

MARIANA LOPES BENITES

**EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO
SOBRE A SENSIBILIDADE À INSULINA,
MÚSCULO ESQUELÉTICO E TECIDO ÓSSEO
EM RATOS PINEALECTOMIZADOS**

ARAÇATUBA

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus Araçatuba
Departamento de Ciências Básicas

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

MARIANA LOPES BENITES

EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE A SENSIBILIDADE À INSULINA, MÚSCULO ESQUELÉTICO E TECIDO ÓSSEO EM RATOS PINEALECTOMIZADOS

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Doris Hissako Sumida

Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira

Coorientador externo: Prof. PhD Antonio Musarò

ARAÇATUBA

2017

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B467e Benites, Mariana Lopes.
Efeito do exercício resistido sobre a sensibilidade à insulina, músculo esquelético e tecido ósseo em ratos pinealectomizados / Mariana Lopes Benites. – Araçatuba, 2017
127 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Dra. Doris Hissako Sumida
Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Exercício 2. Melatonina 3. Resistência à Insulina
4. Músculo esquelético 5. Osso e ossos I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto
CRB-8/5550

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 22. 01. 1987, Maringá – PR.

Filiação: Sonia Aparecida Lopes Benites

Osmar Antônio Benites

2006 - 2010: Curso de Bacharelado em Educação Física – Universidade Estadual de Maringá – UEM – Maringá – PR.

2010: Curso de Licenciatura em Educação Física – Universidade Estadual de Maringá – UEM – Maringá – PR.

2010: Pós-graduação *Latu Sensu* (especialização) em Fisiologia Humana - Universidade Estadual de Maringá – UEM – Maringá – PR.

2011 - 2013: Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Educação Física nível de Mestrado – Universidade Federal do Paraná – UFPR – Curitiba – PR - Programa de Pós-graduação em Educação Física.

2014 - atualmente: Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Fisiológicas nível de Doutorado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (FOA) – Araçatuba – SP - Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - Sociedade Brasileira de Fisiologia.

2015 – 2016: Doutorado sanduíche – *Sapienza Università di Roma* – Roma – Itália.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, minha eterna professora e mentora;

Ao meu pai, meu ouvinte e conselheiro;

Ao meu noivo, meu guia e companheiro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e bênçãos concedidas durante a realização do meu doutorado.

Aos meus pais, Osmar e Sonia, ao meu irmão, Murilo, e ao meu noivo, Samuel, pelo amor, apoio, incentivo e compreensão.

À Prof. Dra. Doris Hissako Sumida e Prof. Dr. Antonio Musarò, pelas orientações e oportunidades concedidas.

Aos doutores professores Sandra Helena Penha de Oliveira, Edilson Ervolino e Mário Jefferson Quirino Louzada, pela colaboração.

Aos meus colegas de trabalho e aos servidores da Unesp de Araçatuba, da Universidade de São Paulo e da Universidade Sapienza de Roma, pelo auxílio e companhia no decorrer desses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio à pesquisa.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas, ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da via intracelular de sinalização insulínica.	27
Figura 2 – Representação das principais vias que modulam o trofismo nas fibras musculares esqueléticas.	29
Figura 3 – Origens e funções das células ósseas.	31
Figura 4 – Pinealectomia. (a) Escalpo sagital em animal fixado em aparelho estereotáxico; (b) Marcação a lápis para abertura craniana; (c) Retirada da glândula pineal; (d) Animal pinealectomizado; (e) Recolocação da peça óssea em seu lugar de origem; (f) Escalpo suturado.	41
Figura 5 – Exercício resistido realizado em escada pelos animais exercitados (CNEX) e pinealectomizados/exercitados (PNXEX). (a) Escada utilizada para prática de exercício resistido; (b) Animal em treinamento.	44
Figura 6 - Fluxograma da metodologia.	53
Figura 7 – Capacidade máxima de geração de força voluntária nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média \pm EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n=10 ...	57
Figura 8 – (a) Glicemia, (b) área abaixo da curva e (c) Kitt nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média \pm EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n=10.	58
Figura 9 – (a) Glicose plasmática, (b) insulina plasmática e (c) índice HOMA-IR nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média \pm EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n = 10	59
Figura 10 – Expressão de GLUT4 no músculo esquelético nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média \pm EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n = 10	60
Figura 11 – Expressão TNF- α no músculo esquelético nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média \pm EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n = 10	61

- Figura 12 - Coloração H&E das secções do músculo esquelético nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX), n = 10. Barra, 100 µm..... 62
- Figura 13 – Área de secção transversa do músculo esquelético nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média ± EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n = 10. . 63
- Figura 14 - Frenquência de distribuição das áreas das fibras musculares nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média ± EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n = 10. CNS = 3186.9 ± 1509.6 µm²; CNEX = 2828.3 ± 1329.5 µm²; PNX = 2689 ± 1408.1 µm²; PNXEX = 2166.3 ± 1026.2 µm²..... 63
- Figura 15 – Expressão de RNAm para (a) atrogin-1 e (b) MuRF1 no músculo esquelético nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média ± EPM, teste t não pareado (GraphPad Prism 6.0), n = 10. 64
- Figura 16 – (a) Expressão de RNAm de IGF-1 e (b) grau de fosforilação proteica de AKT1 no músculo esquelético nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média ± EPM, teste t não pareado (GraphPad Prism 6.0), n = 10..... 65
- Figura 17 – (a) Expressão de RNAm de miostatina e (b) grau de fosforilação proteica de SMAD 2/3 no músculo esquelético nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média ± EPM, teste t não pareado (GraphPad Prism 6.0), n = 10..... 66
- Figura 18 Coloração H&E das secções do osso nos animais controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado/exercitado (PNXEX), n=7..... 67
- Figura 19 – Área de secção longitudinal do osso nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média ± EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n = 7 68
- Figura 20 – Imunomarcacão para TRAP, RANKL, OPG, OCN e RUNX-2 em cortes longitudinais do osso nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX), n = 7. 69

Figura 21 – (a) fração de volume ósseo - BV/TV; (b) número de trabéculas - Tb.N; (c) espessura trabecular - Tb.Th; (d) conectividade trabecular - Tb.Pf; (e) índice de modelo estrutural – SMI; (f) separação trabecular - Tb.Sp; e (g) imagens representativas das tíbias nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média ± EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n = 10 71

Figura 22 – (a) Conteúdo mineral ósseo – CMO; (b) densidade mineral óssea – DMO; e (c) área total da tíbia nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média ± EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n = 10 72

Figura 23 – (a) força máxima; (b) rigidez óssea; e (c) energia absorvida até a força máxima da tíbia nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média ± EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n = 10 73

TABELA

Tabela 1: Peso corporal, ingestão alimentar e peso dos tecidos musculares, adiposos e ósseos.....	55
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs - produtos finais de glicação avançada

AKT – proteína quinase B

ANOVA – análise de variância

ASL – área de secção longitudinal

BV/TV (%) - volume ósseo percentual (volume ósseo pelo volume tecidual)

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

cm - centímetro

cm² – centímetros quadrados

CNEX – grupo exercitado

CNS – grupo controle

Conn.Dn (mm-3) - densidade da conectividade

DAB - diaminobenzidina

DM - *diabetes mellitus*

DM1 - *diabetes mellitus 1*

DM2 - *diabetes mellitus 2*

DTT – ditionitrito

DXA - densitômetro de dupla emissão de raios-X

EDL - *extensor digitorum longus*

EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético

EPM – erro padrão da média

ER – exercício resistido

FoxO - *fork head box*

g – gramas

GAPDH - *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GAS - gastrocnêmio

GLUT4 - *glucose transporter type 4*

GOD - glicose oxidase

h – horas

H₂O₂ - água oxigenada

HCL – ácido clorídrico
H&E - hematoxilina e eosina
HOMA-IR - Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina
IGF-1 - *insulin growth factor 1*
IKK - *IκB kinase*
IL - interleucina
i.p. - intraperitoneal
IRS - *insulin receptor substrate*
ITT – *insulin tolerance test*
kg – quilograma
Kitt - velocidade de desaparecimento da glicose
KLF5 - *Krüppel-like factor 15*
kV – quilovolt
L – litro
m – metro
mg – miligramas
min – minutos
mJ – milijoule
ml – mililitro
mm – milímetros
mmol – milimol
mTOR - *mammalian target of rapamycin*
MuRF1 - *muscle RING-finger protein-1*
N – newtons
NaF – fluoreto de sódio
NFκB - *factor nuclear kappa B*
nm – nanômetro
OCN - osteocalcina
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPG – Osteoprotegerina
PBS - phosphate buffered saline

p.c. – peso corporal
PDK1 - *phosphoinositide-dependent kinase 1*
pH – potencial hidrogeiônico
PI3K - *phosphoinositide 3-kinase*
PKB – proteína quinase B
PMSF - phenylmethylsulfonyl fluoride
PNX – grupo pinealectomizado
PNXEX - grupo pinealectomizado exercitado
POD – peroxidase
Po total (%) - porosidade total
RANK – *receptor activator of nuclear factor kappa-β*
RANKL - *receptor activator of nuclear factor kappa-β ligand*
REDD1 – *regulated in development and DNA damage response 1*
RIE - método radioimunológico
RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR - *Real Time Polymerase Chain Reaction*
RUNX-2 – *runt-related transcription factor 2*
S6K1 – *ribosomal protein S6 kinase beta-1*
SH2 – *Src homology 2*
SMI - índice do modelo de estrutura
SOL – sóleo
Tb.Th (mm) - espessura trabecular
Tb.N (mm-1) - número de trabéculas por milímetro de tecido
Tb.Sp (mm) - separação trabecular
TGFβ – fator de crescimento transformador beta
TNFα - *tumor necrosis factor-α*
TRAP - Fosfatase ácida tartarato-resistente
3D – tridimensional
4-AF - 4-amino fenazona
°C – graus celcius
μA – microampère

μg – microgramas

μUI – mili unidades internacionais

μm – micrômetros

BENITES, M. L. **Efeito do treinamento resistido sobre a sensibilidade à insulina, músculo esquelético e tecido ósseo em ratos pinealectomizados.** 2017. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - Sociedade Brasileira de Fisiologia - SBFIS, Araçatuba - SP, 2017.

RESUMO

Produzida pela glândula pineal exclusivamente em período noturno e na escuridão, a melatonina apresenta papel fundamental na sincronização dos ritmos circadianos com o ciclo claro-escuro do meio ambiente. A exposição à luz suprime a síntese e secreção de melatonina pela glândula pineal, podendo prejudicar a ação insulínica em células do músculo esquelético. O transporte ineficiente de glicose no músculo esquelético pode promover atrofia, geralmente acompanhada por perda de massa óssea. Resistência à insulina, atrofia muscular esquelética e perda de massa óssea são efeitos patológicos que podem ser prevenidos ou atenuados pela prática regular de exercícios físicos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do exercício resistido (ER) sobre a sensibilidade à insulina e manutenção da musculatura esquelética e tecido ósseo em ratos pinealectomizados. 40 ratos Wistar machos foram distribuídos, aleatória e igualmente, em 4 grupos: 1) controle (CNS); 2) exercitado (CNEX); 3) pinealectomizado (PNX) e 4) pinealectomizado exercitado (PNXEX). O ER foi realizado em escada, durante 8 semanas, 3 sessões semanais (em dias não consecutivos), 9 repetições por sessão e intervalo de tempo de 2 minutos entre as repetições. O teste de força máxima foi realizado a cada 2 semanas e a intensidade selecionada foi 60% de 1 repetição máxima (1RM). Após o período de treinamento, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina. Após o sacrifício, amostras de sangue foram coletadas para fosforilação da glicemia e insulinemia. A partir destes valores, a resistência à insulina foi calculada pelo índice HOMA-IR. O cálculo da área de secção transversa do *extensor digitorum longus* (EDL) foi realizado a partir da análise histológica, utilizando o *software* IMAGEJ. Também foram avaliadas a expressão gênica e fosforilação de proteínas presentes nas vias de manutenção do músculo esquelético: GLUT4, TNF- α , atrogin-1, MuRF1, IGF-1, Akt1, miostatina e SMAD2/3. O cálculo da área do trabeculado ósseo esponjoso inferiormente à linha epifisial da tíbia foi realizado a partir da análise histológica em cortes longitudinais, utilizando o *software* IMAGEJ. Os parâmetros morfológicos do tecido ósseo foram avaliados por micro-CT; a análise mineral óssea foi avaliada pelo Dual-energy X-ray absorptiometry – DEXA e análise mecânica foi avaliada pelo teste de três pontos. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância com 2 fatores - ANOVA *two way*, seguida pelo teste de Bonferroni, ao nível de significância de 5%. A pinealectomia

promoveu resistência à insulina e aumento na expressão de TNF- α em animais PNX. A prática de exercícios resistidos atuou na prevenção da resistência à insulina pelo aumento na expressão de GLUT4 em animais PNXEX. A pinealectomia também promoveu atrofia muscular esquelética nos grupos PNX e PNXEX. A prática de exercícios resistidos, realizada pelo período de tempo, frequência e intensidade selecionados, não foi suficiente para promover hipertrofia muscular no grupo CNEX ou prevenir a atrofia muscular no grupo PNXEX. Os grupos PNX e PNXEX apresentaram aumento da expressão gênica de miostatina e fosforilação proteica de SMAD2/3 em relação aos grupos CNS e CNEX. Não houve diferença na expressão gênica e fosforilação das demais proteínas analisadas entre os grupos estudados. Os resultados sugerem que a atrofia muscular esquelética, observada nos grupos PNX e PNXEX, está relacionada ao aumento na ativação da via da miostatina e, quem sabe, ao aumento de TNF- α em músculo esquelético. O aumento da DMO em animais PNX foi tomado como um mecanismo protetivo do osso. O exercício resistido promoveu melhora da qualidade óssea em animais pinealectomizados ou não. O presente estudo demonstrou que a prática regular de exercícios resistidos (60% de 1 RM) preveniu a resistência à insulina em animais pinealectomizados e melhorou a qualidade óssea em animais com e sem pineal. A partir desses resultados podemos aventar que o exercício físico, em trabalhadores noturnos, pode melhorar a sensibilidade à insulina e auxiliar na manutenção do tecido ósseo.

Palavras-chave: Fibra muscular. Melatonina. Resistência à insulina. Músculo esquelético. Osso e ossos.

BENITES, M. L. **Effect of resistance training on sensitivity to insulin, skeletal muscle and bone tissue in pinealectomized rats.** 2017. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - Sociedade Brasileira de Fisiologia - SBFiS, Araçatuba - SP, 2017.

ABSTRACT

Produced by the pineal gland exclusively at night time and in darkness, melatonin plays a key role in synchronizing circadian rhythms with the light dark cycle of the environment. Exposure to light suppresses the synthesis and secretion of melatonin by the pineal gland, and may impair insulin action in skeletal muscle cells. The inefficient transport of glucose in skeletal muscle can promote atrophy, usually accompanied by loss of bone mass. Insulin resistance, skeletal muscle atrophy and loss of bone mass are pathological effects that can be prevented or attenuated by regular physical exercise. The objective of the present study was to evaluate the effect of resistance exercise on insulin sensitivity and maintenance of skeletal muscle and bone tissue in pinealectomized rats. For this, 40 male Wistar rats were randomly and equally distributed in 4 groups: 1) control (CNS); 2) exercised (CNEX); 3) pinealectomized (PNX) and 4) pinealectomized exercised (PNXEX). Resistance training was performed on a ladder for 8 weeks, 3 weekly sessions (on non-consecutive days), 9 repetitions per session and 2 minutes interval between repetitions. The maximal strength test was performed every 2 weeks and the intensity selected was 60% of 1 maximal repetition (1RM). After the training period, the animals were submitted to the insulin tolerance test. After sacrifice, blood samples were collected for quantification of plasma glucose and insulin. From these values, insulin resistance was calculated by the HOMA-IR index. The calculation of the cross-sectional area of the extensor digitorum longus (EDL) was performed from the histological analysis using IMAGEJ software. Gene expression and phosphorylation of proteins present in skeletal muscle maintenance pathways were also evaluated: GLUT4, TNF- α , atrogin-1, MuRF1, IGF-1, Akt1, myostatin and SMAD2/3. The area of the spongy bone trabeculae inferior to the epiphyseal line of the tibia was calculated from the histological analysis in longitudinal sections using the IMAGEJ software. The morphological parameters of the bone tissue were evaluated by micro-CT; bone mineral analysis was assessed by Dual-energy X-ray absorptiometry - DEXA and mechanical analysis was assessed by the three-point test. Statistical analyzes were performed by analysis of variance with 2 factors - ANOVA two way, followed by the Bonferroni test, at a significance level of 5%. Pinealectomy promoted insulin resistance and increased TNF- α expression in PNX animals. The practice of resistance exercises was performed in the prevention of insulin resistance by the increase in GLUT4 expression in PNXEX animals. Pinealectomy also promoted skeletal muscle atrophy in the PNX and PNXEX groups. The practice of resistance exercises, performed for the selected period of time, frequency and intensity, was not enough

to promote muscle hypertrophy in the CNEX group or to prevent muscle atrophy in the PNEX group. The PNEX and PNEXEX groups showed increased myostatin gene expression and protein content of SMAD2/3 in relation to the CNS and CNEX groups. There was no difference in the gene expression and phosphorylation of the other proteins analyzed between the studied groups. The results suggest that skeletal muscle atrophy, observed in the PNEX and PNEXEX groups, is related to the increased activation of the myostatin pathway, and, perhaps, to the increase of TNF- α in skeletal muscle. The increase in BMD in PNEX animals was taken as a protective mechanism of bone. Resistance exercise promoted improvement of bone quality in pinealectomized animals or not. The present study demonstrated that the regular practice of resistance exercises (60% of 1 RM) prevented insulin resistance in pinealectomized animals and improved bone quality in animals with and without pineal. From these results we can point out that physical exercise, in night workers, can improve insulin sensitivity and aid in the maintenance of bone tissue.

Key words: Muscle fiber. Melatonin. Insulin resistance. Skeletal muscle. Bone and bones.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVO	36
4. HIPÓTESE.....	38
5. MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1. Animais.....	40
5.2. Pinealectomia.....	40
5.3. Avaliação do consumo de ração e evolução da massa corporal dos animais.....	41
5.4. Exercício físico	41
5.5. Teste de tolerância à insulina (ITT)	44
5.6. Coleta de sangue, tecido muscular e tecido ósseo	44
5.7. Concentrações plasmáticas.....	45
5.7.1. Glicose	45
5.7.2. Insulina	46
5.8. Análise da resistência à insulina.....	46
5.9. Histologia do tecido muscular esquelético	46
5.10. <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR) do tecido muscular esquelético	47
5.11. Extração proteica e <i>Western blotting</i>	48
5.12. Análise histológica de tecido ósseo.....	48
5.13. Método imunistoquímico para detecção de RUNX-2, OCN, OPG, RANKL e TRAP	48
5.14. Densidade mineral óssea	50
5.15. Ensaio mecânico.....	50
5.15.1. Flexão de três pontos da tíbia	51
5.16. Microtomografia computadorizada	51
5.17. Fluxograma metodológico.....	53
5.18. Análise Estatística.....	53
6. RESULTADOS	55

6.1. Parâmetros antropométricos	55
6.2. Capacidade máxima de geração de força voluntária	56
6.3. Teste de tolerância à insulina (ITT)	57
6.4. Teste de resistência à insulina.....	59
6.5. Expressão gênica de GLUT4 em tecido muscular esquelético	60
6.6. Expressão gênica de TNF- α em tecido muscular esquelético	60
6.7. Análise morfológica do tecido muscular esquelético	61
6.8. Expressão e fosforilação de proteínas associadas à perda de massa muscular esquelética .	64
6.9. Análise histológica de tecido ósseo.....	67
6.10. Padrão de imunomarcção	68
6.11. Parâmetros morfológicos do tecido ósseo (micro-CT).....	69
6.12. Análise mineral óssea (Dual-energy X-ray absorptiometry – DEXA).....	72
6.13. Análise mecânica (teste de três pontos).....	72
7. DISCUSSÃO	75
8. CONCLUSÃO	83
9. REFERÊNCIAS.....	85
10. ANEXOS	100
10.1. Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	100

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A crescente exposição humana à iluminação artificial durante a noite está estritamente relacionada ao aumento do número de trabalhadores noturnos contratados por fábricas e empresas com o objetivo de oferecer à sociedade moderna serviços 24 horas (ULHÔA et al., 2015). Atualmente, estima-se que, em países industrializados, 75% da força de trabalho total envolvam jornadas noturnas (TOUITOU et al., 2017). A inversão no ciclo claro-escuro em trabalhadores noturnos é preocupante, uma vez que a incidência de luz, em período noturno, suprime a produção de melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) pela glândula pineal (ULHÔA et al., 2015).

