

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

2022

**Papel emergente da rev-erb- α nas
adaptações moleculares a diferentes
modelos de exercício físico**



PPGRDF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
REABILITAÇÃO E DESEMPENHO FUNCIONAL
FMRP-USP



Alisson Luiz da Rocha

Tese
Doutorado

ALISSON LUIZ DA ROCHA

**PAPEL EMERGENTE DA REV-ERB- α NAS ADAPTAÇÕES MOLECULARES A
DIFERENTES MODELOS DE EXERCÍCIO FÍSICO**

Versão corrigida da Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Adelino Sanchez Ramos da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Donato Americo Rivas

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

da Rocha, Alisson Luiz

Papel emergente da rev-erb- α nas adaptações moleculares a diferentes modelos de exercício físico, 2022.

77 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Reabilitação e Desempenho Funcional.

Orientador: Da Silva, Adelino Sanchez Ramos.

Nome: DA ROCHA, Alisson Luiz

Título: Papel emergente da rev-erb- α nas adaptações moleculares a diferentes modelos de exercício físico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para título de Doutor no Programa de Pós Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A gratidão é muito importante em nossas vidas para nos mostrar que nada é realizado sozinho, e que nenhuma conquista tem significado se não refletir para alguém também.

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por todas as experiências e aprendizados que me proporcionou durante todo esse período, evoluí muito. Em sequência queria agradecer a minha família (pai, mãe e irmã) que me deram todo o suporte possível e inimaginável durante todos os anos da minha vida, através de amor, conselhos, paciência e sabedoria. Nada disso seria possível sem vocês, tudo isso é fruto do vosso amor. Agradeço também a minha esposa, Beatriz Tiburcio Silva Brosco, se mostrando presente em todos os momentos, desde os dias mais difíceis até os mais espetaculares. Foi de extrema importância sua contribuição em diversos sentidos, que vão desde intelectuais até motivacionais e afetivos. Sua presença em minha vida trouxe a serenidade que todo homem necessita para alcançar seus sonhos.

Agradeço ao meu orientador, Adelino Sanchez Ramos da Silva, que além da função de orientador, por muitas vezes se colocou na posição de amigo com conselhos não só profissionais, mas também na vida como um todo. Obrigado por sua confiança no meu trabalho e por acreditar em mim. Agradeço também aos meus companheiros de laboratório (Ana Paula Pinto, Gustavo Paroschi Morais, Bruno Marafon, Luciana Oliveira e Rafael Lemes), que na verdade se tornaram grandes amigos, dentro e fora do ambiente de trabalho. Vocês foram sensacionais, cada ajuda e contribuição foi fundamental para que esse trabalho se concretizasse. Muito obrigado aos meus amigos, em especial a Eike Bianchi Kohama, Henrique Sanches Panobianco e Rodrigo Aquino, que estão junto comigo nessa trajetória há mais de 12 anos, desde o início da graduação. Essa tese é a somatória de diversos fatores em minha vida, e com certeza vocês tiveram participação fundamental.

Agradeço a professora Giovana Rampazo Teixeira, Lilian Eslaine da Silva, Sônia Zanon e Ruither Carolino, que foram parceiros na realização dessa tese, contribuindo com a realização de análises e discussão enriquecedoras para a confecção deste trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma ajudaram e contribuíram para a realização dessa fase em minha vida. Existem muitos nomes, mas com certeza quem participou sabe de sua importância.

Agradeço a CAPES. Agradeço à FAPESP pelo seu suporte financeiro (2017/12765-2), que proporcionou todo amparo para que o melhor sempre fosse realizado.

