30	0,6	20	0,7	5	0,4
Semana 8	min	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.	min	velocid.
segunda	45	5	0,4	20	0,6	15	0,7	5	0,4
terça	60'	5	0,4	30	0,6	20	0,7	5	0,4
quarta	60'	5	0,4	30	0,6	20	0,7	5	0,4
quinta	60'	5	0,4	25	0,6	25	0,7	5	0,4
Sexta	3º TESTE DE EXAUSTÃO								

APÊNDICE B - Tabelas

CURVA DE PESO CORPORAL (g) n=4-5/grupo				
semanas	**SC**	**SM**	**TC**	**TM**
11	346,5±09,74	336,0±09,89	339,2±07,17	344,0±08,09
12	378,5±13,26	356,5±10,32	360,8±09,52	363,2±10,05
13	399,5±12,23	369,5±11,84	374,8±09,15	371,2±09,81
14	415,5±12,84*	373,0±11,90	379,2±10,36	376,0±09,69
15	433,0±13,86*	386,5±14,93	390,0±11,17	386,0±09,44
16	455,5±14,22*	400,0±12,57	412,8±12,78	403,2±13,20
17	463,5±14,26*	405,0±14,20	412,8±12,75	398,8±13,03
18	459,5±12,20*	400,0±12,02	392,8±11,00	371,2±11,84#
19	435,5±10,78*	382,0±12,57	388,8±12,67	363,2±13,39#

Tabela B.1 Curva de Peso Corporal. Peso corporal dos animais ao longo do seu desenvolvimento. Medidas realizadas uma vez/semana. Valores em (g) correspondem à média ± EPM dos grupos em cada semana de desenvolvimento dos animais, (*) vs. TC ou SM ou TM (#) vs. TC ou SM ($p<0.05$).

GANHO DE PESO CORPORAL (g) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
Peso(g)	113,0±4,20	64,0±10,00#	53,6±4,26&	27,2±5,31*

Tabela B.2 Ganho de Peso Corporal. Valores correspondem à média ± EPM dos grupos. Valores expressos em (g). (*) vs. demais grupos (#) vs. SC (&) vs. SC ($p<0.05$).

INGESTÃO ALIMENTAR (g) n=4-5/grupo				
semanas	**SC**	**SM**	**TC**	**TM**
1	27,8±0,85	27,3±0,42	28,0±1,49	28,6±1,19
2	27,1±0,56	25,1±0,78	25,6±1,00	25,9±1,24
3	28,0±1,01	25,2±1,18	25,8±0,89	25,0±1,01
4	27,0±0,82	24,7±1,37	25,2±0,97	24,6±0,64
5	27,7±0,94	25,7±1,06	25,6±1,26	25,7±0,74
6	28,2±0,99	25,6±0,76	25,1±1,09	26,0±0,91
7	25,4±0,99	23,0±0,97	21,7±1,09	23,2±1,02
8	24,6±0,95	22,4±0,68	18,3±0,66	16,9±1,12*

Tabela B.3 Ingestão Alimentar. As medidas de ingestão alimentar foram realizadas uma vez/semana. Valores expressos em (g) correspondem à média ± EPM dos grupos em cada semana de desenvolvimento dos animais, (*) vs. S ($p<0.05$).

INGESTÃO ALIMENTAR/100g de P,C (g) n=4-5/grupo				
semanas	**SC**	**SM**	**TC**	**TM**
1	27,8±0,85	27,3±0,42	28,0±1,40	28,6±1,19
2	27,1±0,57	25,1±0,78	25,6±1,00	25,9±1,24
3	28,0±1,01	25,2±1,18	25,8±0,89	25,0±1,01
4	27,0±0,82	24,7±1,37	25,2±0,97	24,6±0,64
5	27,7±0,94	25,7±1,06	25,6±1,26	25,7±0,74
6	28,2±0,99	25,6±0,76	25,1±1,09	26,0±0,91
7	25,4±0,99	23,0±0,97	21,7±1,09	23,2±1,02
8	24,6±0,95	22,4±0,68	18,3±0,66	16,9±1,12*

Tabela B.4 Ingestão Alimentar Normalizado/100g de peso corporal. As medidas de ingestão alimentar foram realizadas uma vez/semana. Valores expressos em (g) correspondem à média ± EPM dos grupos em cada semana de desenvolvimento dos animais, (*) vs. S (p<0.05).