O processamento de informação da presença de luz tem início nas células ganglionares retinianas, as quais apresentam tanto fotopigmentos de criptocromo e melanopsina, quanto receptores de melatonina (ALOÉ et al., 2005). Ao interceptar estímulos luminosos, os fotopigmentos de criptocromo e melanopsina transmitem a informação para os núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos que, por sua vez, notificam estruturas anatômicas adjacentes, como, por exemplo, a glândula pineal (HOBSON; PACE-SCHOTT, 2002). Alcançando a pineal, a informação da captação de luz suprime a síntese de melatonina (TAN et al., 2003).

A produção exclusivamente noturna da melatonina pineal concede papel fundamental a essa glândula na sincronização dos ritmos circadianos com o ciclo claro-escuro do meio ambiente (REITER, 1991). Além da glândula pineal, outros órgãos também apresentam a maquinaria necessária para a produção de melatonina, dentre os quais destacam-se: retina, medula espinhal, intestino e pele (STEFULJ et al., 2001). Contudo, produzida em pequenas quantidades, a melatonina extrapineal não contribui, de maneira significativa, no ajuste dos relógios biológicos centrais (REITER, 1991).

A dessincronização dos ritmos circadianos, causada pela supressão na produção da melatonina pineal, está relacionada ao aumento nas chances de desenvolvimento de comportamentos de risco, como alcoolismo, tabagismo (BAE et al., 2017) e sedentarismo (COSTA, 2004), e diferentes patologias (ULHÔA et

al., 2015), como depressão (BAE et al., 2017), resistência à insulina (BUIJS et al., 2013, CIPOLLA-NETO et al., 2014, LEPROULT et al., 2014, ESQUIROL et al., 2012) e *diabetes mellitus* (DM) (ESQUIROL et al., 2009; PAN et al., 2011; IKA et al., 2013; GALE et al., 2011; BUXTON et al., 2012; YOUNG et al., 2013).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta a captação ineficiente de glicose como um dos principais fatores de risco para mortalidade prematura (WHO, 2009). Em 2015, aproximadamente 5 milhões de indivíduos, entre 20 e 79 anos de idade, morreram em decorrência de complicações (exemplo: doenças cardiovasculares, nefropatias e neuropatias) causadas pela diabetes. O dado equivale ao impressionante número de uma morte a cada 6 segundos em todo o mundo (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

O prejuízo na captação de glicose por células insulino-sensíveis, como hepatócitos, adipócitos, células renais, endoteliais, beta pancreáticas e musculares (GOLDSTAIN, 2002), pode ser causado tanto pela ineficácia na produção de insulina (diabetes tipo 1 – DM1), quanto pela resistência à mesma (diabetes tipo 2 – DM2) (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

Enquanto a DM1 resulta do ataque do sistema imune às células beta pancreáticas, produtoras de insulina (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015), a DM2 é, na maioria das vezes, consequência do excesso de peso corporal e inatividade física (WHO, 1994). Indivíduos portadores de DM1 atingem o controle glicêmico somente por meio de suplementação insulínica. Já, a população portadora de DM2 possui mais opções de tratamento para a regulação do índice glicêmico. Entre essas opções estão o uso de medicamentos, como a metformina e glicazida, o consumo de alimentos saudáveis e a prática regular de exercícios físicos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

O trabalho noturno e, conseqüentemente, a supressão na produção de melatonina pela glândula pineal, são apontados como fatores de risco inerentes no desenvolvimento de DM2 (MORIKAWA et al., 2005), resistência à insulina (KIWIMÄKI et al., 2011) e redução no controle da DM1 (YOUNG et al., 2013). Já, o tratamento com melatonina mostrou aumentar a captação de glicose no hipotálamo de ratos (ANHE et al., 2004), em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos

(PICINATO et al., 2008) e em células músculo-esqueléticas isoladas de camundongos (HA et al., 2006). Em todos os casos, essa melhora na captação de glicose deu-se pelo aumento na ativação da via de sinalização insulínica.

O mecanismo de transdução do sinal insulínico tem início na ligação da insulina ao seu receptor específico de membrana, o qual é composto por duas subunidades α , localizadas na porção extracelular, e duas subunidades β transmembrânicas. A ligação da insulina às subunidades α de seu receptor desencadeia autofosforilação em tirosina da subunidade β , conduzindo à fosforilação de diversos substratos proteicos em aminoácidos tirosina (PATTI; KAHN, 1998; PAULI et al., 2009).

A fosforilação das proteínas *insulin receptor substrate* (IRS) ativa sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios SH2, como a fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K) (CARVALHEIRA et al., 2002; PAULI et al., 2009). Uma das enzimas reguladas pela PI3K é a *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1), uma serina/treonina quinase que fosforila e ativa outra serina/treonina quinase denominada PKB ou Akt, promovendo a migração desta para a membrana celular (ZECCHIN et al., 2004).

No músculo esquelético, a Akt estimula a captação de glicose por meio da translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) do citoplasma para a membrana plasmática (WATSON; PESSIN, 2007; PAULI et al., 2009) (Figura 1). Essa glicose é posteriormente utilizada pelas células musculares esqueléticas como fonte de energia biológica (POWERS; HOLEY, 2004).

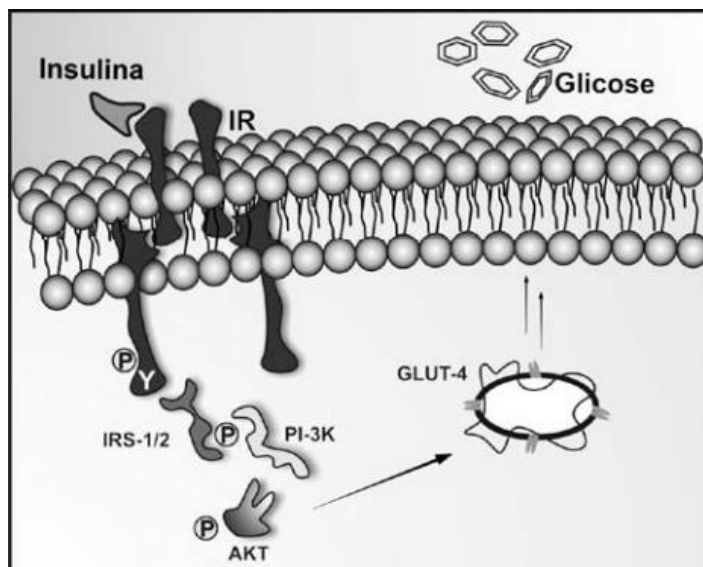


Figura 1 – Representação da via intracelular de sinalização insulínica.

FONTE: Pauli et al (2006).

Além de atuar no metabolismo de glicose, a Akt participa ativamente do processo hipertrófico do músculo esquelético. A Akt atua tanto no aumento da ativação da principal via de promoção de síntese proteica (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) → PI3K → Akt → *mammalian target of rapamycin* (mTOR) → S6K1) quanto na diminuição na ativação da principal via de inibição da degradação de proteínas (IGF-1 → PI3K → Akt ⊣ *fork head box* (FoxO) fosforilada) (SCHIAFFINO et al., 2013) [Figura 2]. A inibição da Akt sobre a forma fosforilada da FoxO impede a ativação das isoformas FoxO1, FoxO3 e FoxO4, as quais, por sua vez, são impedidas de ativar a *muscle RING-finger protein-1* (MuRF1) e a atrogin-1, principais proteínas ubiquitina quinases responsáveis pelo aumento na degradação proteica no músculo esquelético (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001) (Figura 2).

Apesar dos genes da MuRF1 e atrogin-1 serem considerados os melhores marcadores para atrofia muscular esquelética, estudos apontam que mais fatores estão associados à redução no tamanho das fibras musculares. São eles: *nuclear kappa B* – NFκB, glicocorticoides e miostatina (BONALDO; SANDRI, 2013) (Figura 2).

Os fatores de transcrição NFκB servem como mediadores dos efeitos das citocinas pró-inflamatórias, em especial do *tumor necrosis factor-α* (TNFα). Em estado de quiescência, o NFκB é raptado no citoplasma por proteínas inibitórias da família IκB. Em resposta ao TNFα, o complexo IκB quinase (IKKβ) fosforila a IκB, desencadeando ubiquitilação e degradação proteica. O fim do processo culmina na translocação nuclear do NFκB e ativação dos genes de transcrição mediados por ele (PETERSON et al., 2011). Importante destacar que a via da Akt é passível de supressão pela via do NFκB, o que pode promover, além de atrofia muscular, resistência à insulina (DE ALVARO et al., 2004) (Figura 2).

Altas concentrações de glicocorticoides são comuns em diferentes condições patológicas associadas à atrofia muscular esquelética (BONALDO; SANDRI, 2013). A via de sinalização dos glicocorticoides tem início na ligação desses com seus receptores e posterior ativação dos genes REDD1 e *krüppel-like factor 15* (KLF5) (SHIMIZU et al., 2011). Esses genes inibem a atividade da mTOR, conduzindo à diminuição do tamanho das fibras musculares. Além disso, o KLF5 participa de vias catabólicas paralelas que envolvem FoxO1, atrogin-1 e MuRF1 (BONALDO; SANDRI, 2013) (Figura 2).

A miostatina é membro da família TGFβ, sendo expressada e secretada, de forma majoritária, pelo músculo esquelético (BONALDO; SANDRI, 2013). O efeito negativo da miostatina sobre o crescimento muscular é mediado pelos fatores de transcrição Smad2 e Smad3 (LOKIREDDY et al., 2011; SARTORI et al., 2009; TRENDELENBURG et al., 2009). A via da miostatina também parece contribuir para a atrofia muscular, por meio da inibição da via IGF1-Akt-mTOR (AMIROUCHE et al., 2009; SARTORI et al., 2009; TRENDELENBURG et al., 2009) (Figura 2).

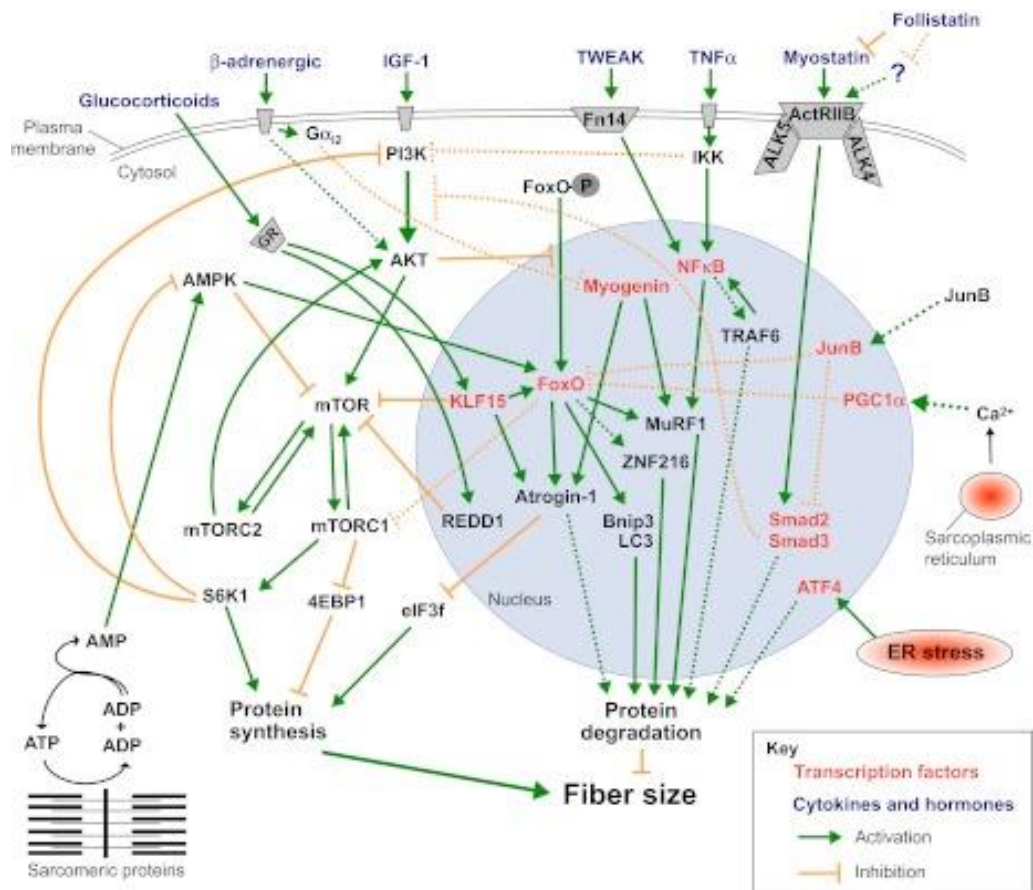


Figura 2 – Representação das principais vias que modulam o trofismo nas fibras musculares esqueléticas.

FONTE: Bonaldo; Sandri (2013).

Comumente, a atrofia muscular esquelética é prevenida e tratada pela prática regular de ER, que apresentam, dentre outros benefícios, a hipertrofia das fibras musculares (GREIG et al., 2011), a ativação de células satélites (KADI et al., 2004; OLSEN et al., 2006; PETRELLA et al., 2006) e o efeito anti-inflamatório (PETERSEN; PEDERSEN, 2005), sem contar o aumento na produção de força (GARCIA-PALLARS; IZQUIERDO, 2011), no tamanho do domínio mionuclear (GREIG et al., 2011), na síntese proteica (TANG et al., 2008) e na expressão de fatores de regulação miogênica (COSTA et al., 2007; KIM et al., 2005; SNIJDERS et al., 2009).

Curiosamente, a suplementação com melatonina apresentou-se eficaz na prevenção e combate à atrofia muscular esquelética. Ratos machos castrados, tratados diariamente (30 dias) com injeções subcutâneas contendo melatonina (6

mg/kg) apresentaram maior concentração de IGF-1 em células satélites e na periferia de miofibras do sóleo quando comparados aos animais castrados (ONER et al., 2008). A melatonina administrada via intraperitoneal (20 mg/kg), uma vez por dia, durante 10 dias, estimulou a síntese de IGF-1 e atenuou a inflamação no sóleo de ratos submetidos a treinamento extensivo (1 km/h de velocidade e 20% de inclinação) (BORGES et al., 2015). Ratos com frouxidão ligamentar no joelho, tratados com injeções subcutâneas de melatonina (10 mg/kg), 2 vezes ao dia, durante 4 semanas, apresentaram aceleração na remodelação do gastrocnêmio por inibição precoce de autofagia (HONG et al., 2014). A injeção intraperitoneal de melatonina (10 mg/kg), logo após lesão por esmagamento no sóleo e a cada 24 horas, por 2 semanas, apresentou efeito positivo na recuperação muscular por meio da inibição da apoptose, redução da inflamação e aumento no número de células satélite (STRATOS et al., 2012).

Geralmente, a atrofia muscular esquelética é acompanhada por perda de massa (RILEY; ESSER, 2017). A manutenção do tecido ósseo é modulada pelo balanço entre os processos de reabsorção e absorção óssea promovidos por osteoclastos e osteoblastos, respectivamente. O remodelamento ósseo tem início no recrutamento de células hematopoiéticas precursoras de osteoclastos. Os processos de maturação e ativação dos osteoclastos são mediados pela ligação entre o RANK, presentes na superfície de pré-osteoclastos e osteoclastos, e seu ligante (RANKL), secretado por osteoblastos. A degradação óssea ocorre pela secreção osteoclástica de enzimas, como a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Após realizarem sua função reabsortiva, os osteoclastos sofrem apoptose (KULAR et al., 2012) (Figura 3).

A formação óssea é iniciada pelo recrutamento de células tronco mesenquimais precursoras de osteoblastos. A expressão de RUNX-2 está envolvida na maturação e ativação dessas células. Os osteoblastos maduros produzem proteínas mineralizadoras, como a osteocalcina (OCN). A osteoprotegerina (OPG), também secretada por osteoblastos, atua na inibição da atividade osteoclástica, pelo raptio do RANKL e consequente bloqueio da ligação do RANKL com o RANK. O fim da atividade absorptiva dos osteoblastos pode

ocorrer pela apoptose celular ou pela diferenciação em células de revestimento ou osteócitos. Localizados na matriz óssea, os osteócitos atuam na transdução de estímulos mecânicos (ex: exercícios físicos) em sinais bioquímicos utilizados no recrutamento de osteoblastos e osteoclastos (KULAR et al., 2012) (Figura 3).

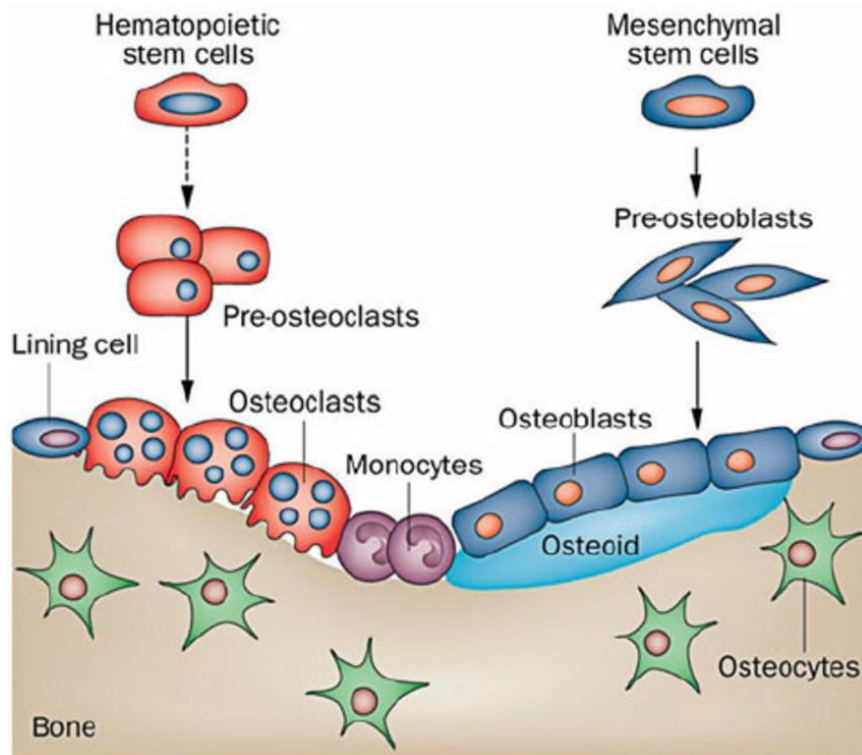


Figura 3 – Origens das células ósseas.