RESUMO

DA ROCHA, AL. **Papel emergente da rev-erb- α nas adaptações moleculares a diferentes modelos de exercício físico.** 2022. 78f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Recentemente foi evidenciado que o receptor nuclear rev-erb- α possui importante papel na adaptação da capacidade oxidativa do músculo esquelético, modulando a via de sinalização da AMPK. O exercício físico de *endurance* classicamente é capaz de ativar essa via de sinalização, porém os efeitos desse e de outros modelos de exercício físico (força e exaustivo) sobre a rev-erb- α permanecem desconhecidos. Além da regulação a nível transcricional dessa via de sinalização, já foi demonstrado que a rev-erb- α também é capaz de regular negativamente a autofagia no músculo esquelético e a biossíntese de dopamina no hipocampo. Sugere-se na literatura que a dopamina, juntamente com a serotonina, possui papel no desenvolvimento da fadiga cognitiva. Resumidamente, a rev-erb- α é candidata a modular as adaptações moleculares que medeiam o desempenho físico, fadiga do SNC e autofagia. Dessa maneira, a presente tese de doutorado tem como objetivo principal investigar o papel da rev-erb- α nas adaptações moleculares induzidas por diferentes modelos de exercício que regulam o desempenho físico, fadiga do SNC e autofagia. Os camundongos foram divididos em 4 grupos para o exercício agudo e 1 grupo controle (CT; sedentários): *endurance* (END; submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbico contínuo), intervalado (INT; submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbico intervalado), força (FOR; submetidos ao protocolo de exercício físico de força) e exaustivo (EX; submetidos ao protocolo de corrida até a exaustão); 1 grupo para o exercício físico crônico – *overtraining* (OT; submetidos ao protocolo de *overtraining*) e 1 grupo controle – sedentários (SED). Os métodos utilizados foram: *immunoblotting*, RTqPCR e ELISA. Foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$ para os testes estatísticos utilizados. De maneira geral a Rev-erb- α foi extremamente sensível ao estímulo de exercício físico, inclusive a diferentes modelos, intensidades e volumes, tanto no músculo esquelético, quanto no hipocampo. Além disso, essa molécula apresentou adaptações em respostas ao *overtraining*, sugerindo que possa participar no desenvolvimento do estado de *overreaching* não-funcional (NFOR). A via da quinurenina (KYN) também foi sensível a sessão de exercício físico exaustiva, apresentando alterações para um perfil de produção de metabólitos neuro-tóxicos pelo gastrocnêmio. Interessantemente, foi evidenciada uma relação inédita entre a Rev-erb- α e a via da KYN. Portanto, a Rev-erb- α se apresenta como uma molécula importante e com várias atuações nas adaptações moleculares aos diferentes modelos de exercício físico.

Palavras-chave: rev-erb- α , exercício físico, overtraining, fadiga, autofagia, quinurenina.

ABSTRACT

DA ROCHA, AL. **Emerging role of rev-erb- α in molecular adaptations to different physical exercise models.** 2022. 78 pages. Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2022.

Recently, the nuclear receptor rev-erb- α has been considered to play an important role in the skeletal muscle oxidative capacity adaptation, modulating the AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway. Classically, endurance physical exercise is able to activate this signaling pathway, but the effects of this and other physical exercise models (i.e., resistance and exhaustive) on rev-erb- α remain unknown. Besides the transcriptional regulation of this signaling pathway, rev-erb- α is also capable to regulate negatively the autophagy pathway in skeletal muscle and the dopamine biosynthesis in hippocampus. It is suggested in the literature that dopamine, together with serotonin, play a role in cognitive fatigue development. Briefly, rev-erb- α is candidate to modulate the molecular adaptations that regulate physical performance, CNS fatigue and autophagy. Thus, the main aim of the present thesis was to investigate the role of rev-erb- α in the molecular adaptations that regulate physical performance, CNS fatigue and autophagy after different exercise models. Mice were divided as follow: into 1 control group (CT, sedentary) and 4 groups to acute exercise endurance (END, submitted to continuous aerobic physical exercise protocol), interval (INT, submitted to interval aerobic exercise protocol), strength (FOR, submitted to strength physical exercise protocol) and exhaustive (EX; submitted to exhaustive running protocol); 1 group for chronic exercise training – overtraining (OT) and 1 sedentary group (SED). The following methodologies were used: immunoblotting, real-time polymerase chain reaction (qPCR) and ELISA. The level of significance of $p < 0.05$ was adopted. In general, Rev-erb- α was extremely sensitive to physical exercise stimuli, including different models, intensities and volumes, both in skeletal muscle and in the hippocampus. In addition, this molecule showed adaptations in responses to overtraining, suggesting that it may participate in the development of the NFOR state. The kynurenine (KYN) pathway was also sensitive to the exhaustive physical exercise session, showing a shift to a neurotoxic metabolite production profile in the gastrocnemius. Interestingly, an inedited relationship between Rev-erb- α and the KYN pathway was evidenced. Therefore, Rev-erb- α shows as an important molecule with several actions in molecular adaptations to different models of physical exercise.