CONSUMO HÍDRICO (mL) n=4-5/grupo				
semanas	**SC**	**SM**	**TC**	**TM**
1	52,1±4,58	44,6±1,45	55,2±4,73	55,8±5,47
2	51,0±3,21	65,9±6,92*****	48,6±2,20	61,7±1,64*****
3	51,5±3,60	73,4±9,39*****	50,0±2,51	66,6±3,68*****
4	41,8±2,36	57,9±9,55	40,9±2,54	47,6±2,09
5	44,0±2,68	51,4±3,06	42,9±2,28	55,7±1,70
6	46,5±3,81	68,8±3,05*****	44,5±3,51	63,2±2,24*****
7	38,6±2,77	41,7±0,73	35,6±3,29	47,2±3,97
8	39,2±3,21	40,6±2,44	31,3±1,76	38,0±3,96

Tabela B.5 Ingestão Hídrica. As medidas de ingestão hídrica foram realizadas uma vez/semana. Valores expressos em (mL) correspondem à média ± EPM dos grupos em cada semana de desenvolvimento dos animais. (*) SM e TM vs. SC e TC (p<0.05).

TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO (segundos) n=4-5/grupo				
semanas	**SC**	**SM**	**TC**	**TM**
0	430,4±21,69	428,0±30,76	418,6±21,35	449,2±28,04
4	303,0±44,59	385,0±67,78	785,4±29,79* **Ω**	766,2±10,55* **Ω**
8	300,0±31,46	367,5±63,81	798,0±22,45 **Ω**	808,0±54,99 **Ω**

Tabela B.6 Teste de Esforço Máximo. Tempo máximo (segundos) alcançada durante o teste de esforço realizado no início, na quarta e oitava semana dos protocolos nos ratos sedentários e treinados. Valores expressos em (segundos) Média ± EPM, (*) TM e TC vs. SM e SC (p <0,05) (Ω) vs. semana 0 (p<0,05).

COXINS ADIPOSOS (g/100g de peso corporal) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
SUB	0,71±0,06	0,88±0,14	0,77±0,02	0,66±0,08
MS	0,46±0,07	0,54±0,08	0,53±0,10	0,30±0,05
PE	1,04±0,07	1,25±0,16	1,38±0,07	1,00±0,15
RP	0,66±0,05	0,93±0,12	0,94±0,08#	0,57±0,08*
Total	2,86±0,23	3,59±0,43	3,61±0,21	2,53±0,34 Ω

Tabela B.7 Coxins Adiposos. Os dados foram arranjados de maneira a demonstrar o peso dos coxins adiposos, das regiões subcutânea, mesentérica, periepididimal, retroperitoneal e total dos grupos. Valores representam à média ± EPM dos grupos. Valores expressos em (g / 100g de peso corporal). (*) vs TC ou SM (#) vs SC (p<0,05).

DIÂMETRO ADIPÓCITOS (um) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
SUB	67,14±1,6	64,69±0,5	69,35±1,2	57,18±1,2*
RP	87,02±2,0	91,54±2,5	92,73±1,2	75,31±2,8*

Tabela B.8 Diâmetro Médio dos Adipócitos. Comparação dos diâmetros médio dos adipócitos das regiões SUB, RP. Valores representam à média ± EPM dos grupos. Medidas expressas em (μm). Diferenças significativas em consequência do treinamento e tratamento (*) vs demais grupos (p<0,05).

NÚMERO DE ADIPÓCITOS n4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
SUB	$2,17\ x10^7 \pm 1,5x10^6$	$2,57\ x10^7 \pm 3,0x10^6$*	$1,94\ x10^7 \pm 1,9x10^6$	$2,68\ x10^7 \pm 7,4x10^5$ α*
RP	$9,29x10^6 \pm 6,9x10^5$	$1,06x10^7 \pm 5,2x10^5$	$9,30x10^7 \pm 8,3x10^5$	$1,02\ x10^7 \pm 8,1x10^5$

Tabela B.9 Número de Adipócitos. Comparação do número estimado de adipócitos presentes em cada tecido, medida expressa em milhões de células. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos. (α) vs. TC; (*) SM e TM vs SC e TC (p<0.05).