FONTE: Lian et al. (2012).

A prática de ER é amplamente utilizada na prevenção e tratamento de perda óssea. Estudos apontam que as contrações musculares promovem aumento tanto da massa quanto da força e formação óssea (NATOMI et al., 2000). A melatonina também demonstra agir positivamente sobre o reparo e remodelamento ósseo (LIU et al., 2013). Este hormônio apresentou potencial para ser utilizado na prevenção e tratamento de osteopenia, osteoporose e doença periodontal (CARDINALI et al., 2003). O efeito antioxidante da melatonina parece proteger o tecido ósseo contra os radicais livres gerados por osteoclastos, durante o processo de reabsorção óssea (LOPEZ-MARTINEZ et al., 2012; LADIZESKY et al., 2006; GOMEZ-MORENO et al., 2010). Além disso, animais suplementados

com melatonina apresentaram síntese aumentada da estimulação do colágeno tipo I (NAKADE et al., 1999), diferenciação e mineralização de osteoblastos (ROTH et al., 1999; SATOMURA et al., 2007; SETHI et al., 2010) e inibição da diferenciação de osteoclastos (KOYAMA et al., 2002).

Por outro lado, a remoção cirúrgica da glândula pineal (pinelectomia), e consequente redução na concentração hormonal de melatonina, provocou escoliose (OYAMA et al., 2006) e aumento nos marcadores de reabsorção óssea (OSTROWSKA et al., 2003) em roedores. Contudo, necessitam ser aprofundados estudos sobre os mecanismos envolvidos na perda de qualidade e massa óssea em animais pinelectomizados, assim como o efeito da pinelectomia sobre a manutenção da musculatura esquelética, e a eficácia do exercício resistido na prevenção e tratamento de possíveis danos teciduais.

Portanto, buscando contribuir com novos conhecimentos acerca da associação entre melatonina, ação insulínica, músculo esquelético, tecido ósseo e treinamento de força, o presente estudo avaliou o efeito do exercício resistido sobre a sensibilidade à insulina e manutenção do tecido muscular esquelético e ósseo em ratos pinelectomizados.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A incidência de luz em período noturno suprime a síntese e secreção de melatonina pela glândula pineal (ULHÔA et al., 2015). A total inversão do ciclo claro-escuro, como observada em trabalhadores noturnos, pode afetar, a curto prazo, a tomada de decisões e a vigilância, aumentando a exposição a acidentes de trabalho (WAGSTAFF; SIGSTAD, 2011). A longo prazo, os trabalhadores noturnos apresentam chances aumentadas para o desenvolvimento de câncer (LIN et al., 2015), obesidade (VAN DRONGELEN et al., 2011) e diabetes (GAN et al., 2015).

Principal característica da DM2, a resistência à insulina prejudica a captação de glicose por células insulino-sensíveis, como as células do músculo esquelético (GOLDSTAIN, 2002), podendo causar atrofia (BIANCHI; VOLPATO, 2016), geralmente acompanhada por perda de massa óssea (RILEY; ESSER, 2017). Além disso, a hiperglicemia aumenta a concentração de proteínas e lipídios glicosados, denominados produtos finais de glicação avançada (AGEs), e de homocisteína, prejudicando as funções de osteoblastos e osteócitos, resultando em fragilidade óssea pela diminuição de formação e remodelamento ósseo (KANAZAWA, 2017).

Tanto a resistência à insulina, quanto a atrofia muscular esquelética e a perda de massa óssea podem ser prevenidas ou tratadas pela prática de exercícios resistidos (GARCIA-PALLARS; IZQUIERDO, 2011; GREIG et al., 2011; TANG et al., 2008; COSTA et al., 2007; KIM et al., 2005; SNIJDERS et al., 2009; PETERSEN; PEDERSEN, 2005; MENKES et al., 1993). A prática de exercícios resistidos pode prevenir e tratar, de forma não-farmacológica, possível redução na qualidade de vida de trabalhadores noturnos, causada pela supressão na produção de melatonina pela glândula pineal. Pesquisas relacionadas à manutenção ou melhora da qualidade de vida de trabalhadores noturnos tornam-se especialmente importantes, se considerarmos a crescente contratação desses trabalhadores pelo mercado de trabalho (ULHOA et al., 2015) e os riscos iminentes à saúde aos quais eles são expostos.

Objetivo

3. OBJETIVO

Avaliar o efeito do exercício resistido sobre a sensibilidade à insulina, músculo esquelético e tecido ósseo em ratos pinealectomizados.

Hipòtese

4. HIPÓTESE

Espera-se que o ER seja capaz de prevenir os danos causados pela pinealectomia na sensibilidade à insulina e manutenção do músculo esquelético e tecido ósseo.

Materiais e Métodos

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Todos os procedimentos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisas Animais (Processo nº 2014-00939) (Anexo 1). Quarenta ratos (*Rattus norvegicus*), machos, da linhagem Wistar, foram mantidos em ambiente controlado (ciclo claro escuro 12/12 horas, com início do período claro às 7 horas da manhã e temperatura entre 21°C ± 2°C) por cerca de 4 meses. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em 4 grupos: 1) controle (CNS) (n=10); 2) controle exercitado (CNEX) (n=10); 3) pinealectomizado (PNX) (n=10) e 4) pinealectomizado exercitado (PNXEX) (n=10). Os ratos tiveram acesso à comida e água *ad libitum*.

5.2. Pinealectomia

A pinealectomia foi realizada com objetivo de suprimir, de maneira completa e efetiva, a síntese e secreção de melatonina pela glândula pineal. O procedimento cirúrgico foi iniciado pela anestesia dos animais dos grupos PNX e PNXEX, aos 40 dias de vida, sob jejum de 14 horas, com cloridrato de ketamina (80 mg/Kg/i.m.) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg). Após a anestesia, foi realizada tricotomia no topo da cabeça dos animais, os quais, posteriormente, foram fixados em aparelho estereotáxico. O escalpo foi realizado sagitalmente (Figura 4a) e, após abertura da musculatura e fáscias que recobrem a parte superior do crânio, uma marcação a lápis (Figura 4b) seguida por uma abertura circular por broca especializada foram realizadas na sutura lambdoidea do crânio. Com auxílio de um alicate, a peça óssea foi retirada, expondo a superfície cerebral. Com uso de uma pinça cirúrgica, a glândula pineal foi retirada (Figura 4c e 4d). Após hemostasia, a peça óssea foi recolocada no lugar de origem (Figura 4e) e o escalpo foi suturado (Figura 4f) (MAGANHIN et al., 2009). A recuperação pós-cirúrgica durou 2 semanas.

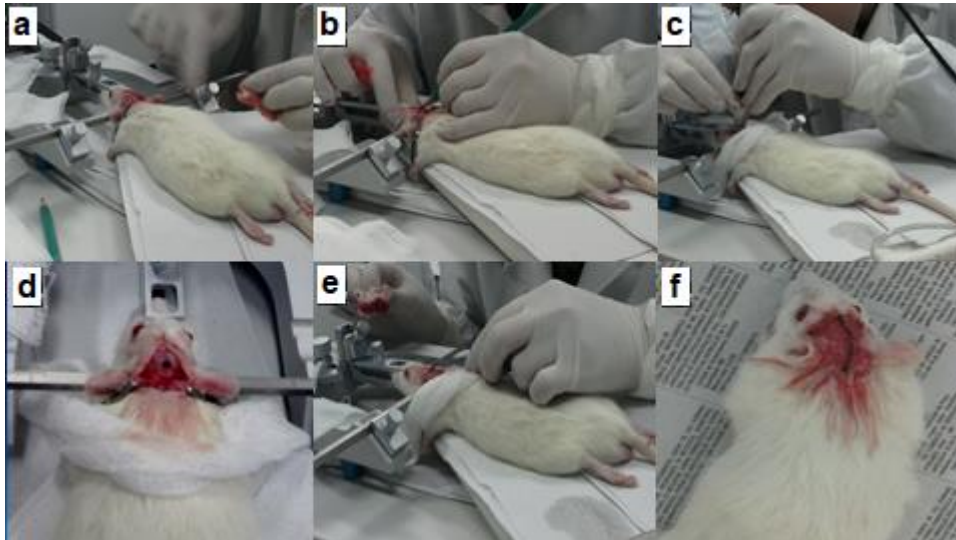


Figura 4 – Pinealectomia. (a) Escalpo sagital em animal fixado em aparelho estereotático; (b) Marcação a lápis para abertura craniana; (c) Retirada da glândula pineal; (d) Animal pinealectomizado; (e) Recolocação da peça óssea em seu lugar de origem; (f) Escalpo suturado.

5.3. Avaliação do consumo de ração e evolução da massa corporal dos animais

O consumo de ração e o peso corporal foram avaliados 3 vezes por semana, em dias alternados, desde a chegada dos animais ao biotério até o sacrifício dos mesmos. Para o cálculo do consumo de ração, uma média semanal foi extraída considerando a diferença entre a quantidade de ração oferecida e a quantidade de sobra. Para o peso corporal, houve comparação entre as médias semanais de cada grupo.

5.4. Exercício Físico

O programa orientado de ER em escada (Figura 5a) foi adaptado do programa proposto por Hornberger e Farrar (2004). As principais adaptações englobaram a frequência e intensidade dos exercícios. No estudo de Hornberger e Farrar (2004), as sessões de treinamento ocorriam de 3 em 3 dias. Os animais eram submetidos ao teste de 1 repetição máxima (1RM) em todas as sessões. Na primeira repetição de cada sessão, os animais carregavam metade da sobrecarga máxima alcançada no teste de 1RM. A sobrecarga na segunda repetição era

equivalente a 75% de 1RM, na terceira era 90% de 1RM e na quarta era 100% de 1RM. A partir da quinta repetição, 30g eram acrescentados a cada repetição, até que os animais completassem 9 repetições. As caudas dos animais eram eletrocutadas no intuito de incentivar o movimento de escalada. No presente estudo, o uso de choque foi banido. Os testes de 1RM eram realizados a cada 2 semanas e a sobrecarga utilizada permaneceu fixa em 60% de 1RM. A intensidade da sobrecarga foi selecionada com base na melhora da sensibilidade à insulina verificada em indivíduos diabéticos praticantes de ER em intensidade moderada (de 50 a 74% de 1RM) (SIGAL *et al.*, 2004).

Portanto, no presente estudo, após 2 semanas de recuperação da pinealectomia, os animais dos grupos CNS, CNEX, PNX e PNEX foram adaptados ao programa de treinamento, a fim de que fossem capazes de realizar o teste de força máxima. Também houve adaptação a um aparato, composto por um tubo falcon, que foi acoplado à parte proximal da cauda dos animais com fita adesiva. Este aparato foi utilizado posteriormente, durante o período de treinamento, para deposição de peso (Figura 5b).

O período de adaptação foi de 2 semanas, durante as quais os animais realizaram de 4 a 9 subidas em escada. Foram realizadas 3 sessões de exercício por semana, em dias não consecutivos, totalizando 6 sessões de adaptação. Na primeira semana, os animais foram submetidos somente à escalada da escada, sem a utilização de qualquer aparato ou peso. Na segunda semana, utilizou-se o aparato, sem deposição de peso, acoplado às caudas dos ratos. Ao fim das 2 semanas, os animais deveriam conseguir realizar 3 subidas consecutivas.

Considerando o hábito noturno de ratos, as sessões de adaptação, assim como as sessões de ER e os testes de força máxima, foram realizados à noite. A escada utilizada possuía as seguintes dimensões: 1,13 x 0,18 m, 2 cm de espaço entre os degraus e 80° de inclinação (HORNBERGER; FARRAR, 2004) (Figura 5a). No topo da escada localizava-se um local (casa), com diâmetro de 20 x 20 x 20 cm, onde ocorria o descanso entre as subidas dos animais (HORNBERGER; FARRAR, 2004) (Figura 5a).

Após o período de adaptação, houve a determinação da força máxima por meio de um teste. O primeiro teste foi realizado pelos animais dos grupos CNS, CNEX, PNX e PNXEX. Os animais dos grupos CNEX e PNXEX repetiram o teste a cada 2 semanas, devido à adaptação dos sistemas orgânicos ao treinamento. Os animais dos grupos CNS e PNX repetiram o teste somente ao final das 8 semanas de ER.

Na primeira subida, durante o teste de força máxima, o peso das esferas de aço depositado no aparato foi referente a 75% do peso do animal. Caso a primeira subida fosse completada com sucesso, um peso adicional de 30 gramas era acoplado ao peso inicial. Esse procedimento foi repetido até que o animal não conseguisse realizar uma subida completa. O peso total das esferas de aço correspondeu à carga máxima carregada pelo animal. O tempo de intervalo entre as subidas foi de 120 segundos.

O período de treinamento durou 8 semanas, com realização de 3 sessões semanais. Os animais subiram a escada de 4 a 9 vezes. O objetivo sempre foi realizar 9 repetições. O tempo de intervalo entre uma repetição e outra foi 120 segundos. Os animais realizaram o programa orientado de ER com sobrecarga referente a 60% de 1RM. A sobrecarga foi depositada no aparato acoplado às caudas dos animais.

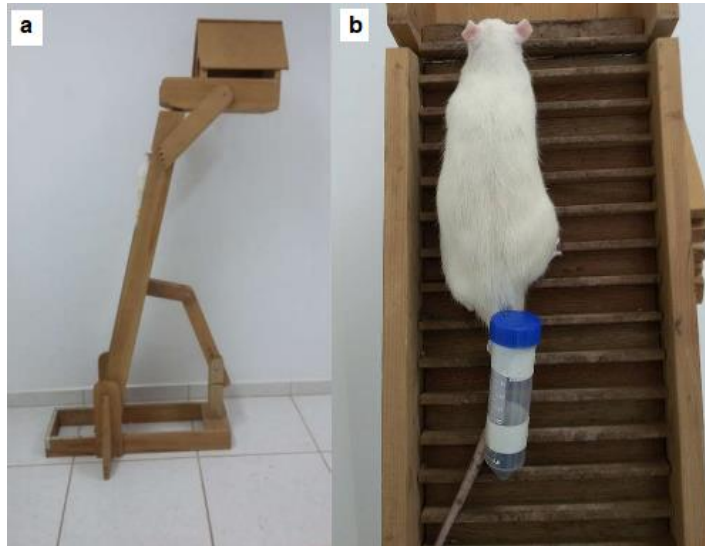


Figura 5 – Exercício resistido realizado em escada pelos animais exercitados (CNEX) e pinealectomizados/exercitados (PNXEX). (a) Escada utilizada para prática de exercício resistido; (b) Animal em treinamento.

5.5. Teste de tolerância à insulina (ITT)

Os testes foram realizados pela manhã, durante a última semana de treinamento, em um dia em que os animais não realizaram exercício físico, após jejum de 14 horas. Os animais foram submetidos a uma injeção de insulina (0,75 U/kg p.c., i.p.). Amostras de sangue foram colhidas, por meio de uma pequena secção na cauda, antes da injeção hormonal e após 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos da injeção. A glicemia foi mensurada por um monitor (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics - Mannheim, Germany). A velocidade de desaparecimento da glicose (K_{itt}) foi calculada pela fórmula: $\ln/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose (BONORA *et al.*, 1989).

5.6. Coleta de sangue, tecido muscular e tecido ósseo

Após 24 horas da última sessão de exercícios para os animais CNEX e PNXEX, os procedimentos de coleta foram iniciados. Sob anestesia com tiopental sódico (Thiopentax® 3%, 5mg/100g p.c., i.p.), uma laparotomia mediana foi

realizada para coleta de sangue, pela veia cava inferior. As amostras foram transferidas para tubos de plástico heparinizados e mantidas a 4°C até a centrifugação (800g; 4°C; 15 min). O plasma foi armazenado a -80°C até o dia da fosforilação das concentrações plasmáticas de glicose e insulina.

Também foram retirados os músculos *extensor digitorum longus* (EDL) e as tíbias de forma bilateral. O músculo EDL foi escolhido para análises devido a prevalência de fibras do tipo IIB, caracterizadas pela importante atuação na produção de força e pouca atuação em exercícios de *endurance* (CORNACHIONE et al., 2011). Os músculos do membro inferior esquerdo dos animais foram pesados imediatamente após a coleta, congelados em isopentano previamente resfriado em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C para posteriores análises morfológicas. Os músculos do membro inferior direito foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados no freezer -80°C para posterior fosforilação proteica e expressão de RNAm. As tíbias do membro inferior esquerdo dos animais foram armazenadas em salina a 0,9% para análises da densidade mineral óssea, força máxima, rigidez óssea, energia absorvida até a força máxima e arquitetura óssea. As tíbias do membro inferior direito dos animais foram armazenadas em formalina tamponada a 4%, sendo posteriormente utilizadas para análises histológicas e imunohistoquímicas.

5.7. Concentrações plasmáticas

5.7.1. Glicose

Foi utilizado o método de glicose-oxidase, um método enzimático específico, para fosforilação de glicose (Analisa Diagnóstica, São Paulo, Brasil). Nesse método, a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase (GOD) gerando ácido glucônico e água oxigenada. A H₂O₂, em presença de peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-amino fenazona (4-AF), dando

origem a um cromógeno com máximo de absorção em 505nm de comprimento de onda. Foram consideradas as seguintes reações resumidas:

glicose + O₂ + H₂O a ácido glucônico + H₂O₂

H₂O₂ + 4-AF + fenol a 4 (p-benzoquinona monoimino) fenazona + 4 H₂O.

5.7.2. Insulina

A insulinemia foi quantificada pelo método radioimunológico – RIE (Sensitive Rat Insulin, SRI-13K, Millipore, St Charles, MO, EUA) que, em resumo, refere-se a uma reação de competição entre antígenos (insulina fria e insulina marcada) para ligação a um anticorpo específico. Essa reação obedece à lei da ação de massas. Portanto, quanto mais insulina fria estiver presente, mais será formado o complexo insulina fria-anticorpo, acarretando queda na quantidade de complexo insulina marcada-anticorpo.

5.8. Análise da resistência à insulina

A resistência à insulina foi avaliada pelo índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance / Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina), calculado a partir da seguinte fórmula: HOMA - IR = glicemia de jejum (mmol/L) X insulinemia de jejum (μUI/ml)/22,5) (LIMA, *et al.*, 1998).

5.9. Histologia do tecido muscular esquelético

Foram realizados cortes histológicos transversais de 7 μm de espessura em criostato a -20°C (Leica CM1850, Leica Biosystems, Wetzlar, HE, Germany) do músculo EDL. Após realização da coloração com hematoxilina e eosina (H&E), imagens foram capturadas por uma máquina fotográfica acoplada a um microscópio (Leica DM400 B LED Wetzlar, HE, Germany) para análise da área de secção transversa das fibras musculares.