Keywords: rev-erb- α ; physical exercise; overtraining; fatigue; autophagy; kynurenine;

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo da sessão de treino aeróbio contínuo.....	23
Tabela 2. Protocolo da sessão de treino aeróbio intervalado.....	24
Tabela 3. Protocolo da sessão de treino de força.....	24
Tabela 4. Protocolo de <i>overtraining</i>	25
Tabela 5. Tabela dos nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interação entre as vias moleculares responsáveis pelas adaptações musculares em diferentes modelos de treinamento.....	14
Figura 2. Via da quinurenina e seus principais metabólitos.....	18
Figura 3. Passo e principais proteínas responsáveis pelos eventos da autofagia.....	20
Figura 4. Relação entre o exercício físico e a autofagia.....	20
Figura 5. Delineamento experimental 1.....	29
Figura 6. Delineamento experimental 2.....	30
Figura 7. Padrão oscilatório dos níveis de RNAm da <i>rev-erb-α</i> segundo <i>zeitberg time</i> (ZT).....	30
Figura 8. Média \pm erro padrão médio. (A) Peso corporal dos grupos experimentais. (B) Resultado do teste de carga incremental para definição da P _{máx} . (C) Representação gráfica das características do protocolo de exercício físico de <i>endurance</i> (END) e intervalado (INT). (D) Demonstração das cargas de treino utilizadas no protocolo de exercício de força. (E) Variação da glicemia pré e pós sessão aguda de exercício físico. (F) Volume de treino dos diferentes protocolos de exercício físico realizado na esteira.....	32
Figura 9. Média \pm erro padrão médio. (A) Peso corporal dos grupos experimentais crônicos na semana 8. (B) Resultados do teste de carga incremental para definição da P _{máx} . (C) Resultados do teste de Rotarod.....	32
Figura 10. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm (A) <i>Nr1d1</i> vs grupos no gastrocnêmio, (B) <i>Nr1d1</i> vs tempo no gastrocnêmio, (C) <i>Nr1d1</i> vs grupos no sóleo, (D) <i>Nr1d1</i> vs tempo no sóleo, (E) <i>Nr1d1</i> vs grupos no hipocampo, (F) <i>Nr1d1</i> vs tempo no hipocampo.....	34
Figura 11. Média \pm erro padrão médio. Conteúdo proteico de (A) Rev-erb- α vs. Grupos e (B) Rev-erb- α vs. tempo.....	35
Figura 12. Média \pm erro padrão médio. Conteúdo proteico de (A) Rev-erb- α nuclear vs. Grupos, (B) Rev-erb- α citosólica vs. Grupos e (C) teste de contaminação do extrato nuclear e citosólico no gastrocnêmio.....	36
Figura 13. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm, relativo ao grupo controle, dos genes <i>Atg5</i> , <i>Bnip3</i> , <i>Map1lc3b</i> , <i>Ulk1</i> e <i>Sqstm1p</i> no (A) gastrocnêmio, (B) sóleo e (C) hipocampo em resposta a diferentes modelos de exercício físico.....	38