ESTRUTURAS REPRODUTORAS (g) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
Testículo Dir,	1,84±0,04	1,61±0,11	1,82±0,08	1,74±0,13
Testículo Esq,	1,82±0,02	1,63±0,13	1,81±0,08	1,78±0,15
Epidídimo	1,68±0,02	1,23±0,12*	1,67±0,04	1,46±0,10*
Canal Deferente	0,29±0,01	0,24±0,01	0,25±0,02	0,26±0,02
Vesícula Seminal	1,16±0,13	0,26±0,03*	1,03±0,13	0,42±0,14*

***Tabela B.10 Estruturas Reprodutoras*.** As estruturas foram extraídas e pesadas**.** Valores representam a média ± EPM e expressos em gramas (n=4-5). (*) = SM e TM vs SC e TC (p<0.05).

PESO ÚMIDO E SECO DOS MÚSCULOS EDL E SÓLEO (g/comprimento da tíbia) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
EDL (úmido)	3,78±0,11	3,13±0,11* α	3,45±0,13	3,20±0,16*
EDL (seco)	1,03±0,03	0,88±0,01* α	0,92±0,03	0,89±0,03*
Sóleo (úmido)	2,69±0,15	2,41±0,11	2,43±0,10	2,49±0,17
Sóleo (seco)	0,73±0,03	0,72±0,02	0,70±0,02	0,72±0,03

Tabela B.11 Peso úmido e seco dos músculos EDL e Sóleo. peso úmido do EDL e sóleo normalizado pelo comprimento da tíbia. Valores representam à média ± EPM dos grupos. Medidas expressas em (g/comprimento da tíbia). Diferenças significativas em consequência do treinamento e tratamento (α) vs SC; (*) = SM e TM vs SC e TC (p<0,05).

GLICEMIA (mg/dL) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
GLICEMIA	118,50±4,10	105,72±7,60*	122,61±7,98	98,07±3,96*

Tabela B.12 Dosagem sanguínea de Glicose. Ao final do protocolo os animais foram sacrificados por decapitação e as amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do soro. As barras representam à média ± EPM dos grupos. Medidas expressas em (mg/dL). (*) SM e TM vs SC e TC (p<0,05).

INSULINEMIA (ng/mL) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
INSULINEMIA	1,17±0,31	0,90±0,17	1,37±0,28	0,71±0,13

Tabela B.13 Dosagem sanguínea de Insulina. Ao final do protocolo os animais foram sacrificados por decapitação e as amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do soro. As barras representam à média ± EPM dos grupos. Valores expressos em (ng/mL). Não foram constatadas diferenças significativas

HOMA-IR [(glicemia (mmo/l) x insulinemia (µU/ml)/22,5)] n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
HOMA-IR	122,14±27,5	125,83±16,5*	100,5±14,6	161,73±32,7*

Tabela B.14 HOMA-IR. Ao final do protocolo os animais foram sacrificados por decapitação e as amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do soro. As barras representam à média ± EPM dos grupos. Valores expressos em [(glicemia (mmo/l) x insulinemia (µU/ml)/22,5)]. (*)= SM e TM vs SC e TC (p<0.05).

COLESTEROLEMIA (mg/dL) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
c-TOTAL	98,60±11,1	99,30±10,2	98,39±07,6	97,84±07,9
HDL-c	32,40±4,32	30,58±1,22	26,28±2,13	27,57±2,71
LDL-c	61,32±7,53	64,51±10,0	68,49±5,83	67,13±6,82
VLDL-c	4,87±0,77	4,27±0,30	3,78±0,23*	3,11±0,12*

Tabela B.15 Colesterolemia. Ao final do protocolo os animais foram sacrificados por decapitação e as amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do soro. As barras representam média ± EPM dos grupos.Valores expressos em (mg/dL). (*) =TC e TM vs SC e SM (p<0,05).