5.10. *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) do tecido muscular esquelético

Para obtenção do RNAm, parte do músculo EDL foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado com auxílio do tissue lyser (QIAGEN) utilizando TriReagent™ (Sigma), conforme descrição do fabricante. Após utilização de clorofórmio, isopropanolol e álcool a 75%, os pellets foram ressuspensos com água nuclease free e armazenados em freezer -80°C . Para leitura de RNAm, as amostras foram diluídas em água bidestilada na proporção 1:50. Após a leitura, a integridade do RNAm foi verificada por meio de uma corrida (70 mV) em gel de agarose. Para a síntese de cDNA, 1.0 μg do RNA total foi submetido à transcrição reversa usando um kit (QuantiTect Reverse Transcription kit - Qiagen). A análise de RNAm foi realizada no ABI PRISM 7500 SDS (Applied Biosystems), com utilização de SYBR Green (Applied Biosystems) para Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (#Rn01462661_g1), GLUT4 (#Rn00562597_m1), TNF- α (#Rn01525859_g1), atrogin-1 (#Rn00591730_m1), muscle RING-finger protein 1 - MuRF1 (#Rn01639111_m1), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (#Rn99999087_m1) e miostatina (#Rn01437895_m1). A relação expressiva foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

5.11. Extração proteica e *Western blotting*

Parte do músculo EDL foi homogeneizada em tampão de extração [Tris-HCl, pH 7.5/20 mm, EDTA/2 mm, EGTA/2 mm, sucrose/250 mm, DTT/5 mm, Triton-X/0.1%, PMSF/1 mm, NaF/10 mm, SOV4/0.2 mm, *cocktail protease inhibitors*/1X (Sigma)]. Na membrana foram utilizados anticorpos contra: Akt1 (*Cell Signaling*, 1:250), Akt1 fosforilada (Thr308) (Sigma, 1:250), SMAD 2/3 (BD, 1:250), SMAD 2/3 fosforilada (Ser 423/425) (Santa Cruz, 1:250) e Tubulina (*Cell Signaling*, 1:800). As bandas foram capturadas pelo *ChemiDoc-It® Imaging System* (UVP, LLC) e as análises densitométricas foram realizadas pelo *VisionWorks®LS Image Acquisition and Analysis Software* (PELOSI et al., 20015).

5.12. Análise histológica de tecido ósseo

As tíbias foram fixadas em formaldeído 4% (SIGMA, EUA) diluído em tampão fosfato-salino (PBS, Sigma, EUA), 0,1 M, 4 ° C, pH 7,4, durante 24 horas, em temperatura ambiente. A descalcificação foi realizada em 10% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, pH 7,4), por aproximadamente 3 meses, e as amostras foram rotineiramente processadas, incluídas em parafina e seccionadas longitudinalmente (5 µm de espessura), utilizando micrótomo convencional (LEICA, SR2000) e coradas com hematoxilina de Harris e eosina (H&E). Três secções equidistantes do centro da tíbia de cada amostra foram selecionadas por um investigador cego e a região abaixo (1mm) da placa de crescimento na epífise proximal foi capturada por câmera digital (AxioCam® Carl Zeiss, Alemanha) acoplada a um microscópio (AxioLab® Carl Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 10x. A área total ocupada pelo tecido esponjoso foi mensurada em uma área de 1090 µm × 1450 µm com auxílio ImageJ (National Institutes of Health, NIMH)

5.13. Método imunistoquímico para detecção de RUNX-2, OCN, OPG, RANKL e TRAP

Para a análise imunoistoquímica, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 90° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C, por 20 minutos. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente.

As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em 5 lotes, cada um dos quais foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-RUNX-2 do rato gerado em coelho (SC-10758, Santa Cruz Biotechnology®), anti-OCN do rato gerado em cabra (SC-18319; Santa Cruz Biotechnology®), anti-OPG do rato gerado em cabra (SC-8468, Santa Cruz Biotechnology®), anti-RANKL do rato gerado em cabra (SC-7628, Santa Cruz Biotechnology®), e anti-TRAP do rato gerado em cabra (SC-30833; Santa Cruz Biotechnology®).

Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado por 2 horas e, subsequentemente, tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte – HRP, por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA).

As revelações foram realizadas utilizando como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). Foi realizada a contracoloração com *Fast green*, para RUNX-2 e com Hematoxilina de Harris, para OCN, OPG, RANKL e TRAP, e em seguida a desidratação em etanol, diafanização em xilol, e recobrimento com meio de montagem (Permount, Fisher Scientific, San Diego, CA, USA) e lamínulas de vidro. Como controle negativo, as amostras foram submetidas aos procedimentos descritos anteriormente, suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

A análise imunoistoquímica foi realizada por um histologista certificado e cego aos tratamentos realizados. Foi efetuada uma análise semi-quantitativa utilizando-se de 1 secção histológica de cada animal, no aumento original de 400x. Ao padrão de imunomarcção foi atribuído um escore. O critério adotado para o estabelecimento dos escores foi baseado e modificado daqueles estabelecidos por Faria et al. (2008), onde: ESCORE 0 = ausência de imunomarcção; ESCORE 1 = baixo padrão de imunomarcção; ESCORE 2 = moderado padrão de imunomarcção; ESCORE 3 = alto padrão de imunomarcção.

5.14. Densidade mineral óssea

As tíbias foram colocadas sobre o densitômetro e submetidas à análise da densidade mineral óssea – DMO (g/cm^2), área (cm^2) e conteúdo mineral ósseo – CMO (g). A DMO foi mensurada pelo densitômetro de dupla emissão de raios-X (DXA), previamente calibrado conforme fabricante (modelo DPX-Alpha, Lunar® WI, USA), com software especial para pequenos animais acoplado a um computador.

5.15. Ensaio mecânico

As tíbias de todos os animais foram submetidas a ensaio mecânico, em máquina universal EMICâ, modelo DL 3000. A carga foi aplicada com velocidade de 2 mm/min e aplicação da força de 2000N, para determinação da força máxima e determinação posterior da rigidez óssea (N/mm) e energia absorvida até a força máxima (mJ), que foram calculadas a partir da curva obtida no ensaio. Os resultados foram registrados em sistema computacional pertencente ao próprio equipamento que fornece os valores de força x deformação. Para o cálculo da rigidez, foi determinada a parte da curva de força x deformação relativa à fase

elástica do ensaio. A energia absorvida pelo osso foi obtida pela área sob a curva força x deformação até o ponto de força máxima (TURNER; BURR, 1993).

5.15.1. Flexão de três pontos da tíbia

As tíbias foram apoiadas em dois suportes (dois pontos), com distância de vão de apoio de 20 mm. A força foi aplicada nos ossos em um terceiro ponto, no meio geométrico entre os dois apoios (ensaio de flexão em três pontos) (TURNER; BURR, 1993).

5.16. Microtomografia computadorizada

As tíbias foram submetidas à avaliação tridimensional não destrutiva da arquitetura óssea, realizada por microtomógrafo computadorizado Skyscan 1174 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica). Todas as peças foram conduzidas com filtro de alumínio 0.5mm, 185° de rotação, 0.4° de passo, 50 kV e 800 µA de configuração da fonte. As tíbias foram posicionadas craniocaudalmente para a obtenção das fatias, com resolução de 16µm e 14 µm, respectivamente. A região de interesse de osso trabecular da tíbia foi manualmente interpolada e foram analisadas 50 fatias na metáfise proximal da tíbia, 100 fatias abaixo da faixa de crescimento. A região de interesse do osso cortical da tíbia foi manualmente interpolada e foram analisadas 50 fatias na diáfise tibial, 350 fatias abaixo da faixa de crescimento.

Cada peça foi reconstruída usando o software que acompanha o Skyscan (NRECON;Skyscan) e, para a análise tridimensional (3D), foi utilizado o software CTAn v.1.5.0 (Skyscan). Os parâmetros analisados no osso trabecular foram: fração de volume ósseo (BV/TV - %); número de trabéculas (Tb.N - mm⁻¹); espessura trabecular (Tb.Th - mm); conectividade

trabecular (Tb.Pf); índice de modelo estrutural (SMI) e separação trabecular (Tb.Sp - mm). A BV/TV equivale ao volume ósseo da amostra sobre o volume total da amostra; o Tb.N equivale ao número de trabéculas por unidade de comprimento; a Tb.Th equivale à espessura das trabéculas; a Tb.Pf equivale à conexão da estrutura trabecular; a SMI indica a predominância de placas ou bastonetes na estrutura trabecular; e a Tb.Sp equivale à espessura das cavidades contendo medula óssea (BOUXSEIN et al., 2010; DA SILVA, 2008).

5.17. Fluxograma metodológico

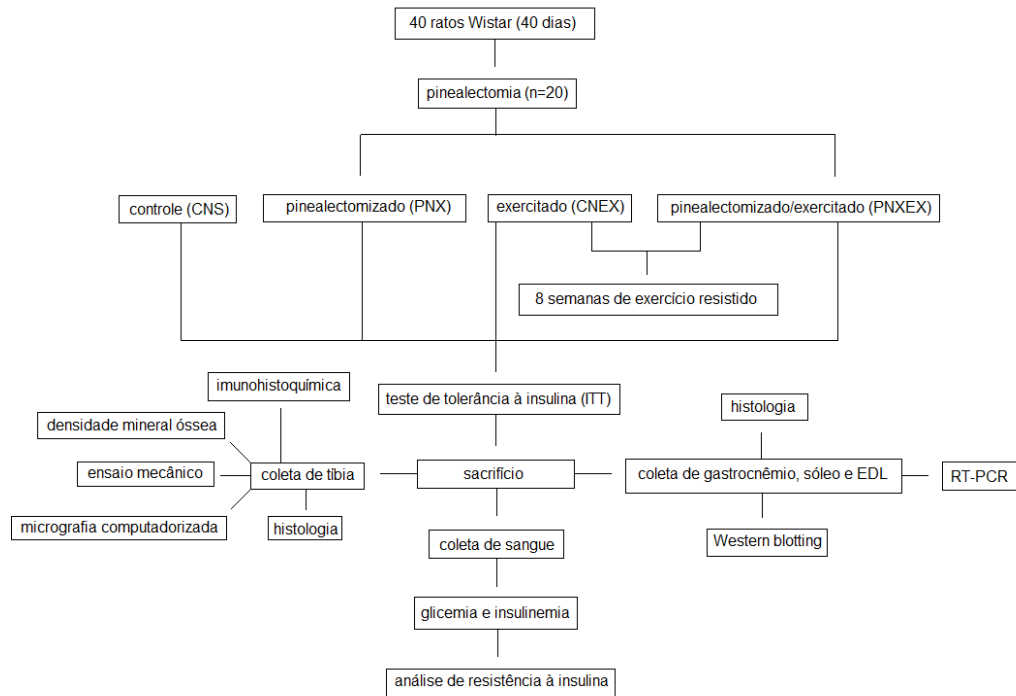


Figura 6 - Fluxograma da metodologia.

5.18. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância com 2 fatores - ANOVA two way (pinealectomia e exercício resistido), seguida pelo teste de Bonferroni. Nas análises de expressão de RNAm de GAPDH, atrogin-1, MuRF1, IGF-1 e miostatina foi utilizado o teste t de *student*. O mesmo teste foi utilizado nas análises de fosforilação proteica de tubulina, Akt1 e SMAD 2/3. Todos os valores foram apresentados como média \pm EPM. O nível de significância adotado foi, pelo menos, $p < 0,05$.

Resultados

6. RESULTADOS

6.1. Parâmetros antropométricos

Os animais CNEX e PNX apresentaram diminuição significativa no peso corporal final quando comparados aos animais do grupo CNS ($p < 0,001$). Os animais PNXEX também apresentaram redução significativa no peso corporal em relação aos animais CNS ($p < 0,0001$) e aumento significativo no peso absoluto e relativo do osso quando comparados aos animais CNS e PNX ($p < 0,0001$). Os animais CNEX apresentaram aumento significativo para peso absoluto e relativo do osso quando comparados aos animais CNS e PNX ($p < 0,0001$). Não houve diferenças significativas para peso corporal final CNEX vs. PNX, CNEX vs. PNXEX e PNX vs. PNXEX ($p < 0,05$). Também não houve diferenças significativas para peso absoluto e relativo do osso entre os grupos CNS vs. PNX e CNEX vs. PNXEX ($p < 0,05$). Por fim, não houve diferenças significativas entre os grupos CNS, CNEX, PNX e PNXEX para peso inicial, ingestão alimentar, peso absoluto e peso relativo dos músculos *extensor digitorum longus* (EDL), gastrocnêmio (GAS) e sóleo (SOL) e peso absoluto e relativo dos tecidos adiposos branco periepididimal (TABP) e retroperitoneal (TABR) ($p < 0,05$).

Tabela 1 – Parâmetros antropométricos dos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX).

	CNS	CNEX	PNX	PNXEX
Peso corporal inicial (g)	261,75±33,82	268,75±25,30	270,42±22,22	268,92±21,47
Peso corporal final (g)	492,00±48,42	425,83±34,00***	415,83±39,84***	404,50±30,64****
Ingestão alimentar (g)	68,48±3,97	72,58±5,24	71,64±5,07	71,28±4,14
Peso absoluto GAS (g)	2,63±0,27	2,78±0,30	2,62±0,17	2,73±0,26
Peso relativo GAS (g)	0,52±0,04	0,53±0,03	0,50±0,04	0,54±0,02
Peso absoluto EDL (g)	0,22±0,03	0,24±0,03	0,22±0,04	0,24±0,02
Peso relativo EDL (g)	0,04±0,01	0,05±0,01	0,04±0,00	0,05±0,01
Peso absoluto SOL (g)	0,24±0,03	0,25±0,06	0,2v 5±0,04	0,26±0,05
Peso relativo SOL (g)	0,05±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01
Peso absoluto TABP (g)	6,87±1,38	7,65±2,09	8,37±3,26	6,37±1,69
Peso relativo TABP (g)	1,26±0,45	1,56±0,39	1,68±0,57	1,29±0,30
Peso absoluto TABR (g)	8,26±1,81	7,03±1,68	7,33±2,53	5,68±0,94
Peso relativo TABR (g)	1,64±0,23	1,37±0,32	1,53±0,55	1,19±0,25
Peso seco absoluto tibia (g)	0,56±0,06	0,92±0,14****	0,55±0,08	0,95±0,14****
Peso seco relativo tibia (g)	0,11±0,01	0,17±0,02****	0,12±0,01	0,21±0,08****

Valores expressos como média ± EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n=10 (**p<0,001 vs. CNS; ****p<0,0001 CNS vs. PNXEX; CNS vs. CNEX; PNX vs. CNEX; PNX vs. PNXEX;).

6.2. Capacidade máxima de geração de força voluntária

A figura 7 representa a capacidade máxima de geração de força voluntária (CMGFV) dos grupos CNS, CNEX, PNX e PNXEX. Houve diferença significativa entre os grupos CNS vs. CNEX, PNX vs. PNXEX, CNS vs. PNXEX e CNEX vs. PNX (p<0,0001). Não houve diferença significativa entre os grupos CNS vs. PNX e

CNEX vs. PNEX (p<0,05). Os resultados demonstram a eficácia da prática de exercício resistido no aumento de força muscular.

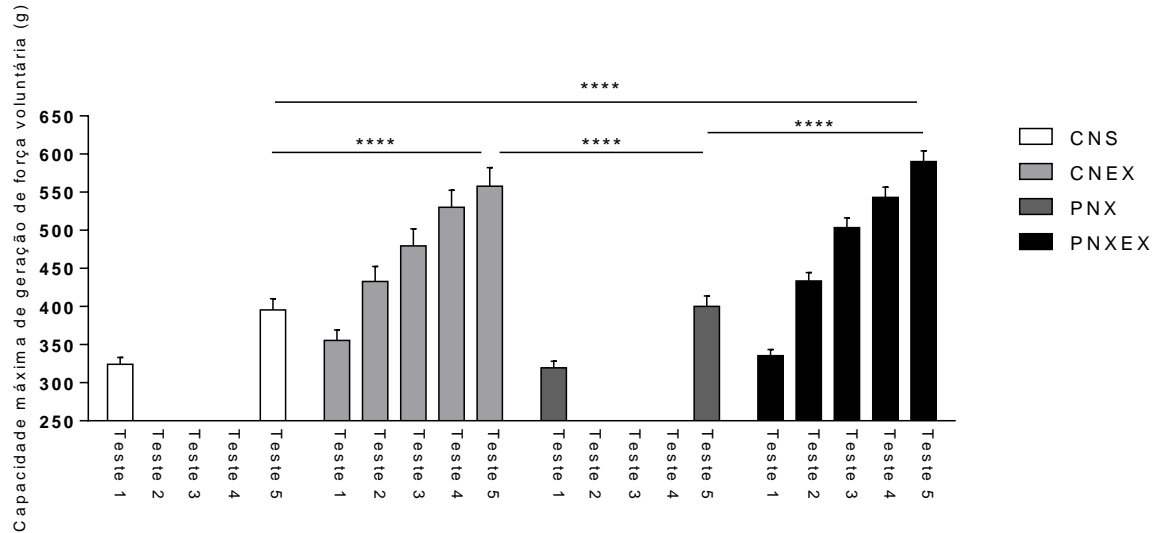


Figura 7 – Capacidade máxima de geração de força voluntária nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNEXEX). Valores expressos como média ± EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n=10 (****p<0,0001 CNS vs. CNEX; PNX vs. PNEXEX; CNS vs. PNEXEX; CNEX vs. PNX).

6.3. Teste de tolerância à insulina (ITT)

Na figura 8, estão representados os valores de glicemia dos animais dos grupos CNS, CNEX, PNX e PNEXEX nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após administração de insulina. No tempo 0 houve diferenças significativas entre os grupos: CNS vs. PNX (p<0,001), CNS vs. PNEXEX (p<0,01) e CNEX vs. PNX (p<0,01). No tempo 5 houve diferença significativa entre os grupos CNS vs. PNX (p<0,05). No tempo 10 houve diferenças significativas entre os grupos: CNS vs. PNX (p<0,01), PNX vs. PNEXEX (p<0,05) e CNEX vs. PNX (p<0,01). No tempo 15 houve diferenças significativas entre os grupos: CNS vs. PNX (p<0,05) e PNX vs. PNEXEX (p<0,01). No tempo 20 houve diferença significativa entre os grupos CNEX vs. PNX (p<0,01). Nos tempos 25 e 30 não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CNS, CNEX, PNX e PNEXEX (p<0,05) (Figura 8a). Para a área abaixo da curva de glicemia no ITT, os

animais PNX apresentaram aumento em relação aos animais CNS e CNEX ($p < 0,001$), e os animais PNEX apresentaram diminuição quando comparados aos animais PNX ($p < 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas para a área abaixo da curva de glicemia no ITT entre os grupos CNS vs. CNEX, CNS vs. PNEX e CNEX vs. PNEX ($p < 0,05$) (Figura 8b). O Kitt não apresentou diferenças significativas entre os grupos CNS, CNEX, PNEX e PNEX ($p < 0,05$) (Figura 8c). Os resultados demonstram o efeito do ER na prevenção da resistência à insulina causada pela pinealectomia.