Figura 14. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de <i>Nr1d1</i> no gastrocnêmio (A e B), sóleo (C e D) e hipocampo (E e F).....	39
Figura 15. Média \pm erro padrão médio. Conteúdo proteico de (A e B) Rev-erb- α total, (C e D) p-Rev-erb- α e (E e F) razão fosforilada/total no gastrocnêmio.....	40
Figura 16. Média \pm erro padrão médio. Conteúdo proteico de (A) Rev-erb- α nuclear, (B) Rev-erb- α citosólica e (C) teste de contaminação do extrato nuclear e citosólico no gastrocnêmio imediatamente ao final da sessão de exercício físico exaustivo.....	41
Figura 17. Média \pm erro padrão médio. Conteúdo proteico de (A e B) Rev-erb- α total, (C e D) p-Rev-erb- α e (E e F) razão fosforilada/total no hipocampo.....	42
Figura 18. Média \pm erro padrão médio. Concentração de (A e B) serotonina e (C e D) dopamina no hipocampo.....	43
Figura 19. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de (A e B) <i>Th</i> e (C e D) <i>Slc18a2</i> no hipocampo. Níveis proteicos de (A e B) <i>Tyrosine hydroxylase</i> e (C e D) <i>Synaptic vesicular amine transporter</i> no hipocampo.....	44
Figura 20. Média \pm erro padrão médio. Concentração de triptofano (TRP) no (A) gastrocnêmio, (B) soro e (C) hipocampo; quinurenina (KYN) e ácido quinurênico (KYNA) no (D) gastrocnêmio, (E) soro e (F) hipocampo; razão KYN/TRP no (G) gastrocnêmio, (H) soro e (I) hipocampo imediatamente após sessão de exercício físico exaustivo.....	45
Figura 21. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de (A e B) <i>Kyat1</i> e (C e D) <i>Kmo</i> no gastrocnêmio. Conteúdo proteico de (E e F) <i>Kynurenine aminotransferase I</i> e (G e H) <i>Kynurenine 3-monooxygenase</i> no gastrocnêmio.....	46
Figura 22. Correlação entre o conteúdo proteico de Rev-erb- α e RNAm de: <i>Nr1d1</i> , <i>Pparg1a</i> , <i>Kmo</i> e <i>Kyat1</i> ; e conteúdo proteico de: <i>Kynurenine 3-monooxygenase</i> e <i>Kynurenine aminotransferase I</i> no gastrocnêmio.....	47
Figura 23. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de (A e B) <i>Kyat1</i> e (C e D) <i>Kmo</i> no hipocampo. Conteúdo proteico de (E e F) <i>Kynurenine aminotransferase I</i> e (G e H) <i>Kynurenine 3-monooxygenase</i> no hipocampo.....	48
Figura 24. Média \pm erro padrão médio. Concentrações de triptofano (TRP) no (A) gastrocnêmio, (B) soro e (C) hipocampo; quinurenina (KYN) e ácido quinurênico (KYNA) no (D) gastrocnêmio, (E) soro e (F) hipocampo; razão KYN/TRP no (G) gastrocnêmio, (H) soro e (I) hipocampo; (J)	

serotonina (5-HT) e (K) dopamina (DOPA) no hipocampo de animais tratados por 3 dias consecutivos com Veículo (cromophor 15%) ou SR9009.....49

Figura 25. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de *Nr1d1*, *Kyat1* e *Kmo* no (A) gastrocnêmio e (B) hipocampo. Conteúdo proteico de Rev-erb- α , p- Rev-erb- α e razão entre fosforilada e total no (C) gastrocnêmio e (D) hipocampo. Conteúdo de *Indoleamine 2,3-dioxygenase 1* (Ido-1), *Kynurenine aminotransferase* (Kat1) e *Kynurenine 3-monooxygenase* (Kmo) no (E) gastrocnêmio e (F) hipocampo.....50

Figura 26. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de *Nr1d1* no (A e B) gastrocnêmio e (C e D) hipocampo em grupos sedentários e submetidos ao protocolo de *overtraining* em diferentes horários do ciclo circadiano.....51

Figura 27. Média \pm erro padrão médio. Conteúdo proteico de (A e B) Rev-erb- α total, (C e D) p-Rev-erb- α e (E e F) razão fosforilada/total no gastrocnêmio de animais sedentários e submetidos ao protocolo de *overtraining*.....52

Figura 28. Média \pm erro padrão médio. Conteúdo proteico de (A e B) Rev-erb- α total, (C e D) p-Rev-erb- α e (E e F) razão fosforilada/total no hipocampo de animais sedentários e submetidos ao protocolo de *overtraining*.....53