TAG (mg/dL) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
TAG	24,39±3,88	21,37±1,50	18,93±1,17*	15,55±0,61*

Tabela B.16 Dosagem sanguínea de Triacilgliceróis. Ao final do protocolo os animais foram sacrificados por decapitação e as amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do soro. As barras representam média ± EPM dos grupos. Valores expressos em (mg/dL). (*) =TC e TM vs SC e SM (p<0,05).

LEPTINEMIA (ng/mL) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
Leptina	3,06±0,65	2,84±0,50	2,81±0,29	1,46±0,19

Tabela B.17 Dosagem sanguínea de Leptina. Ao final do protocolo os animais foram sacrificados por decapitação e as amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do soro. As barras representam média ± EPM dos grupos. Valores expressos em (ng/mL). Não foram constatadas diferenças significativas.

ADIPONECTINEMIA (ug/mL) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
Adiponectina	3,10±0,55	4,02±0,60	3,37±0,37	3,74±0,21

Tabela B.18 Dosagem sanguínea de Adiponectina. Ao final do protocolo os animais foram sacrificados por decapitação e as amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do soro. As barras representam média ± EPM dos grupos. Valores expressos em (ug/mL). Não foram constatadas diferenças significativas.

TESTOSTERONEMIA (ng/dL) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
Testosterona	54,09±29,21	n/d	30,65±16,39	n/d

Tabela B.19 Dosagem sanguínea de Testosterona. Ao final do protocolo os animais foram sacrificados por decapitação e as amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do soro. As barras representam média ± EPM dos grupos. Valores expressos em (ng/dL). (n/d=valores não detectáveis). Não foram constatadas diferenças significativas.

INCORPORAÇÃO DE D-[U-14C]-GLICOSE EM LIPÍDEOS EM ADIPÓCITOS ISOLADOS SUB (nmol,10^{-6} celulas,h^{-1}) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
BASAL	109,95±27,3	120,47±22,3	112,70±15,1	66,63±7,59
ESTIMULADO	219,23±35,9ω	209,33±39,0ω	223,92±35,3ω	123,02±18,4ω

Tabela B.20 Incorporação de D-[U-14C]-Glicose em Lipídeos em Adipócitos Isolados em Tecido Adiposo Subcutâneo. Quantificação realizada em teste biológico *in vitro*, a partir de adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal e na estimulada por insulina. Valores expressos em (nmol.10^6 células.h^{-1}). Diferenças significativas apenas entre situação basal e estimulada por insulina ω vs basal correspondente (p<0,05).

INCORPORAÇÃO DE D-[U-14C]-GLICOSE EM LIPÍDEOS EM ADIPÓCITOS ISOLADOS RP (nmol,10^{-6} celulas,h^{-1}) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
BASAL	372,21±68,8	347,85±128,9	317,44±42,0	281,99±27,0
ESTIMULADO	588,78±91,7ω	485,24±159,4ω	548,95±79,0ω	504,64±60,3ω

Tabela B.21 Incorporação de D-[U-14C]-Glicose em Lipídeos em Adipócitos Isolados em Tecido Adiposo Retroperitoneal. Quantificação realizada em teste biológico *in vitro*, a partir de adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal e na estimulada por insulina. Valores expressos em (nmol.10^6 células.h^{-1}). Diferenças significativas apenas entre situação basal e estimulada por insulina ω vs basal correspondente (p<0,05).

LIPÓLISE SUB [Glicerol] (nmol/10^6 celulas) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
BASAL	1150,18±417,8	999,92±155,9	1267,64±348,44	634,72±120,9
ESTIMULADO	5476,25±1089,8 ω	4824,0±317,9 ω*	5274,0±523,8 ω	3371,2±316,5 ω*

Tabela B.22 Atividade Lipolítica em Tecido Adiposo Subcutâneo. Quantificação realizada em teste biológico *in vitro*, a partir de adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal e estimulada por isoproterenol. Valores expressos em (nmol/10^6 células). Diferenças significativas (ω) vs basal correspondente; (*)SM e TM vs SC e TC (p<0,05).