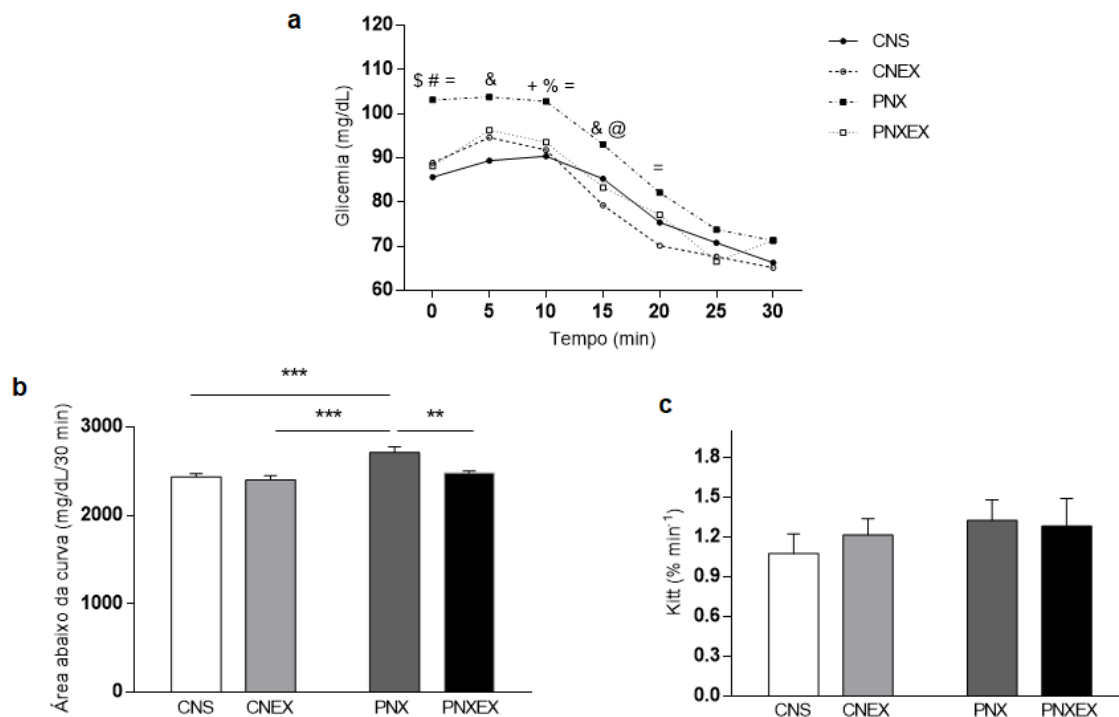


Figura 8 – (a) Glicemia, (b) área abaixo da curva e (c) Kitt nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNEX). Valores expressos como média \pm EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, $n=10$ ($^{\$}p < 0,001$ CNS vs. PNX; $^{\#}p < 0,01$ CNS vs. PNEX; $^{\&}p < 0,05$ CNS vs. PNX; $^{\%}p < 0,01$ CNEX vs. PNX; $^{\&}p < 0,01$ CNS vs. PNX; $^{\@}p < 0,05$ PNX vs. PNEX; $^{\&}p < 0,01$ PNX vs. PNEX; $^{\&}p < 0,001$ CNS vs. PNX; CNEX vs. PNX; $^{\&}p < 0,01$ PNX vs. PNEX).

6.4. Teste de resistência à insulina

A figura 9 apresenta os valores de (a) glicose plasmática (mmol/L), (b) insulina plasmática ($\mu\text{UI}/\text{mL}$) e (c) índice HOMA-IR dos grupos CNS, CNEX, PNEX e PNEXEX. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CNS, CNEX, PNEX e PNEXEX para a glicose plasmática ($p < 0,05$) (Figura 9a). Os animais PNEX apresentaram aumento significativo para insulina plasmática quando comparados aos animais CNS e CNEX ($p < 0,05$). Não houve diferenças significativas para insulina plasmática entre os grupos CNS vs. CNEX, CNS vs. PNEXEX, CNEX vs. PNEXEX e PNEX vs. PNEXEX ($p < 0,05$) (Figura 9b). Os animais PNEX apresentaram aumento significativo para HOMA-IR quando comparados aos animais CNS ($p < 0,05$) e CNEX ($p < 0,001$). Os animais PNEXEX apresentaram redução significativa nos valores de HOMA-IR quando comparados aos animais PNEX ($p < 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CNS vs. CNEX, CNS vs. PNEXEX e CNEX vs. PNEXEX ($p < 0,05$) (Figura 9c). Os resultados apontam efeito protetor do ER sobre a resistência à insulina observada em decorrência da pinealectomia.

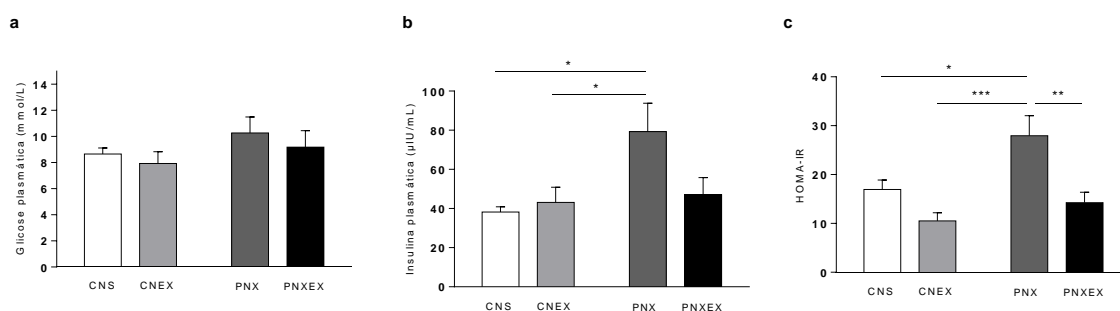


Figura 9 – (a) Glicose plasmática, (b) insulina plasmática e (c) índice HOMA-IR nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNEX) e pinealectomizado exercitado (PNEXEX). Valores expressos como média \pm EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, $n = 10$ (* $p < 0,05$ CNS vs. PNEX; CNEX vs. PNEX; ** $p < 0,01$ PNEX vs. PNEXEX; *** $p < 0,001$ CNEX vs. PNEX).

6.5. Expressão gênica de GLUT4 em tecido muscular esquelético

A figura 10 apresenta a expressão (RNAm) de GLUT4 em EDL de animais CNS, CNEX, PNX e PNXEX. O grupo PNXEX apresentou aumento significativo na expressão de GLUT4 quando comparado aos animais PNX ($p < 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CNS vs. CNEX, CNS vs. PNX, CNS vs. PNXEX, CNEX vs. PNX e CNEX vs. PNXEX (Figura 10). Os resultados apontam efeito do ER no aumento na expressão de GLUT4 em animais pinealectomizados.

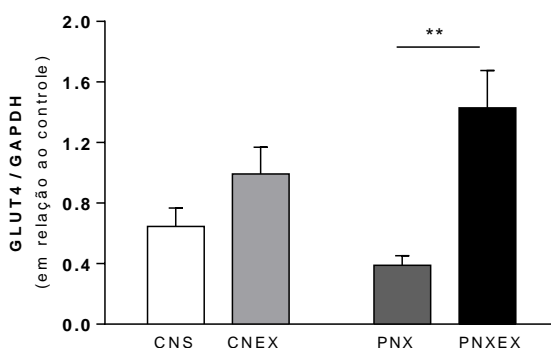


Figura 10 – Expressão de GLUT4 no músculo esquelético nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média \pm EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, $n = 10$ (** $p < 0,01$ PNX vs. PNXEX).

6.6. Expressão gênica de TNF- α em tecido muscular esquelético

A figura 11 apresenta aumento na expressão (RNAm) de TNF- α em EDL de animais PNX em comparação aos grupos CNS e CNEX ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CNS vs. CNEX, CNS vs. PNXEX e CNEX vs. PNXEX ($p < 0,05$) (Figura 11). Os resultados indicam efeito protetório do ER no aumento de TNF- α no músculo esquelético em decorrência da pinealectomia.

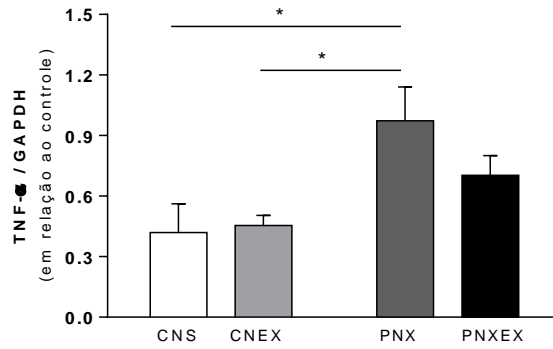


Figura 11 – Expressão TNF- α no músculo esquelético nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média \pm EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n = 10 (* p <0,05 CNS vs. PNX; CNEX vs. PNX).

6.7. Análise morfológica do tecido muscular esquelético

A figura 12 apresenta imagens da área da secção transversal (AST) do músculo EDL nos animais dos grupos CNS, CNEX, PNX e PNEX.

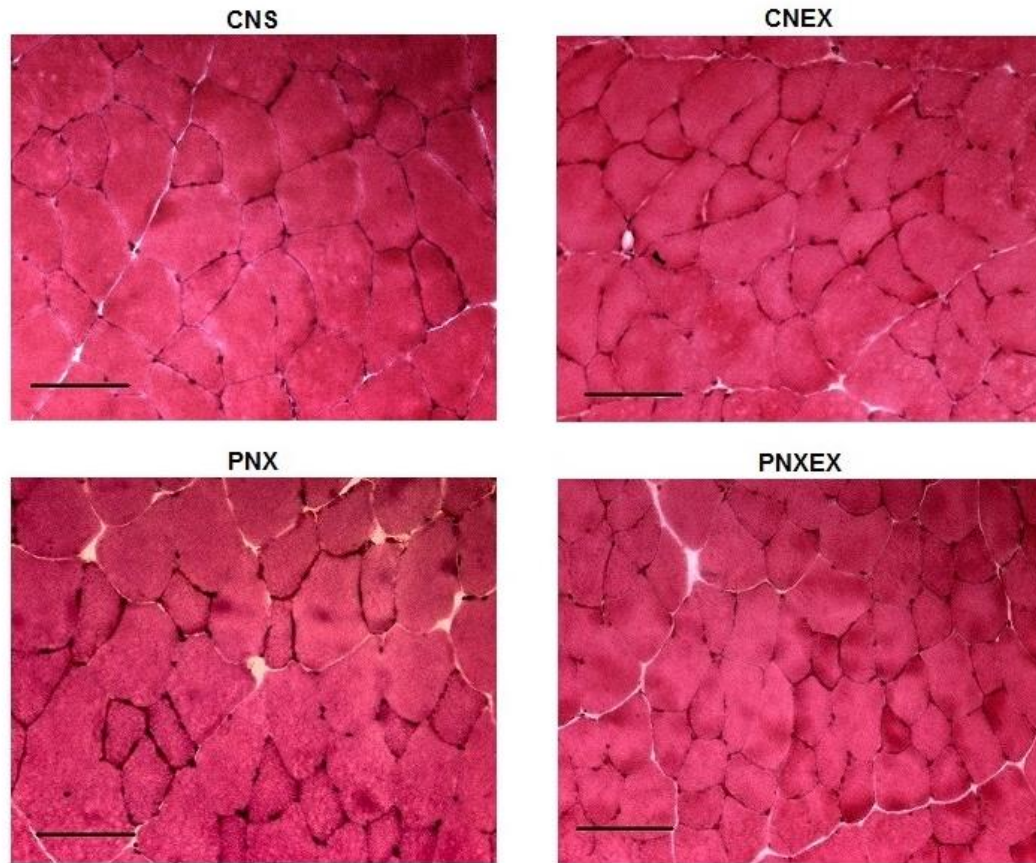


Figura 12 - Coloração H&E das secções do músculo esquelético nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX), n = 10. Barra, 100 μ m.

A AST diminuiu de forma significativa nos animais PNX quando comparados aos animais do grupo CNS ($p < 0,05$), nos animais PNEXEX quando comparados aos animais CNEX ($p < 0,01$) e nos animais PNEXEX quando comparados aos animais CNS ($p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CNS vs. CNEX, CNEX vs. PNX e PNX vs. PNEXEX ($p < 0,05$) (Figura 13).

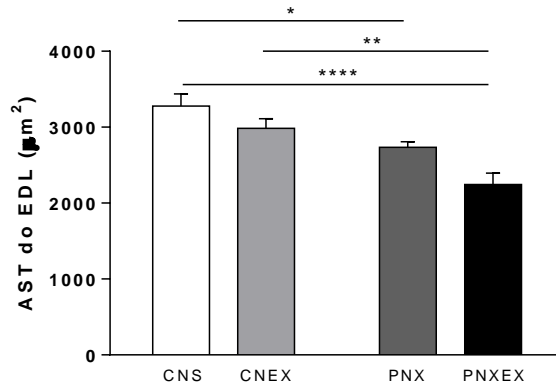


Figura 13 – Área de secção transversa do músculo esquelético nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNEXEX). Valores expressos como média ± EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n = 10 (*p<0,05 CNS vs. PNEX; **p<0,01 CNEX vs. PNEXEX; ****p<0.0001 CNS vs. PNEXEX).

O histograma da figura 14 representa a frequência de distribuição das áreas de secção transversa no tecido muscular esquelético dos grupos CNS, CNEX, PNEX e PNEXEX.

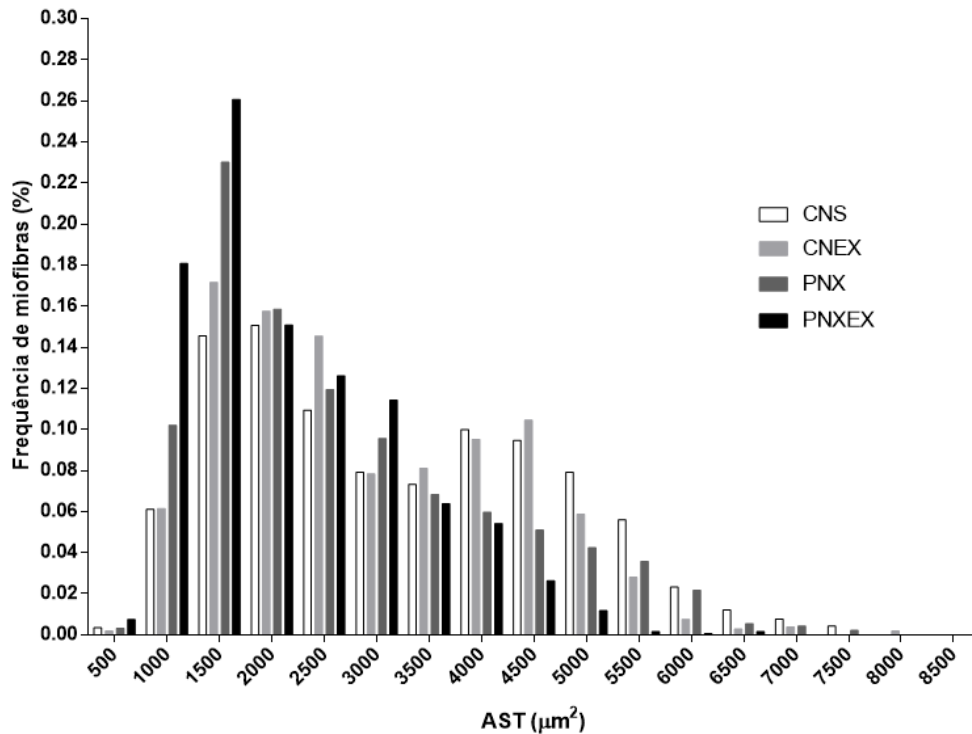


Figura 14 - Frequência de distribuição das áreas das fibras musculares nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNEXEX). Valores expressos como média ± EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n = 10. CNS = 3186.9 ± 1509.6 μm²; CNEX = 2828.3 ± 1329.5 μm²; PNEX = 2689 ± 1408.1 μm²; PNEXEX = 2166.3 ± 1026.2 μm².

6.8. Expressão e fosforilação de proteínas associadas à perda de massa muscular esquelética

De acordo com as figuras 12, 13 e 14, a prática do exercício físico não alterou, de forma significativa, a estrutura das fibras musculares, e não atuou na prevenção da atrofia observada em animais PNEX e PNEXEX. A partir desses resultados, as análises da expressão e fosforilação proteica foram realizadas somente nos grupos CNS e PNEX. A figura 15 apresenta os valores da expressão de RNAm das proteínas atrogin-1 e MuRF1 no tecido muscular esquelético dos animais dos grupos CNS e PNEX. Não houve diferença significativa entre os grupos CNS e PNEX ($p < 0,05$), indicando que a atrofia decorrente da pinealectomia é independente do aumento na expressão dos atrogênes atrogin-1 e MuRF1.

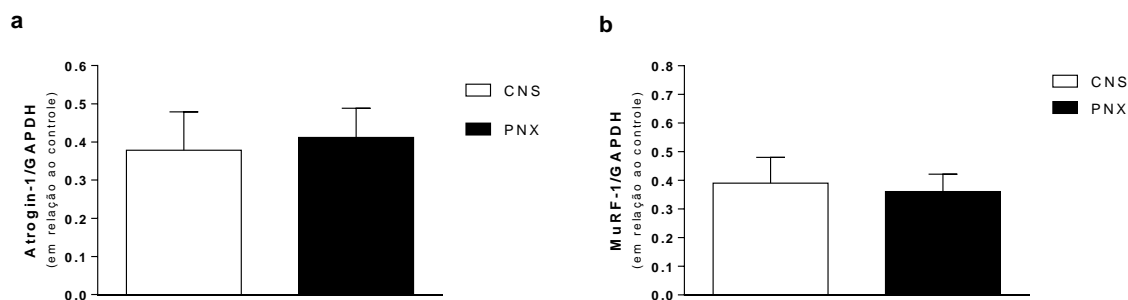


Figura 15 – Expressão de RNAm para (a) atrogin-1 e (b) MuRF1 no músculo esquelético nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNEXEX). Valores expressos como média \pm EPM, teste t não pareado (GraphPad Prism 6.0), $n = 10$.

A figura 16 representa os valores da expressão gênica de IGF-1 e fosforilação proteica de AKT no tecido muscular esquelético dos animais dos grupos CNS e PNEX. Não houve diferença significativa entre os grupos CNS e PNEX ($p < 0,05$). O resultado sugere que a atrofia causada pela pinealectomia é independente da diminuição na sinalização da via da Akt.

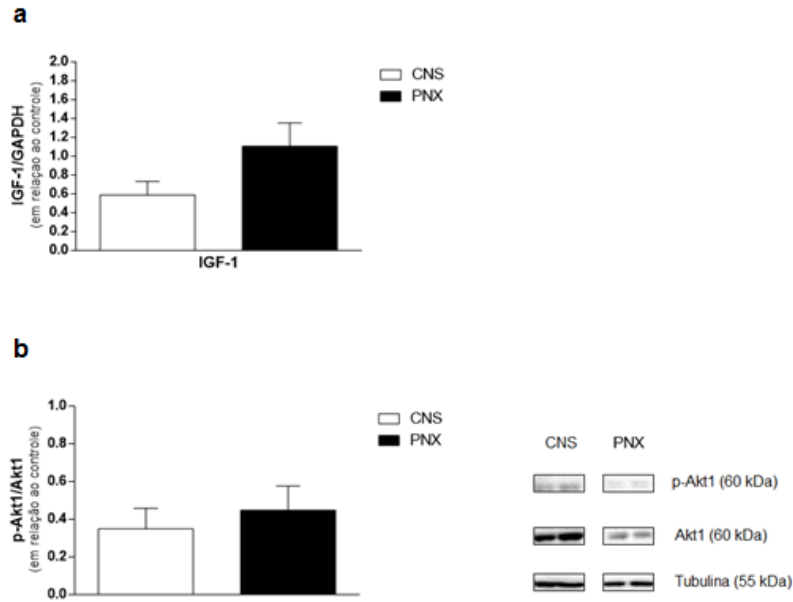


Figura 16 – (a) Expressão de RNAm de IGF-1 e (b) grau de fosforilação proteica de AKT1 no músculo esquelético nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média \pm EPM, teste t não pareado (GraphPad Prism 6.0), n = 10.

A figura 17 apresenta os valores da expressão de RNAm da miostatina e a fosforilação proteica de SMAD 2/3 no tecido muscular esquelético dos animais dos grupos CNS e PNX. Em ambas as análises, observou-se aumento significativo no grupo PNX quando comparado ao grupo CNS ($p < 0,05$). O resultado indica que a atrofia em animais PNX está associada ao aumento na ativação da via da miostatina.