Figura 29. Média \pm erro padrão médio. Concentrações de (A) triptofano (TRP), (B) quinurenina (KYN) e ácido quinurênico (KYNA) no soro e, (C) serotonina (5-HT) e (D) dopamina (DOPA) no hipocampo de animais sedentário e submetidos ao protocolo de *overtraining*.....54

Figura 30. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de (A e B) *Kyat1* e (C e D) *Kmo* no hipocampo. Conteúdo proteico de (E e F) *Kynurenine aminotransferase I* e *Kynurenine 3-monooxygenase* no gastrocnêmio.....55

Figura 31. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de (A e B) *Kyat1* e (C e D) *Kmo* no hipocampo. Conteúdo proteico de (E e F) *Kynurenine aminotransferase I* e (G e H) *Kynurenine 3-monooxygenase* no hipocampo.....56

Figura 32. Média \pm erro padrão médio. Concentrações de (A) serotonina (5-HT) e (B) dopamina (DOPA) no hipocampo de animais sedentários e submetidos ao protocolo de *overtraining* nos horários 00:00 (fase ativa) e 12:00 (fase inativa). Conteúdo proteico de (C e D) *Tyrosine hydroxylase* e (E e F) *Synaptic vesicular monoamine transporter* no hipocampo.....57

LISTA DE ABREVIATURAS

3-HK – 3-hidroxiquinurenina

5-HT – serotonina

AMPK – *AMP-activated protein kinase*

ATP – Adenosina trifosfato

CT – controle

DOPA – dopamina

ELISA - *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*

END – endurance

EX – exaustivo

FOR – força

IB – *immunoblotting*

INT – intervalado

KAT – *kynurenine aminotransferase*

KO – knockout

KYN – quinurenina

KYNA – ácido quinurênico

mTOR – *mammalian target of rapamycin*

NFOR – *overreaching* não funcional

NR1D1 – *nuclear receptor subfamily 1 group D member 1*

OT – *overtraining*

PGC-1 α – *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α*

SE – sedentário

SIRT1 – *Sirtuin 1*

SNC – Sistema nervoso central

TCI – teste de carga incremental

TH – *tyrosine hydroxylase*

TRP – triptofano

ZT – *zeitberg time*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Exercício físico e adaptações moleculares.....	13
1.2	Exercício físico exaustivo e adaptações moleculares.....	15
1.3	Exercício físico e fadiga.....	16
1.3.1	Fadiga cognitiva.....	16
1.3.2	Via da quinurenina.....	17
1.4	Exercício físico e autofagia.....	19
2.	OBJETIVO GERAL.....	22
3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1	Animais experimentais.....	23
4.2	Protocolos de exercício físico agudo e <i>overtraining</i>	23
4.2.1	Protocolo de exercício físico aeróbio contínuo.....	23
4.2.2	Protocolo de exercício físico aeróbio intervalado.....	24
4.2.3	Protocolo de exercício físico de força.....	24
4.2.4	Protocolo de exercício físico exaustivo.....	25
4.2.5	Protocolo de <i>overtraining</i>	25
4.3	Avaliação do desempenho físico.....	25
4.3.1	Teste de carga incremental.....	25
4.3.2	Teste do rotarod.....	26
4.4	Coleta de sangue e extração dos músculos esqueléticos e hipocampo.....	26
4.5	Técnica de <i>immunoblotting</i>	26
4.6	Técnica de <i>Real time-quantitative PCR</i>	26
4.7	Análise por ELISA.....	27
4.8	Análise dos resultados.....	28
5.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
5.1	Experimento 1.....	29
5.2	Experimento 2.....	29