LIPÓLISE RP [Glicerol] (nmol/10^6 celulas) n=3-4/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
BASAL	3012,0±834,9	2870,33±552,3	3452,0±860,9	1791,7±349,3
ESTIMULADO	12471,0±1507,2 ω	11528,0±909,3 ω*	14078,7±636,0 ω	9391,0±1470,2 ω*

Tabela B.23 Atividade Lipolítica em Tecido Adiposo Retroperitoneal. Quantificação realizada em teste biológico *in vitro*, a partir de adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal e estimulada por isoproterenol. Valores expressos em (nmol/10^6 células). Diferenças significativas (ω) vs basal correspondente; (*)SM e TM vs SC e TC (p<0,05).

SENSIBILIDADE LIPOLÍTICA (Log EC50) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
SUB	-2,00±0,09	-1,92±0,09	-1,89±0,05	-2,04±0,05
RP	-2,18±0,02	-2,29±0,11	-2,04±0,11	-2,23±0,04

Tabela B.24 Atividade Lipolítica em Tecido Adiposo Subcutâneo e Retroperitoneal. Cada valor corresponde à média ± EPM da EC50 de cada grupo de ambos os tecidos. Valores expressos em Log. Não foram constatadas diferenças significativas.

LIPÓLISE SUB POR ÁREA [Glicerol] (nmol/cm^2) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
BASAL	7,51±2,05	7,50±0,96	8,52±2,51	6,46±1,70
ESTIMULADO	37,23±4,05 **ω**	36,56±1,28 **ω**	34,59±1,92 **ω**	32,65±1,57 **ω**

Tabela B.25 Atividade Lipolítica em Tecido Adiposo Subcutâneo. Quantificação realizada em teste biológico *in vitro*, a partir de adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal e estimulada por isoproterenol. Valores expressos em (nmol/cm^2). Diferenças significativas (ω) vs basal correspondente (p<0,05).

LIPÓLISE RP POR ÁREA [Glicerol] (nmol/ cm^2) n=3-4/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
BASAL	12,06±2,42	10,62±0,87	12,95±3,54	10,23±2,23
ESTIMULADO	51,82±2,59 **ω**	44,57±5,65 **ω**	52,39±3,26 **ω**	51,70±1,71 **ω**

Tabela B.26 Atividade Lipolítica em Tecido Adiposo Retroperitoneal. Quantificação realizada em teste biológico *in vitro*, a partir de adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal e estimulada por isoproterenol. Valores expressos em (nmol/cm^2). Diferenças significativas (ω) vs basal correspondente (p<0,05).

SENSIBILIDADE LIPOLÍTICA (Log EC50) n=4-5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
SUB	-2,00±0,09	-1,92±0,09	-1,89±0,05	-2,04±0,05
RP	-2,18±0,02	-2,06±0,16	-2,05±0,11	-2,23±0,04

Tabela B.27 Atividade Lipolítica em Tecido Adiposo Subcutâneo e Retroperitoneal. Cada valor corresponde à média ± EPM da EC50 de cada grupo de ambos os tecidos. Valores expressos em Log. Não foram constatadas diferenças significativas.

EXPRESSÃO GÊNICA Beta-1 (UA) n=5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
SUB	1,00±0,22	0,77±0,17	0,74±0,10	0,62±0,13
RP	1,00±0,33	1,06±0,44	0,33±0,10*	0,29±0,03*

Tabela B.28 Expressão Gênica do Receptor Adrenérgico Beta-1. Amostras do tecido foram homogeneizadas em Trizol e o RNA total extraído e submetido à reação de RT-PCR. As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação do Beta-1 e do constitutivo Beta-2M, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos. Valores expressos em unidades arbitrárias (UA). Diferenças significativas em consequência do treinamento físico em ambos os tecidos (*) TC e TM vs SC e SM

EXPRESSÃO GÊNICA Beta-2 (UA) n=5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
SUB	1,00±0,25	1,02±0,17	1,05±0,09	1,16±0,10
RP	1,00±0,17	1,59±0,66	0,62±0,13	0,99±0,13

***Tabela B.29 Expressão Gênica do Receptor Adrenérgico Beta-2*.** Amostras do tecido foram homogeneizadas em Trizol e o RNA total extraído e submetido à reação de RT-PCR. As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação do Beta-2 e do constitutivo Beta-2M, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos. Valores expressos em unidades arbitrárias (UA). Não foram constatadas diferenças significativas.