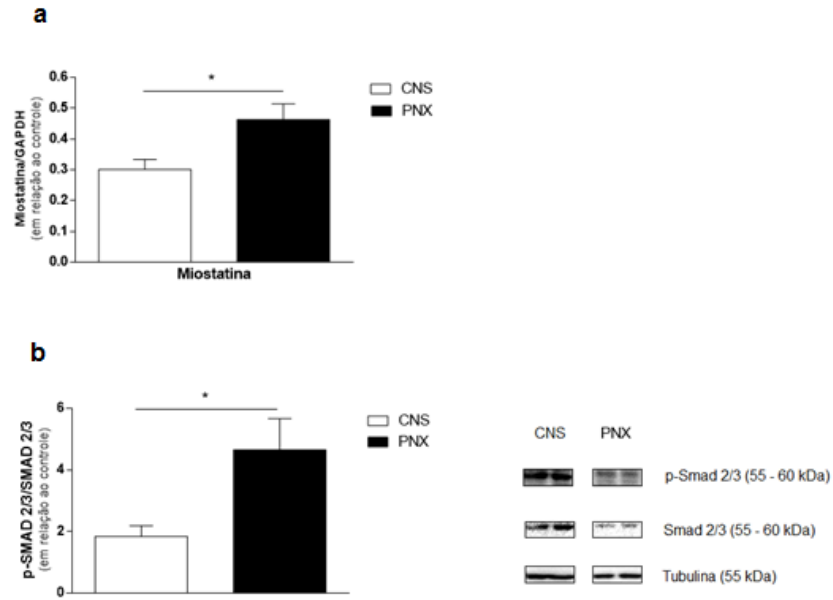


Figura 17 – (a) Expressão de RNAm de miostatina e (b) grau de fosforilação proteica de SMAD 2/3 no músculo esquelético nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média \pm EPM, teste t não pareado (GraphPad Prism 6.0), n = 10. (* $p < 0,05$ CNS vs. PNx).

6.9. Análise histológica de tecido ósseo

A Figura 18 apresenta imagens da secção longitudinal do osso de animais

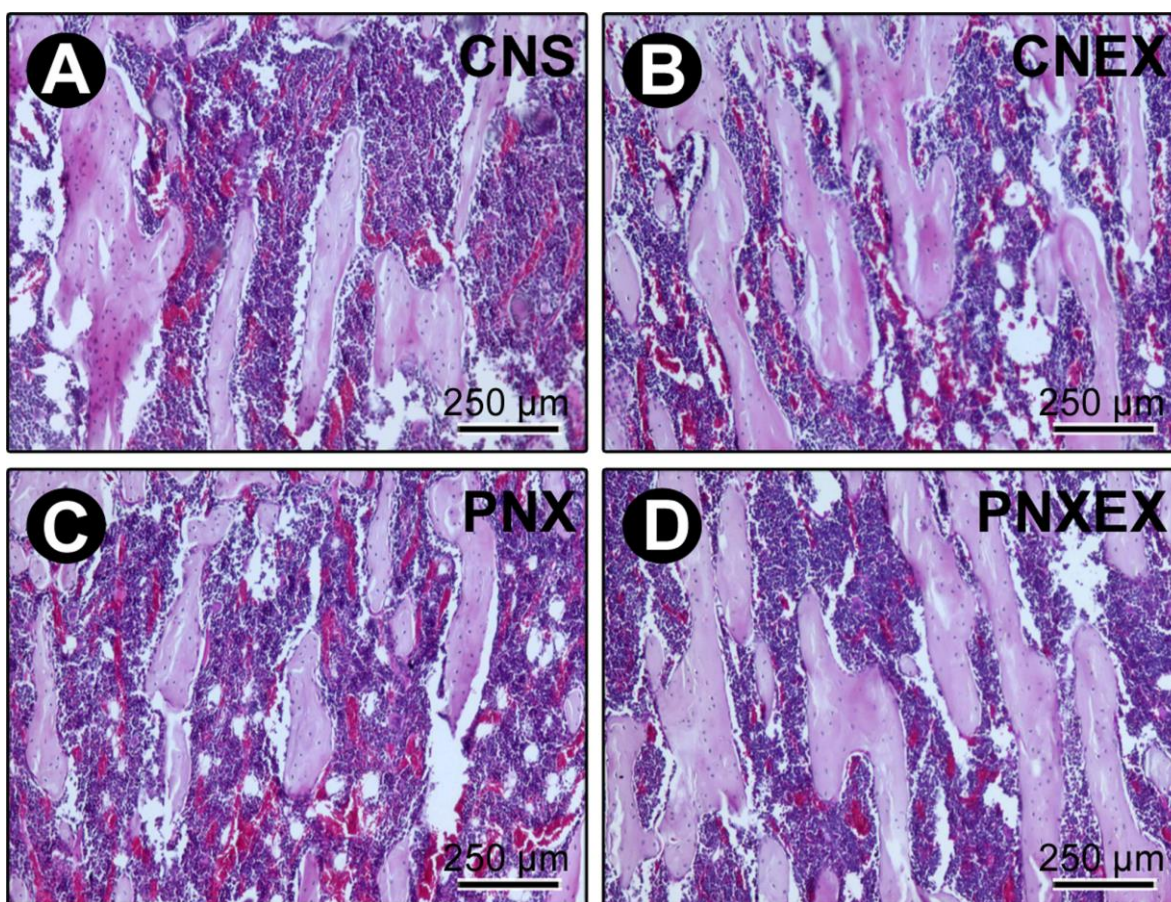


Figura 18 Coloração H&E das secções do osso nos animais controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado/exercitado (PNXEX), n=7.

Os animais do grupo CNEX apresentaram aumento significativo na ASL do osso quando comparados aos animais CNS ($p < 0,05$). Os animais PNX apresentaram

diminuição significativa na ASL quando comparados aos animais CNEX ($p < 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CNS vs. PNEX, CNS vs. PNEXEX e CNEX vs. PNEXEX ($p < 0,05$) (Figura 19). Os resultados sugerem efeito do ER no aumento da ASL em animais com a glândula pineal.

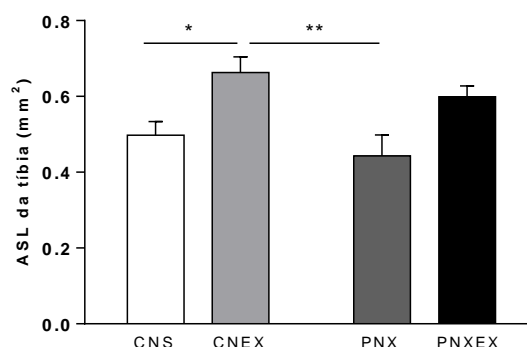


Figura 19 – Área de secção longitudinal do osso nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNEXEX). Valores expressos como média \pm EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, $n = 7$ ($*p < 0,05$ CNS vs. CNEX).

6.10. Padrão de imunomarcção

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de RUNX-2, OCN, OPG, RANKL e TRAP mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação. As células imunorreativas apresentaram uma coloração marrom escura confinada exclusivamente ao núcleo, no caso de RUNX-2, confinada exclusivamente ao citoplasma, no caso de TRAP, e confinada ao citoplasma e, em menor escala à matriz extracelular, no caso de OCN, OPG e RANKL. Para RUNX-2 e para OPG prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção para todos os grupos experimentais. Com relação à OCN, RANKL e TRAP prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção nos grupos exercitados, CNEX e PNEXEX, enquanto nos grupos CNS e PNEX o padrão de imunomarcção foi baixo para tais biomarcadores. Os resultados indicam efeito do ER no aumento do metabolismo ósseo.

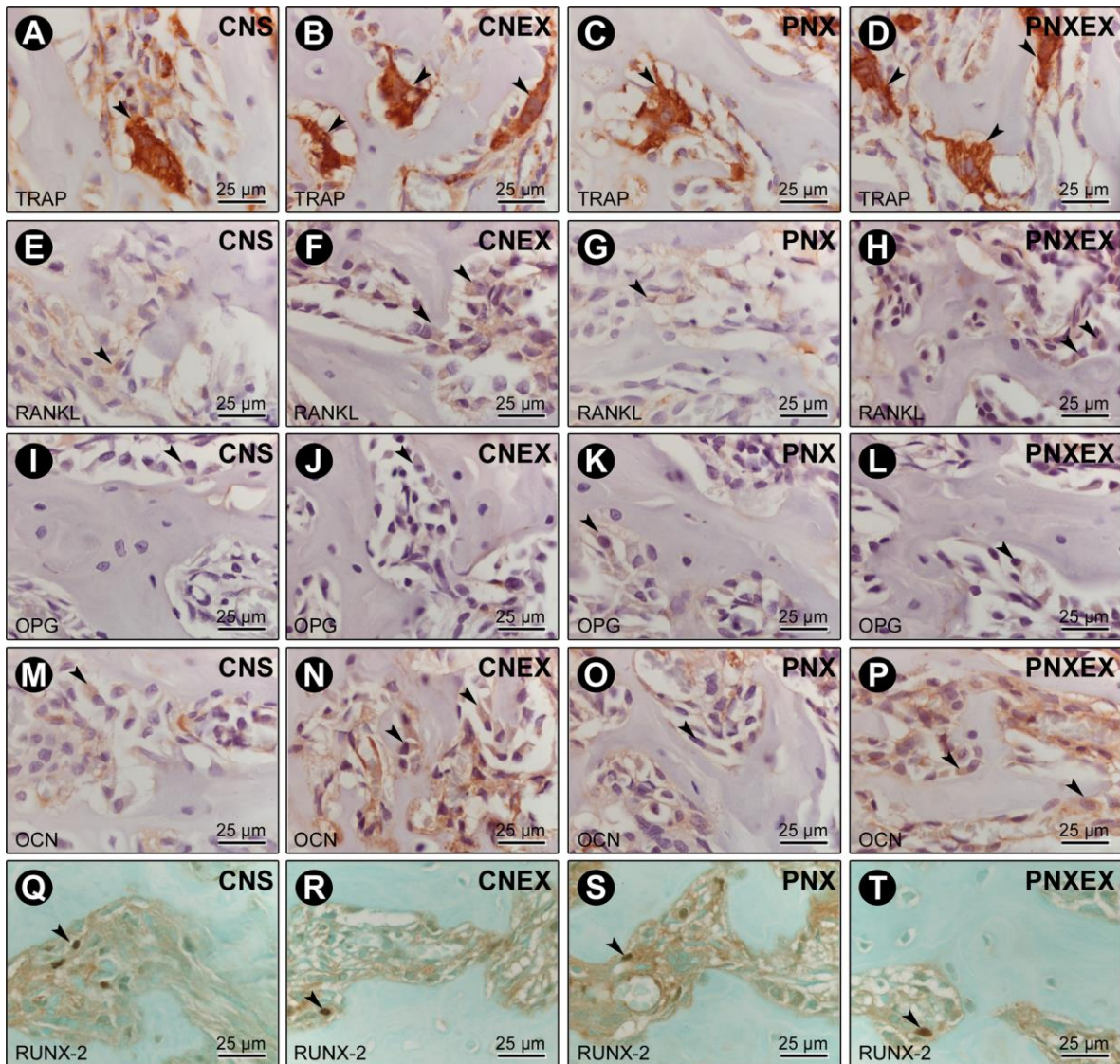


Figura 20 – Imunomarcção para TRAP, RANKL, OPG, OCN e RUNX-2 em cortes longitudinais do osso nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). n = 7.

6.11. Parâmetros morfológicos do tecido ósseo (micro-CT)

A Figura 21 demonstra os parâmetros morfológicos da porção trabecular da tíbia dos animais dos grupos CNS, CNEX, PNEX e PNEXEX. Os animais CNEX apresentaram aumento significativo para BV/TV quando comparados aos animais CNS ($p < 0,05$) (Figura 21a). Os animais PNEX apresentaram redução significativa para BV/TV quando comparados aos animais CNEX ($p < 0,05$) (Figura 21a). Os

animais PNXEX apresentaram aumento significativo para BV/TV ($p < 0,01$) (Figura 21a) e Tb.N ($p < 0,05$) (Figura 21b), e redução significativa para Tb.Sp ($p < 0,01$) quando comparados aos animais PNX, e redução significativa para Tb.Sp ($p < 0,01$) (Figura 21f) quando comparados aos animais PNX. Os animais PNXEX apresentaram aumento significativo para BV/TV ($p < 0,001$) (Figura 21a) e Tb.N ($p < 0,01$), e redução significativa para Tb.SP ($P < 0,01$) (Figura 21f) quando comparados aos animais CNS. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CNS vs. PNX e CNEX vs. PNXEX para BV/TV ($p < 0,05$) (Figura 21a). Também não houve diferenças significativas para Tb.N entre os grupos CNS vs. CNEX, CNS vs. PNX, CNEX vs. PNX e CNEX vs. PNXEX ($p < 0,05$) (Figura 21b); e para Tb.Sp entre os grupos CNS vs. CNEX, CNS vs. PNX, CNEX vs. PNX e CNEX vs. PNXEX ($p < 0,05$) (Figura 21f). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CNS, CNEX, PNX e PNXEX para Tb.Th (Figura 21c), Tb.Pf (Figura 21d) e SMI (Figura 21e) ($p < 0,05$). Os resultados indicam o efeito do ER na melhora da qualidade óssea em animais CNEX e PNXEX. A pinealectomia não promoveu alterações nos parâmetros morfológicos avaliados.

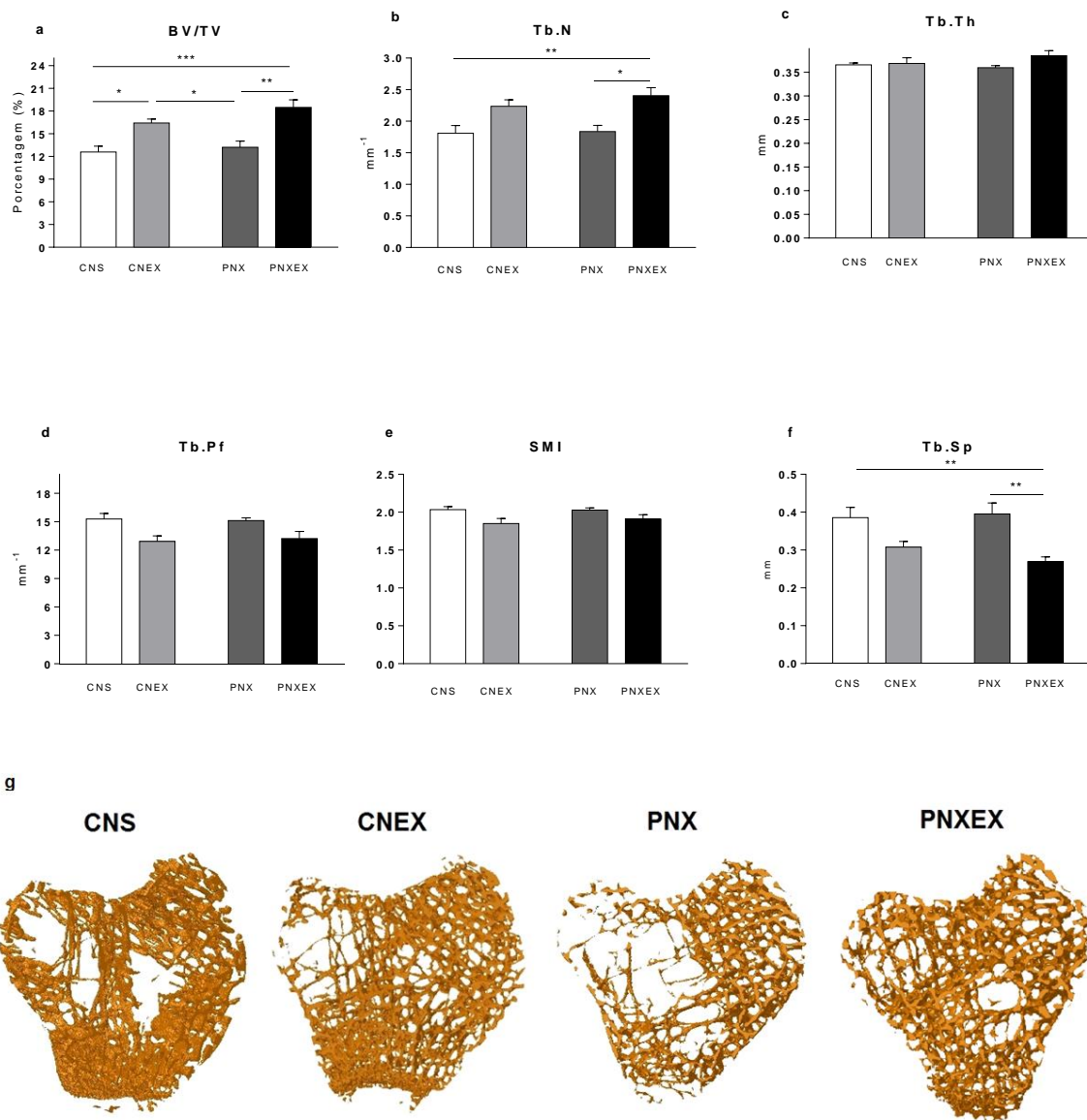


Figura 21 – (a) fração de volume ósseo - BV/TV; (b) número de trabéculas - Tb.N; (c) espessura trabecular - Tb.Th; (d) conectividade trabecular - Tb.Pf; (e) índice de modelo estrutural – SMI; (f) separação trabecular - Tb.Sp; e (g) imagens representativas das tíbias nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média \pm EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, n = 10 (*p<0,05 CNS vs. CNEX; PNX vs. PNXEX; CNEX vs. PNX; **p<0,01 PNX vs. PNXEX; CNS vs. PNXEX; ***p<0,001 CNS vs. PNXEX).

6.12. Análise mineral óssea (Dual-energy X-ray absorptiometry – DEXA)

A Figura 22 demonstra o conteúdo mineral ósseo (g), densidade mineral óssea (g/cm^2) e área total (cm^2) da tíbia dos animais dos grupos CNS, CNEX, PNX e PNXEX. Os animais CNEX ($p < 0,01$) e PNX ($p > 0,05$) apresentaram aumento significativo na DMO quando comparados aos animais CNS (Figura 22b). Não foram observadas diferenças significativas para DMO entre os grupos CNS vs. PNXEX, CNEX vs. PNX, CNEX vs. PNXEX e PNX vs. PNXEX ($p < 0,05$) (Figura 23b). Não foram encontradas diferenças significativas para os valores de CMO (Figura 22a) e área total (Figura 22c) entre os grupos CNS, CNEX, PNX e PNXEX ($p < 0,05$).

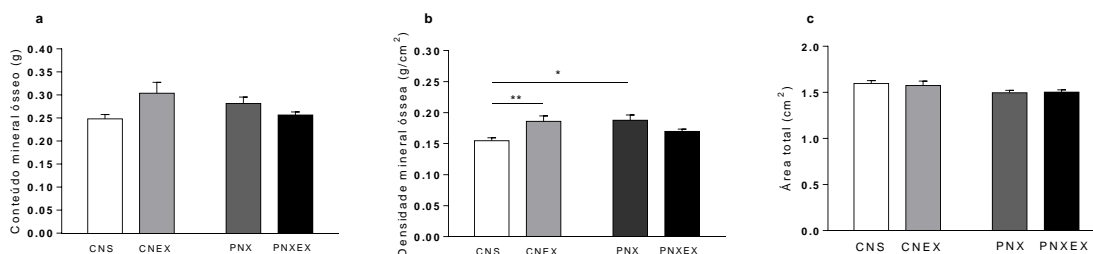


Figura 22 – (a) Conteúdo mineral ósseo – CMO; (b) densidade mineral óssea – DMO; e (c) área total da tíbia nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNXEX). Valores expressos como média \pm EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, $n = 10$ (* $p < 0,05$ CNS vs. CNEX; ** $p < 0,01$ CNS vs. CNEX).