5.3	Experimento 3.....	30
6.	RESULTADOS.....	31
6.1	Características dos grupos referentes ao experimento 1.....	31
6.2	Características dos grupos submetidos ao experimento 2.....	31
6.3	Respostas do <i>Nr1d1</i> e da <i>rev-erb-α</i> aos diferentes modelos de exercício físico.....	32
6.4	Respostas dos genes relacionados a autofagia induzidos por diferentes modelos de exercício físico.....	36
6.5	Respostas do <i>Nr1d1</i> e da <i>rev-erb-α</i> ao exercício exaustivo.....	38
6.6	Resposta da 5-HT, DOPA e genes/proteínas da via dopaminérgica.....	42
6.7	Respostas dos metabólitos, genes e proteínas da via da KYN ao exercício físico exaustivo.....	44
6.8	Respostas dos metabólitos, genes e proteínas ao tratamento com SR9009.....	48
6.9	Respostas do <i>Nr1d1</i> e da <i>rev-erb-α</i> ao <i>overtraining</i>	50
6.10	Respostas dos metabólitos, genes e proteínas da via da KYN ao <i>overtraining</i>	53
6.11	Respostas da 5-HT, DOPA e proteínas relacionadas a via dopaminérgica ao <i>overtraining</i>	56
7	DISCUSSÃO.....	58
8.	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

Recentes estudos com foco nas adaptações moleculares em resposta ao exercício físico conseguiram elucidar muitas questões que até então apresentavam respostas incompletas e/ou nebulosas (EGAN; HAWLEY; ZIERATH, 2016; EGAN; ZIERATH, 2013; HAWLEY; KROOK, 2015). O exercício físico é capaz de estimular grandes alterações no corpo humano, que vão desde a prevenção/tratamento de doenças como diabetes, hipertensão e obesidade (PEDERSEN; SALTIN, 2015) até o desenvolvimento das capacidades físicas dos atletas de elite. Todas essas adaptações podem ser justificadas em nível molecular.

1.1 *Exercício físico e adaptações moleculares*

O músculo esquelético demonstra grande capacidade de adaptação e remodelamento em resposta ao exercício físico, o que culmina em alterações em diversos parâmetros como na função e tipagem das fibras contráteis, densidade mitocondrial, regulação metabólica, além de vias de sinalização intracelular e atividade transcricional (EGAN; ZIERATH, 2013). Todas essas adaptações são específicas ao tipo de treinamento físico realizado. Embora existam diversos modelos que caracterizam os estímulos de treinamento, a literatura clássica didaticamente considera os seguintes:

- Treino de *endurance* → induz o aumento da capacidade aeróbia, biogênese mitocondrial e conversão para fibras com características oxidativas;
- Treino de força → induz o aumento de síntese proteica, hipertrofia muscular e aumento da máxima força contrátil;

Existem certas moléculas que possuem papel central e coordenam todas as vias de sinalização intracelular que culminam nas adaptações citadas anteriormente. A *AMP-activated protein kinase* (AMPK) é uma enzima importante no controle da homeostase energética intracelular, sendo sensível ao aumento na razão do conteúdo de adenosina monofosfato (AMP) / adenosina trifosfato (ATP), ou seja, à diminuição da disponibilidade energética. Essa é uma proteína chave que modula principalmente as adaptações em resposta ao treinamento de *endurance* (JØRGENSEN; RICHTER; WOJTASZEWSKI, 2006). Já a *mammalian target of rapamycin* (mTOR) é uma proteína que controla as adaptações ao treinamento de força, sendo estimulada por sinais anabólicos como por exemplo a insulina, o hormônio do crescimento (GH) e a concentração de aminoácidos. A figura 1 resume a interação das vias moleculares em resposta aos diferentes modelos de treinamento.

Recentemente, Woldt e colaboradores (WOLDT; SEBTI; SOLT; DUHEM *et al.*, 2013) evidenciaram o papel central de uma proteína emergente na capacidade oxidativa do músculo esquelético, o receptor nuclear rev-erb- α . Essa proteína, codificada pelo gene *nuclear receptor subfamily 1 group D member 1 (Nr1d1)*, é um potente repressor transcricional, sendo capaz de controlar o padrão de expressão de certos genes (REYNOLDS; O'SHAUGHNESSY; HENDRICH, 2013). Estudos anteriores descreveram sua função relacionada ao ritmo circadiano (EVERETT; LAZAR, 2014) e à regulação do metabolismo hepático e tecido adiposo marrom (CHO; ZHAO; HATORI; RUTH *et al.*, 2012). Porém, com essa recente descoberta (WOLDT; SEBTI; SOLT; DUHEM *et al.*, 2013), a rev-erb- α atingiu um patamar de extrema importância para as adaptações do músculo esquelético em resposta ao exercício físico agudo e crônico.