EXPRESSÃO GÊNICA Beta-3 (UA) n=5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
SUB	1,00±0,26	0,88±0,18	1,26±0,19	1,25±0,33
RP	1,00±0,21	1,38±0,66	0,69±0,21	0,81±0,08

***Tabela B.30 Expressão Gênica do Receptor Adrenérgico Beta-3*.** Amostras do tecido foram homogeneizadas em Trizol e o RNA total extraído e submetido à reação de RT-PCR. As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação do Beta-3 e do constitutivo Beta-2M, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos. Valores expressos em unidades arbitrárias (UA). Não foram constatadas diferenças significativas.

EXPRESSÃO GÊNICA Alfa-2a (UA) n=5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
SUB	1,00±0,17	1,19±0,26	2,11±0,13* **α**	1,59±0,29*
RP	1,00±0,20	0,80±0,22	0,56±0,10	0,81±0,24

Tabela B.31 Expressão Gênica do Receptor Adrenérgico Alfa 2a. Amostras do tecido foram homogeneizadas em Trizol e o RNA total extraído e submetido à reação de RT-PCR. As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação do Alfa-2a e do constitutivo Beta-2M, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos. Valores expressos em unidades arbitrárias (UA). Diferenças significativas (α) vs.SC (*) TC e TM vs SC e SM ($p<0,05$).

EXPRESSÃO GÊNICA HSL (UA) n=5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
SUB	1,00±0,37	1,13±0,32	1,33±0,33	1,50±0,31
RP	1,00±0,23	1,17±0,33	0,63±0,17	0,94±0,13

Tabela B.32 Expressão Gênica da Enzima Lipolítica HSL. Amostras do tecido foram homogeneizadas em Trizol e o RNA total extraído e submetido à reação de RT-PCR. As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação da HSL e do constitutivo Beta-2M, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos. Valores expressos em unidades arbitrárias (UA). Não foram constatadas diferenças significativas.

EXPRESSÃO GÊNICA Perilipina-1 (UA) n=5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
SUB	1,00±0,35	0,90±0,28	2,07±0,35*** α**	2,22±0,48*
RP	1,00±0,21	1,05±0,35	0,65±0,15	0,81±0,17

***Tabela B.33 Expressão Gênica da Proteína Perilipina-1*.** Amostras do tecido foram homogeneizadas em Trizol e o RNA total extraído e submetido à reação de RT-PCR. As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação da Periilipina-1 e do constitutivo Beta-2M, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos. Valores expressos em unidades arbitrárias (UA). Diferenças significativas (α) vs. SC (*) TC e TM vs SC e SM (p<0,05).

EXPRESSÃO GÊNICA Aquaporina-7 (UA) n=5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
SUB	1,00±0,45	1,32±0,46	2,08±0,29*	2,04±0,47*
RP	1,00±0,21	1,26±0,29	0,82±0,23	0,95±0,21

Tabela B.34 Expressão Gênica da Proteína Aquaporina-7. Amostras do tecido foram homogeneizadas em Trizol e o RNA total extraído e submetido à reação de RT-PCR. As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação da Aquaporina-7 e do constitutivo Beta-2M, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos. Valores expressos em unidades arbitrárias (UA). Não foram constatadas diferenças significativas. (*) TC e TM vs SC e SM (p=0,0507).

EXPRESSÃO GÊNICA FABP-4 (UA) n=5/grupo				
	SC	**SM**	**TC**	**TM**
SUB	1,00±0,31	1,14±0,27	1,23±0,13	1,45±0,25
RP	1,00±0,20	1,19±0,30	0,82±0,22	1,01±0,14

***Tabela B.35 Expressão Gênica da Proteína FABP-4*.** Amostras do tecido foram homogeneizadas em Trizol e o RNA total extraído e submetido à reação de RT-PCR. As barras expressam a razão entre os produtos de amplificação da FABP-4 e do constitutivo Beta-2M, normalizados pela média do controle. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos. Valores expressos em unidades arbitrárias (UA). Não foram constatadas diferenças significativas.