6.13. Análise mecânica (teste de três pontos)

A Figura 23 demonstra os valores de força máxima (N), rigidez óssea (N/mm) e energia absorvida até a força máxima (mJ) da tíbia dos animais dos grupos CNS, CNEX, PNX e PNXEX. Os animais PNXEX apresentaram aumento significativo para força máxima ($p < 0,01$) (Figura 23a) e rigidez óssea ($p < 0,05$) (Figura 23b) quando comparados aos animais CNS. Os animais PNXEX também apresentaram aumento na força máxima quando comparados aos animais PNX ($p < 0,05$) (Figura 23a). Não foram observadas diferenças significativas para força máxima entre os grupos CNS vs. CNEX, CNS vs. PNX, CNEX vs. PNX e CNEX

vs. PNEXEX ($p < 0,05$) (Figura 23a). Também não foram observadas diferenças significativas para rigidez óssea entre os grupos CNS vs. CNEX, CNS vs. PNEX, CNEX vs. PNEX, CNEX vs. PNEXEX e PNEX vs. PNEXEX ($p < 0,05$) (Figura 23b), e para a energia absorvida até a força máxima entre os grupos CNS, CNEX, PNEX e PNEXEX ($p < 0,05$) (Figura 23c). Os resultados indicam melhoras em aspectos morfológicos em animais PNEXEX e ausência de efeito da pinealectomia sobre os parâmetros avaliados.

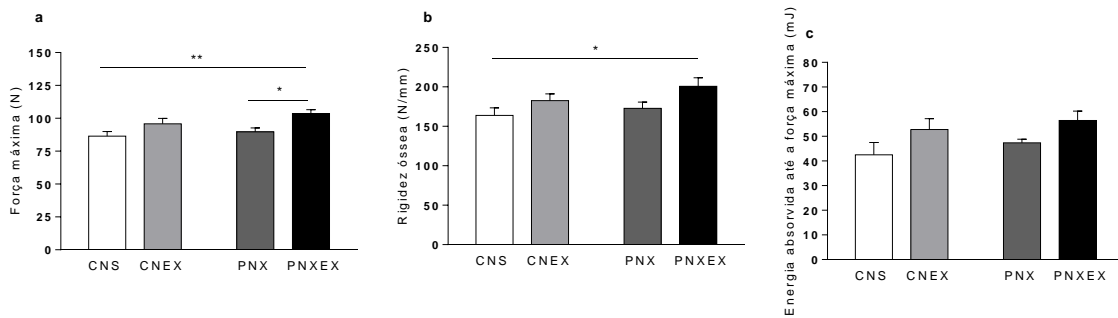


Figura 23 – (a) força máxima; (b) rigidez óssea; e (c) energia absorvida até a força máxima da tíbia nos animais dos grupos controle (CNS), exercitado (CNEX), pinealectomizado (PNX) e pinealectomizado exercitado (PNEXEX). Valores expressos como média \pm EPM, ANOVA (Two-way) (GraphPad Prism 6.0) com pós-teste de Bonferroni, $n = 10$ (* $p < 0,05$ PNEX vs. PNEXEX; CNS vs. PNEXEX; ** $p < 0,01$ CNS vs. PNEXEX).

Discussão

7. DISCUSSÃO

O ER promoveu aumento de: sensibilidade à insulina (pelo HOMA-IR), expressão de GLUT4 no músculo esquelético, capacidade máxima de geração de força voluntária, no peso seco absoluto e relativo do osso, padrão de imunomarcação para OCN, RANKL e TRAP, BV/TV, Tb.N e força máxima óssea, e diminuição de: glicemia em jejum, área abaixo da curva de glicemia no ITT e Tb.Sp em animais pinealectomizados.

A dessincronização dos ritmos circadianos, decorrente da diminuição na concentração de melatonina, pode promover resistência à insulina (BUIJS et al., 2013, CIPOLLA-NETO et al., 2014, LEPROULT et al., 2014, ESQUIROL et al., 2012) e diabetes (ESQUIROL et al., 2009; PAN et al., 2011; IKA et al., 2013; GALE et al., 2011; BUXTON et al., 2012; YOUNG et al., 2013). Alguns estudos demonstraram que a pinealectomia promove resistência à insulina em ratos (ZANQUETTA et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2011; PICINATO et al., 2002). Esses estudos corroboram os nossos resultados que demonstraram que a pinealectomia diminui a sensibilidade à insulina, pelo HOMA-IR. Ademais, o ER melhorou essa sensibilidade no grupo PNX. Em outros modelos de resistência à insulina, como obesidade (CHO et al. 2017) e síndrome metabólica (PANDA et al. 2017), o exercício conseguiu reverter essa alteração na sensibilidade à insulina.

Indivíduos resistentes à insulina e diabéticos apresentam altas concentrações de TNF- α no plasma (ZINMAN et al., 1999), tecido adiposo (HOTAMISLIGIL et al., 1995) e músculo esquelético (SAGHIZADEH et al., 1996). Sabe-se que o TNF- α apresenta ação inibitória sobre a fosforilação de IRS-1 e IRS-2 e subsequente bloqueio na ativação da PI3K, fosforilação da Akt (DE ALVARO et al., 2004). Concentrações elevadas de TNF- α foram previamente observadas no plasma (OZTEKIN et al., 2006), aorta (WANG et al., 2013) e cólon (POLIDAROVÁ et al., 2017) em animais pinealectomizados. Salientamos que o presente estudo foi o primeiro a verificar aumento expressivo de TNF- α no músculo esquelético, em decorrência da pinealectomia. Esse aumento no TNF- α

no músculo esquelético pode ser um dos motivos do aumento na resistência à insulina em animais PNX quando comparados aos animais CNS.

Estudos demonstraram que o exercício crônico pode diminuir a concentração de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 no músculo esquelético (LIRA et al., 2009). Após o ER, houve diminuição nos valores numéricos de expressão de TNF- α no EDL de animais PNSEX em relação aos animais PNX, contudo essa diferença não foi significativa. Talvez a ausência de diferença significativa na diminuição na expressão de TNF- α em EDL de ratos PNSEX quando comparados aos animais PNX possa ser explicada pelo tempo relativamente curto (8 semanas) e pela intensidade moderada durante a prática de ER. Essa não alteração na expressão de TNF- α também foi observada entre os grupos CNS e CNEX. WATSON et al., (2017) observaram que, no início da prática de ER, ocorre aumento excessivo na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α , em resposta às contrações musculares. Entretanto, após algum tempo de prática, essa resposta pró-inflamatória exacerbada desaparece. Por outro lado, ressaltamos que o ER promoveu uma certa melhora no parâmetro desta citocina no grupo PNSEX, pois não houve diferenças significativas de TNF- α entre os grupos PNSEX e CNS, como houve entre CNS e PNX.

Outro parâmetro que pode estar relacionado à resistência à insulina é a expressão de GLUT4, pois estudos que utilizaram modelos de resistência à insulina, como animais obesos (SERAPHIN et al. 2001) e pinealectomizados (LIMA et al., 1998; ZANQUETTA et al., 2003), apresentaram diminuição na expressão desta proteína transportadora em tecido adiposo. A redução nos valores numéricos relacionados à expressão de GLUT4 no EDL de animais PNX quando comparados aos animais CNS não foi significativa. Nossos resultados corroboram o estudo de Zanquetta et al. (2003), o qual não observou alteração de GLUT4 em tecido muscular esquelético, apenas em tecido adiposo branco, em ratos pinealectomizados, conforme descrito acima (ZANQUETTA et al., 2003). Nossos resultados demonstraram que, após a prática de ER, os animais pinealectomizados (PNSEX) apresentaram aumento significativo na expressão de

GLUT4 em EDL quando comparados aos animais PNX. Sabe-se que o exercício pode promover aumento de GLUT4 em animais com resistência à insulina, como por exemplo, ratos obesos e diabéticos. Na literatura há trabalhos que demonstram aumento de GLUT4 no gastrocnêmio de ratos obesos e diabéticos submetidos a 8 semanas de ER em escada, com sobrecarga inicial de 50% de 1RM e final de 80% de 1RM (KIM et al., 2015). O aumento na expressão de GLUT4 como resultado das contrações musculares foi demonstrado no GAS de ratos adultos saudáveis submetidos à estimulação elétrica (KOHEI et al., 2016). Entretanto, no grupo CNS, o ER não promoveu alterações nesse parâmetro, devido as mesmas razões já discutidas acima com relação ao tipo e duração de exercício utilizado. Salientamos que o presente estudo foi pioneiro em verificar o efeito do ER no aumento na expressão de GLUT4 em músculo esquelético de animais pinealectomizados.

Acredita-se que o ER seja o tipo de exercício mais eficaz na melhora da sensibilidade à insulina, já que o mesmo é mais propenso a aumentar a massa muscular e, em consequência, gerar maior espaço de armazenamento para glicose (IVY, 2002). Entretanto, o ER proposto no presente estudo não aumentou a área de secção transversa no EDL em animais exercitados (CNEX e PNXEX) quando comparados aos seus controles (CNEX e PNX). Esses resultados estão de acordo com os achados de Kim et al. (2015), os quais não verificaram aumento na área de secção transversa do GAS de animais submetidos, ou não, a 8 semanas de ER em escada (frequência de 3 sessões semanais; volume de 1 série de 10 repetições, com intervalos de 2 minutos; intensidade inicial 50% de 1RM e intensidade final 80% de 1RM) (KIM et al., 2015). Em contrapartida, animais submetidos a 26 semanas de ER em escada (frequência de 4 sessões semanais; volume de 1 série de 12 a 15 repetições, sem intervalos; intensidade de 1 RM) apresentaram hipertrofia de fibras musculares no EDL, SOL, plantar e reto femoral (DUNCAN et al., 1998). Em humanos, esse aumento na área de secção transversa das fibras musculares esqueléticas pode ser verificado após 3 a 6 meses de ER (BAECHLE; EARLE, 2000), praticado em intensidade mínima de 60% de 1RM (SCHOENFELD, 2013). Sugerimos que, no presente estudo, a

ausência de respostas hipertróficas no EDL de animais CNEX e PNEX quando comparados aos animais CNS e PNX pode ter ocorrido devido ao curto período de treinamento ou à baixa frequência, volume e intensidade de ER.

A atrofia muscular esquelética somente foi observada em animais PNEX quando comparados aos animais CNS. Não foram encontrados estudos sobre o efeito da pinealectomia sobre a alteração muscular esquelética. Assim como a resistência à insulina, essa atrofia pode ter sido decorrente do aumento na expressão de TNF- α no EDL de animais PNEX quando comparados aos animais CNS. Estudos sugerem que a expressão aumentada de TNF- α no músculo esquelético pode resultar em atrofia pela ativação da via TNF- α \rightarrow *I κ B kinase* (IKK) \rightarrow *nuclear factor kappa B* (NF κ B) \rightarrow *TNF receptor associated factor 6* (TRAF6) (BODINI; SANDRI, 2013). Animais *knockout* para TRAF6 apresentaram resistência à perda de massa muscular induzida por desnervação (KUMAR et al., 2012), câncer (PAUL et al., 2010) e jejum (PAUL et al., 2012). Além disso, sugere-se que a ação inibitória da IKK sobre a PI3K pode bloquear a síntese de proteínas (BONALDO; SANDRI, 2013).

A PI3K participa tanto na promoção do crescimento muscular, pela estimulação da via IGF-1–PI3K–Akt–mTOR, quanto na supressão da proteólise, através da modulação negativa de atrogin-1 e MuRF1, pela ativação da via IGF-1–PI3K–Akt–FOXO (BODINE et al., 2001b; SCHIAFFINO et al., 2013). Outros modelos experimentais, como animais em desuso (MORALES et al., 2016) ou destreinados (SHENKMAN et al., 2015), apresentaram diminuição na atividade da via da Akt. E em animais imobilizados, desnervados, suspensos pela cauda e submetidos ao jejum e à transecção da medula espinhal foi observado aumento na expressão de atrogin-1 e MuRF1 (BODINE et al., 2001a). Estes mesmos resultados foram observados em pacientes com doença renal crônica, insuficiência cardíaca, septicemia, diabetes, fumantes e alcoólicos (BODINE et al., 2001a). Entretanto, a atrofia muscular esquelética observada em animais PNEX quando comparados a animais CNS mostrou ser independente da modulação da via da Akt e também do aumento na expressão de atrogin-1 e MuRF1.

Outra via relacionada à atrofia muscular esquelética é composta pela miostatina e SMAD2/3. O aumento na regulação dessa via promove degradação proteica de forma totalmente independente do aumento na expressão de MuRF1 e pouco dependente do aumento na expressão de atrogin-1 (SARTORI et al., 2009), podendo atuar na diminuição da síntese de proteínas pelo bloqueio das SMADs na ativação da via IGF1-PI3K-Akt, permitindo aumento na expressão da FoxO1 e consequente aumento na expressão de atrogin-1 (BONALDO; SANDRI, 2013). A inibição da via da miostatina mostrou ser suficiente na promoção de crescimento muscular (SARTORI et al., 2009; WELLE et al., 2007; WHITTEMORE et al., 2003), demonstrando eficácia no tratamento de miopatias, como distrofia muscular de Duchenne (MORINE et al., 2010) e esclerose amiotrófica lateral (MORRISON et al., 2009), assim como na prevenção de atrofia por desuso (TANDO et al., 2016). No presente estudo, tanto a expressão de miostatina quanto o grau de fosforilação de SMAD 2/3 estavam aumentados no músculo esquelético de animais PNx quando comparados aos animais CNS. A atrofia muscular esquelética causada pela pinealectomia demonstrou estar diretamente relacionada a esse aumento na ativação da via da miostatina e ser independente de alterações na via da Akt e na expressão de atrogin-1 e MuRF1.

A atrofia muscular esquelética pode vir acompanhada de perda de massa óssea (RILEY; ESSER, 2017). Estudos recentes demonstraram que a inibição da via da miostatina no músculo esquelético aumenta a massa óssea em camundongos (BIALEK et al., 2014). Além disso, a inibição do receptor de miostatina (ActRIIB) nos osteoblastos aumentou a formação óssea, também em camundongos (PARK et al., 2006). Pesquisas que avaliaram o efeito da pinealectomia sobre o tecido ósseo em roedores apontaram desenvolvimento de escoliose (OYAMA et al., 2006) e aumento nos marcadores *serum alkaline phosphatase* (ALP), *carboxyterminal propeptide type I procollagen* (PICP) e *carboxyterminal telopeptide type I collagen* (ICTP) de reabsorção óssea (OSTROWSKA et al., 2003). Entretanto, o aumento na DMO em animais PNx quando comparados aos animais CNS foi a única alteração óssea observada no presente estudo, em decorrência da pinealectomia. Acreditamos que essa

alteração corresponde a um mecanismo de compensação do osso, na tentativa de manter os valores ideais para DMO. Também sugerimos que a ausência de alterações nos demais parâmetros avaliados em tecido ósseo pode estar associada à pouca idade dos animais, já que nos estudos de Oyama et al. (2006) e Ostrowska et al. (2003), animais pinealectomizados com mais idade apresentaram perda na qualidade óssea.

A prática de ER promoveu melhora na qualidade óssea verificada por alterações morfológicas (aumento em ASL, BV/TV e DMO) e metabólicas (aumento no padrão de imunomarcção para TRAP, OCN e RANKL) em animais CNEX quando comparados aos animais CNS. Esses resultados estão de acordo com estudos que demonstram a influência do ER no favorecimento da arquitetura e remodelamento ósseo (MENKES et al., 1993). Essa melhora na qualidade óssea também foi verificada em animais PNEX quando comparados aos animais PN por mudanças morfológicas (aumento em BV/TV e Tb.N e diminuição em Tb.Sp), metabólicas (aumento no padrão de imunomarcção para TRAP, OCN e RANKL) e funcionais (aumento na força máxima). Além do ER, o aumento de OCN em animais PNEX quando comparados aos animais PN também pode estar associado à melhora na sensibilidade à insulina nestes mesmos animais. Estudos demonstram que roedores *knockout* para OCN (*Ocn^{-/-}*) apresentaram hiperglicemia, intolerância à glicose, diminuição em: células β -pancreáticas, secreção insulínica, sensibilidade à insulina e expressão de adiponectinas, e aumento em: massa gorda e triglicérides. Ademais, a administração de OCN recombinante melhorou a intolerância à glicose e aumentou a expressão de insulina em células β -pancreáticas (LEE et al., 2007).

O maior número de alterações observado nos animais PNEX quando comparados aos animais PN do que o grupo CNEX quando comparado ao grupo CNS sugere que os animais submetidos à pinealectomia são mais sensíveis à melhora na qualidade óssea promovida pela prática de ER. Salientamos que o presente estudo foi o pioneiro em avaliar o efeito do ER sobre o tecido ósseo em animais pinealectomizados. Também não foram encontrados registros sobre o

efeito da prática de exercícios físicos sobre o tecido ósseo em indivíduos com inversão do ciclo claro-escuro.

Em resumo, os resultados do presente estudo indicam resistência à insulina promovida pela supressão na produção de melatonina pela glândula pineal. Sugerimos que o desenvolvimento da resistência à insulina está relacionado ao aumento na expressão de TNF- α em músculo esquelético. O ER melhorou o perfil da expressão de TNF- α em animais pinealectomizados, manteve concentrações adequadas de glicose e insulina, prevenindo o desenvolvimento da resistência à insulina causada pela pinealectomia. A pinealectomia também promoveu atrofia muscular esquelética. Essa atrofia mostrou estar associada a ativação da via da miostatina, podendo também estar relacionada ao aumento na expressão de TNF- α , sendo independente de alterações na expressão de atrogin-1 e MuRF1 e de modulações na via da Akt. O ER não preveniu a atrofia muscular esquelética causada pela pinealectomia. Contudo, aumentou a capacidade de geração de força máxima em animais com e sem pineal, além de melhorar a qualidade óssea nos mesmos. A pinealectomia não promoveu qualquer prejuízo no tecido ósseo. Por outro lado, o ER melhorou a qualidade óssea tanto nos animais controle e pinealectomiados.

Portanto, os principais resultados desse estudo apontam o efeito da pinealectomia na promoção de resistência à insulina e atrofia muscular esquelética, e o efeito do ER na prevenção da resistência à insulina causada pela pinealectomia e melhora na qualidade óssea e alguns parâmetros no tecido muscular, como o TNF- α e GLUT4. Para prevenção da atrofia muscular em indivíduos que apresentam inversão no ciclo claro-escuro, sugerem-se adaptações no volume, frequência, duração e/ou intensidade de treinamento.

Conclusão

8. CONCLUSÃO

Confirmando nossa hipótese, o ER preveniu os danos causados pela pinealectomia na sensibilidade à insulina e nos parâmetros ósseo e muscular. Em contrapartida, o ER não promoveu alterações na atrofia muscular em animais pinealectomizados. Por fim, a pinealectomia não promoveu prejuízo em tecido ósseo e o ER promoveu melhora nesse tecido tanto no grupo controle como no grupo pinealectomizado. Portanto, concluímos que a melatonina tem grande importância no controle da glicemia e manutenção da qualidade óssea e muscular. A prática de ER preveniu a resistência à insulina causada pela supressão na produção de melatonina pela glândula pineal, além de melhorar a qualidade no osso e no músculo. É possível que a realização do treinamento resistido, proposto no presente estudo, possa servir como alternativa não-farmacológica na diminuição das chances de desenvolvimento de resistência à insulina em indivíduos expostos à luz em período noturno, como trabalhadores noturnos. A prática desse tipo de exercício também pode melhorar a qualidade óssea em indivíduos que apresentam dessincronização dos ritmos circadianos, ou não.