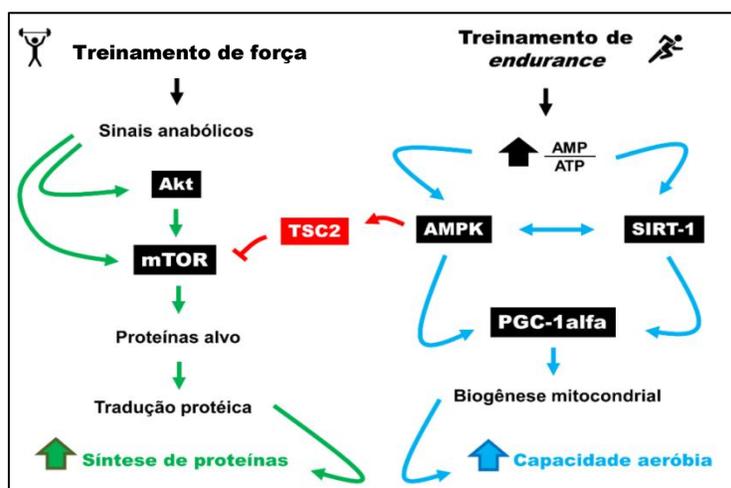


Figura 1. Interação entre as vias moleculares responsáveis pelas adaptações musculares em diferentes modelos de treinamento. **Fonte:** Próprio autor.

Em seu estudo, Woldt e colaboradores (WOLDT; SEBTI; SOLT; DUHEM *et al.*, 2013) demonstraram que essa proteína possui papel central na ativação da via de sinalização da AMPK - Sirtuin 1 (SIRT1) - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α (PGC-1 α), sendo responsiva ao treinamento físico de *endurance*, principalmente em músculos de característica oxidativa. Quando ativada farmacologicamente pelo seu agonista SR9009, a rev-erb- α demonstrou ser capaz de induzir um aumento no desempenho físico, conteúdo e capacidade de respiração mitocondrial.

Considerando que no esporte de alto nível o principal objetivo de qualquer programa de treinamento é a maximização e manutenção do desempenho físico, a compreensão das respostas da rev-erb- α após diferentes modelos de exercício físico agudo contribuirá para a elucidação dos

mecanismos moleculares responsáveis por essas adaptações almeçadas. Dessa forma, duas questões científicas merecem destaque:

- a) *O tipo de exercício físico agudo, endurance/força, provoca respostas diferentes na rev-erb- α no músculo esquelético?*
- b) *A resposta da rev-erb- α no músculo esquelético é dependente da intensidade do exercício físico agudo?*

1.2 Exercício físico exaustivo e adaptações moleculares

No decorrer de qualquer programa de treinamento físico, a busca pelo aumento do desempenho pode provocar adaptações negativas no atleta. O desequilíbrio entre o excesso de exercício físico, também denominado de *overtraining* (OT), e o período necessário para a recuperação do atleta pode acarretar no aparecimento da fadiga extrema (ARMSTRONG; VANHEEST, 2002) e no desenvolvimento do estado de *overreaching* não funcional (NFOR), definido como uma queda de desempenho que pode ser revertida após semanas ou meses de recuperação e está associada com distúrbios psicológicos, fisiológicos e bioquímicos (MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY *et al.*, 2013).