Referências

9. REFERÊNCIAS

ALOÉ F.; AZEVEDO A. P.; HASAN R. Mecanismos do ciclo sono-vigília. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 27, 2005.

AMIROUCHE A. et al. Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. **Endocrinology**, v.150, p. 286–294, 2009.

ANHE G. F. et al. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. **Journal of Neurochemistry**, n. 90, p. 559–566, 2004.

BAECHLE T. R.; EARLE R. W. Essentials of Strength Training and Conditioning. Champaign, Ill: Human Kinetics, 2000.

BAE M. J. et al. The association between shift work and health behavior: findings from the Korean National Health and Nutrition Examination Survey. **Korean Journal of Family Medicine**, v. 38, p. 86–92, 2017.

BIALEK P. et al. A myostatin and activin decoy receptor enhances bone formation in mice. **Bone**, v. 60, p. 162-71, 2014.

BIANCHI L; VOLPATO S. Muscle dysfunction in type 2 diabetes: a major threat to patient's mobility and independence. **Acta Diabetologica**, v.53, p. 879-889, 2016.

BODINE S. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, p. 1704–1708, 2001a.

BODINE S. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature Cell Biology**, v. 3, p. 1014–1019, 2001b.

BONALDO P.; SANDRI M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, p. 25-39, 2013.

BONORA E. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests and euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **The Journal of Clinic Endocrinology & Metabolism**, v. 68, p. 374–378, 1989.

BORGES L. S. et al. Melatonin decreases muscular oxidative stress and inflammation induced by strenuous exercise and stimulates growth factor synthesis. **Journal of Pineal Research**, v. 58, p. 166-172, 2008.

BOUXSEIN M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using microcomputed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, p.1468–1486, 2010.

BUIJS R. et al. Peripheral circadian oscillators: time and food. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 119, p. 83–103, 2013.

BUXTON O. M. et al. Adverse metabolic consequences in humans of prolonged sleep restriction combined with circadian disruption. **Science Translational Medicine**, n. 4, 129ra43, 2012.

CARDINALI D. P. et al. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. **Journal of Pineal Research**, v. 34, p. 81-87, 2003.

CARVALHEIRA J. B. et al. Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats. **Diabetes**, v. 51, p. 2002.

CHIBALIN A. V. et al. Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin receptor substrates 1 and 2. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, n. 97, p. 38–43, 2000.

CHO D. K.; CHOI D. H.; CHO J. Y. Effect of treadmill exercise on skeletal muscle autophagy in rats with obesity induced by a high-fat diet. **Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry**, v. 21, p. 26-34, 2017.

CIPOLLA-NETO J. et al. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **Journal of Pineal Research**, v. 56, p. 371–381, 2014.

CORNACHIONE A. S. et al. Characterization of Fiber Types in Different Muscles of the Hindlimb in Female Weanling and Adult Wistar Rats. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 44, p. 43–50, 2011.

COSTA G. Multidimensional aspects related to shiftworkers' health and well-being. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 86-91, 2004.

DA SILVA G. F. Qualidade óssea trabecular: caracterização por microtomografia 3D por raio-x. 2008. 35 f. Trabalho de conclusão de curso – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2008.

DE ALVARO C. et al. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p.17070-8, 2004.

DUNCAN N. D.; WILLIAMS D. A.; LYNCH G. S. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 77, p. 372–378, 1998.

ESQUIROL Y. et al. Shift work and metabolic syndrome: respective impacts of job strain, physical activity, and dietary rhythms. **Chronobiology International**, v. 26, p. 544–559, 2009.

ESQUIROL Y. et al. Shiftwork and higher pancreatic secretion: early detection of an intermediate state of insulin resistance? **Chronobiology International**, v. 29, p. 1258–1266, 2012.

FARIA P. E. et al. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. **Clinical Oral Implants Research**, v. 19, p. 393-401, 2008.

GALE J. E. et al. Disruption of circadian rhythms accelerates development of diabetes through pancreatic beta-cell loss and dysfunction. **Journal of Biological Rhythms**, v. 26, p. 423–433, 2011.

GAN Y. et al. Shift work and diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 72, p. 72-8, 2015.

GARCÍA-PALLARS, J.; IZQUIERDO, M. Strategies to optimize concurrent training of strength and aerobic fitness for rowing and canoeing. **Sports Medicine**, v. 41, n. 4, p. 329–343, 2011.

GOLDSTEIN B. J. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. **American Journal of Cardiology**, v. 90, p. 3G-10G, 2002.

GOMES M. D. et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, v. 98, p. 14440–14445, 2001.

GOMEZ-MORENO G. et al. Melatonin in diseases of the oral cavity. **Oral Diseases**, v. 16, p. 242–247, 2010.

GREIG C. A. et al. Blunting of adaptive responses to resistance exercise training in women over 75y. **Experimental Gerontology**, v. 46, p. 884–890, 2011.

HA E. et al. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. **Journal of Pineal Research**, n. 41, p. 67–72, 2006.

HOBSON J. A.; PACE-SCHOTT E. F. The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning. **Nature Reviews. Neuroscience**, n. 3, p. 679-93, 2002.

HONG Y. et al. Melatonin treatment combined with treadmill exercise accelerates muscular adaptation through early inhibition of CHOP-mediated autophagy in the gastrocnemius of rats with intra-articular collagenase-induced knee laxity. **Journal of Pineal Research**, v. 56, p. 175-188, 2014.

HORNBERGER T. A. J.; FARRAR R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 29, p. 16-31, 2004.

HOTAMISLIGIL G. S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 2409-15, 1995.

HOUWARD J. A. Effect of short-term exercise training on insulin-stimulated PI3-kinase activity in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 277, p. E1055–E1060, 1999.

IKA K. et al. Shift work and diabetes Mellitus among male workers in Japan: does the intensity of shift work matter? **Acta Medica Okayama**, v. 67, p. 25–33, 2013.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas, seventh edition, 2015.

IVY J. L. Exercise physiology and adaptations to training. In Handbook of Exercise in Diabetes. 2nd ed. Ruderman N, Devlin JT, Schneider SH, Kriska A, Eds. Alexandria, VA, American Diabetes Association, 2002, p. 23–62.

KADI F. et al. Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. **Muscle & Nerve**, v. 29, p. 120–127, 2004.

KANAZAWA I. et al. Osteoblast AMP-activated protein kinase regulates postnatal skeletal development in male mice. **Endocrinology**, v. 3, 2017.

KIM J. et al. Resting and load-induced levels of myogenic gene transcripts differ between older adults with demonstrable sarcopenia and young men and women. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, p. 2149–2158, 2005.

KIM J. et al., The Preventive Effects of 8 Weeks of Resistance Training on Glucose Tolerance and Muscle Fiber Type Composition in Zucker Rats. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 39, p. 424–433, 2015.

KIRWIN J. P. et al: Regular exercise enhances activation of IRS-1-associated PI3-kinase in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, p. 797–803, 2000.

KIVIMÄKI M.; BATTY G. D.; HUBLIN C. Shift work as a risk factor for future type 2 diabetes: evidence, mechanisms, implications, and future research directions. **PLoS Medicine**, v.8, p. e100–138, 2011.

KOHEI et al., Acute resistance exercise-induced IGF1 expression and subsequent GLUT4 translocation. **Physiological Reports**, v. 4, p: e12907, 2016.

KOYAMA H. et al. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, p. 1219–1229, 2002.

KULAR J. et al. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinical Biochemistry*, v. 45, p. 863-73, 2012.

KUMAR A.; BHATNAGAR S.; PAUL P. K. TWEAK and TRAF6 regulate skeletal muscle atrophy. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, n. 15, p. 233–239, 2012.

LADIZESKY M. G. et al. Melatonin effect on bone metabolism in rats treated with methylprednisolone. **Journal of Pineal Research**, v. 40, p. 297–304, 2006.

LEE N. K. et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. **Cell**, v. 130, p. 456-469, 2007.

LEPROULT R.; HOLMBÄCK U.; VAN CAUTER E. Circadian misalignment augments markers of insulin resistance and inflammation, independently of sleep loss. **Diabetes**, v. 63, p. 1860-1869, 2014.

LIMA, M. F. P. Efeitos da melatonina sobre a morfo-fisiologia do ovário de ratas submetidas à pinealectomia ou expostas à luz contínua. 1998. 107 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1998.

LIN X. et al. Night-shift work increases morbidity of breast cancer and all-cause mortality: a meta-analysis of 16 prospective cohort studies. **Sleep Medicine**, v. 16, p. 1381-1387, 2015.

LIRA F. S. et al. Chronic exercise decreases cytokine production in healthy rat skeletal muscle. **Cell Biochemistry and Function**, v. 27, p. 458-61, 2009.

LIU J.; HUANG F.; HR, H-W. Melatonin Effects on Hard Tissues: Bone and Tooth. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, p. 10063–10074, 2013.

LIVAK K. J.; SCHMITTGEN T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOKIREDDY S. et al. Myostatin induces degradation of sarcomeric proteins through a Smad3 signaling mechanism during skeletal muscle wasting. **Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 1936–1949, 2011.

LOPEZ-MARTINEZ F. et al. Melatonin: Bone metabolism in oral cavity. **International Journal of Dentistry**, v. 2012, 5 pages, 2012.

MAGANHIN C. C. Rat Pinealectomy: a modified direct visual approach. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 24, p. 321 – 324, 2009.

MENKES A. et al. Strength training increases regional bone mineral density and bone remodeling in middle-aged and older men. **Journal of Applied Physiology**, v. 74, p. 2478-2484, 1993.

MORALES M. G. et al. Angiotensin-(1-7) attenuates disuse skeletal muscle atrophy in mice via its receptor. **Disease Model & Mechanisms**, v. 9, p. 441-449, 2016.

MORIKAWA Y. et al. Shift work and the risk of diabetes mellitus among Japanese male factory workers. **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, v. 31, p. 179–183, 2005.

MORINE K. J. et al. Activin IIB receptor blockade attenuates dystrophic pathology in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, v. 42, p. 722-730, 2010.

MORRISON B. M. et al. A soluble activin type IIB receptor improves function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Experimental Neurology**, v. 217, p. 258-268, 2009.

NAKADE O. et al. Melatonin stimulates proliferation and type 1 collagen synthesis in human bone cells in vitro. **Journal of Pineal Research**, v. 27, p. 106-110, 1999.

NOGUEIRA T. C. et al. Absence of melatonin induces night-time hepatic insulin resistance and increased gluconeogenesis due to stimulation of nocturnal unfolded protein response. **Endocrinology**, v. 152, p. 1253-63, 2011.

OLSEN, S. et al. Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training. **The Journal of Physiology**, v. 573, p. 525–34, 2006.

ONER J. et al. Melatonin is as effective as testosterone in the prevention of soleus muscle atrophy induced by castration in rats. **Anatomical Record**, v. 291, p. 448-55, 2008.

OSMAN A. et al. Exercise training increases ERK3 activity in skeletal muscle of obese Zucker rats. **Journal of Applied Physiology**, n. 90, p. 454–460, 2001.

OSTROWSKA Z. et al. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats. **Endocrine Regulations**, v. 37, p. 211-24, 2003.

OYAMA J. et al. Bipedal ambulation induces experimental scoliosis in C57BL/6J mice with reduced plasma and pineal melatonin levels. **Journal of Pineal Research**, v. 40, p. 219-24, 2006.

OZTEKIN E. et al. The influence of estradiol and progesterone and melatonin supplementation on TNF-alpha levels in ovariectomized and pinealectomized rats. **Acta Biologica Hungarica**, v. 57, p. 275-81, 2006.

PAN A. et al. Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women. **PLoS Medicine**, v. 8, Article ID e1001141, 2011.

PANDA V. et al. Amelioration of Abnormalities Associated with the Metabolic Syndrome by Spinacia oleracea (Spinach) Consumption and Aerobic Exercise in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017:2359389. doi: 10.1155/2017/2359389. Epub 2017 Jul 16.

PARK J. J. et al. GRB14, GPD1, and GDF8 as potential network collaborators in weight loss-induced improvements in insulin action in human skeletal muscle. **Physiological Genomics**, v. 27, p. 114–21, 2006.

PATTI M. E.; KAHN C. R. The insulin receptor — a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 9, p. 89-109, 1998.

PAUL P. K. et al. Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. **The Journal of Cell Biology**, v. 191, p. 1395-1411, 2010.

PAUL P. K. et al. The E3 Ubiquitin Ligase TRAF6 Intercedes in Starvation-Induced Skeletal Muscle Atrophy through Multiple Mechanisms. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, p. 1248-1259, 2012.

PAULI J. R. et al. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 399-408, 2009.

PELOSI L. et al. Increased levels of interleukin-6 exacerbate the dystrophic phenotype in mdx mice. **Human Molecular Genetics**, v. 24, p. 6041-6053, 2015.

PETERSEN A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, p. 1154–1162, 2005.

PETERSON J. M. et al. NF- κ B signaling in skeletal muscle health and disease. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 96, p. 85–119, 2011

PETRELLA J. K. et al. Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *American journal of physiology*. **Endocrinology and Metabolism**, v. 291, p. E937–E946, 2006.

PICINATO M. C. et al. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. **Journal of Pineal Research**, n. 44. p. 88–94, 2008.

PICINATO M. C. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. **Journal of Pineal Research**, v. 33, p. 172-7, 2002.

POLIDAROVÁ L.; HOUDEK P.; SUMOVÁ A. Chronic disruptions of circadian sleep regulation induce specific proinflammatory responses in the rat colon. **Chronobiology International**, v. 17, p. 1-15, 2017.

POWERS S. K.; HOWLEY E. T. *Fisiologia do Exercício: Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desenvolvimento*. 5. ed. Barueri: Manole, 2005.

REITER R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 151–180, 1991.

RILEY L. A.; ESSER K. A. The Role of the Molecular Clock in Skeletal Muscle and What It Is Teaching Us About Muscle-Bone Crosstalk. **Current Osteoporosis Report**, v. 15, p. 222-230, 2017.

ROTH J. A. et al. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 22041–22047, 1999.

SAGHIZADEH M. et al. The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 15, p. 1111-6, 1996.

SANDRI M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology (Bethesda)**, v. 23, p. 160-170, 2008.

SARTORI R. et al. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 296, p. C1248-1257, 2009.

SATOMURA K. et al. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation *in vitro* and promotes mouse cortical bone formation *in vivo*. **Journal of Pineal Research**, v. 42, p. 231–239, 2007.

SCHIAFFINO S. et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **The FEBS Journal**, v. 280, p. 4294-4314, 2013.

SCHOENFELD B. J. et al. Is there a minimum intensity threshold for resistance training-induced hypertrophic adaptations? **Sports Medicine**, v. 43, p. 1279-88, 2013.

SERAPHIN P. M. et al. Quantification of GLUT4 transporter in insulin-sensitive tissue from pinealectomized rats. Pineal Update: from Molecular Mechanisms to Clinical Implications. Webb SM, Puig-Domingo M, Moller M, Pe´vet P, eds. PJD Publications Ltd, Westbury, 1997; pp.99–107.

SERAPHIN P. M.; NUNES M. T.; MACHADO U. F. GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1353-62, 2001.

SETHI S. et al. Determination of the minimal melatonin exposure required to induce osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells and these effects on downstream signaling pathways. **Journal of Pineal Research**, v. 49, p. 222–238, 2010.

SHENKMAN B. S. et al. Calpain-dependent regulation of the skeletal muscle atrophy following unloading. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 584, p. 36-41, 2015.

SHIMIZU N. et al. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. **Cell Metabolism**, v. 13, p. 170–182, 2011.

SIGAL, R. J. et al. Physical activity/exercise and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 2518 – 2539, 2004.

SNIJDERS, T.; VERDIJK, L. B.; VAN LOON, L. J. C. The impact of sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells. **Ageing Research Reviews**, v. 8, p. 328–338, 2009.

STEFULJ J. et al. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. **Journal of Pineal Research**, v. 30, p. 243–247, 2001.

STRATOS I. et al. Melatonin restores muscle regeneration and enhances muscle function after crush injury in rats. **Journal of Pineal Research**, v. 52, p. 62-70, 2012.

TAN D. X. et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. **Journal of Pineal Research**, v. 34, p. 75-78, 2003.

TANDO T. et al. Smad2/3 Proteins Are Required for Immobilization-induced Skeletal Muscle Atrophy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, p. 12184-12194, 2016.

TANG J. E. et al. Resistance training alters the response of fed state mixed muscle protein synthesis in young men. *American journal of physiology*. **Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 294, p. R172–R178, 2008.

TERADA S. et al. Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, p. 2019–2024, 2001.

TOUITOU Y.; REINBERG A.; TOUITOU D. Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: health impacts and mechanisms of circadian disruption. **Life Sciences**, v. 173, p. 94-106, 2017.

TRENDELENBURG A. U. et al. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. **Cell Physiology - American Journal of Physiology**, v. 296, p. C1258–C1270, 2009.

TURNER C. H.; BURR D. B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. **Bone**, v. 14, p. 595-608, 1993.

ULHÔA M. A. et al. Shift work and endocrine disorders. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, 2015.

VAN DRONGELEN A. et al. The effects of shift work on body weight change - a systematic review of longitudinal studies. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, v. 37, p. 263–75, 2011.

WAGSTAFF A. S.; SIGSTAD LIE J. A. Shift and night work and long working hours: a systematic review of safety implications. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, v. 37, p. 173-85, 2011.

WANG Y et al. The Expression of Inflammatory Cytokines on the Aorta Endothelia Are Up-regulated in Pinealectomized Rats. **Inflammation**, v. 36, p. 1363–1373, 2013.

WATSON R. T.; PESSIN J. E. GLUT4 translocation: the last 200 nanometers. **Cell Signal**, v. 19, p. 2209-2217, 2007.

WELLE S. et al. Muscle growth after postdevelopmental myostatin gene knockout. *American Journal of Physiology*. **Endocrinology and Metabolism**, v. 292, p. E985-991, 2007.

WHITTEMORE L. A. et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 300, p. 965-971, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, editor. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009.

WHO Study Group on Prevention of Diabetes Mellitus, editor. Prevention of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization; 1994.

YOUNG J. et al. Control of type 1 diabetes mellitus and shift work. **Occupational Medicine**, n. 63, p. 70-72, 2013.

ZANQUETTA M. M. et al. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. **Journal of Pineal Research**, v. 35, p. 141–148, 2003.

ZECCHIN H. G.; CARVALHEIRA J. B. C.; SAAD M. J. A. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 14, p. 574-589, 2004.

ZINMAN B. et al. Circulating tumor necrosis factor-alpha concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 272-8, 1999.

Anexos

10. ANEXOS

10.1. Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito do exercício nas células satélite de animais pinealectomizados", Processo FOA nº 2014-00939, sob responsabilidade de Dóris Hissako Sumida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Junho de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Março de 2017.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Abril de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Effect of exercise on satellite cells of pinealectomized animals", Protocol FOA nº 2014-00939, under the supervision of Dóris Hissako Sumida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 24, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 30, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 30, 2017.

Profa. Adj. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-Coordinator