Nosso grupo de pesquisa tem utilizado o modelo animal para investigar os efeitos do OT ou exercício físico crônico exaustivo nas vias de sinalização intracelular em diferentes tecidos, evidenciando diversas modulações. Além de induzir uma queda de desempenho expressiva (PEREIRA; LUCAS; DA ROCHA; PAULI *et al.*, 2015), nosso protocolo de exercício físico crônico exaustivo baseado em corrida em declive também provocou:

- Inflamação no soro, músculo esquelético, hipotálamo, fígado (DA ROCHA; PINTO; TEIXEIRA; PEREIRA *et al.*, 2017; PEREIRA; DA ROCHA; PAULI; ROPELLE *et al.*, 2015) e coração (DA ROCHA; TEIXEIRA; PINTO; DE MORAIS *et al.*, 2018);
- *Up-regulation* da via de sinalização da mTOR no fígado, contribuindo para o aumento do conteúdo de gordura hepática (DA ROCHA; PINTO; TEIXEIRA; PEREIRA *et al.*, 2017);
- *Down-regulation* da via de sinalização da mTOR no músculo esquelético, levando a sinais de atrofia muscular (DA ROCHA; PEREIRA; PAULI; DE SOUZA *et al.*, 2016);
- Prejuízo na via de sinalização da insulina em músculo esquelético (PEREIRA, BRUNO CESAR; DA ROCHA, ALISSON LUIZ; PINTO, ANA PAULA; PAULI, JOSÉ RODRIGO *et al.*, 2016);

- Aumento no estresse do retículo endoplasmático em músculo esquelético e hipotálamo (PEREIRA, BRUNO C; DA ROCHA, ALISSON L; PINTO, ANA P; PAULI, JOSÉ R *et al.*, 2016; PINTO; DA ROCHA; PEREIRA; OLIVEIRA *et al.*, 2017)
- Índícios de hipertrofia patológica no músculo cardíaco (DA ROCHA; TEIXEIRA; PINTO; DE MORAIS *et al.*, 2018);

Interessantemente, todas essas alterações sugerem uma desregulação em nível molecular que pode contribuir com a queda de desempenho que é resultado do exercício físico crônico exaustivo. Embora os mecanismos responsáveis pela diminuição do desempenho em resposta ao exercício físico crônico exaustivo ainda não estejam totalmente elucidados, os dados de Woldt e colaboradores (WOLDT; SEBTI; SOLT; DUHEM *et al.*, 2013) sugerem que a *rev-erb-α* possui papel fundamental na regulação das adaptações positivas ao treinamento. Além disso, os animais *knockout* (KO) para *rev-erb-α* apresentaram redução na capacidade de sustentar exercícios físicos de longa duração e exibiram menor consumo de oxigênio máximo ($VO_{2máx}$). Dessa forma, a *rev-erb-α* pode ser considerada uma candidata para explicar as adaptações responsáveis pela diminuição do desempenho decorrente do exercício físico exaustivo. Para investigar essa hipótese, duas questões científicas precisam ser respondidas:

- a) *Qual a resposta da rev-erb-α no músculo esquelético após o exercício físico agudo exaustivo?*
- b) *Qual é o comportamento da rev-erb-α no músculo esquelético de camundongos no estado de NFOR induzido pelo exercício físico crônico exaustivo?*

1.3 Exercício físico e fadiga

1.3.1 Fadiga cognitiva

A realização do exercício físico de forma exaustiva acarreta no desenvolvimento da fadiga motora, sendo tradicionalmente definida como “esgotamento metabólico”, em que as concentrações de glicogênio muscular são depletadas, as concentrações de glicose plasmática reduzidas e ocorre elevação nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (MEEUSEN; WATSON; HASEGAWA; ROELANDS *et al.*, 2006). Acredita-se que a fadiga não seja totalmente de origem motora, mas também esteja relacionada com fatores do sistema nervoso central (SNC) (MEEUSEN; PIACENTINI, 2003; NYBO; SECHER, 2004). Em um estudo clássico, Newsholme e colaboradores (NEWSHOLME; ACWORTH; BLOMSTRAND, 1987) desenvolveram a teoria da serotonina para explicar os mecanismos associados com a fadiga cognitiva. Resumidamente, os

autores sugeriram que o exercício físico extenuante e de longa duração induz o aumento da atividade serotoninérgica no cérebro, acarretando em letargia e redução do recrutamento de unidades motoras, o que explicaria a incapacidade de sustentar a intensidade do exercício físico.

A serotonina juntamente com a dopamina são dois dos principais neurotransmissores que controlam a rede de atividade cerebral (VALLONE; PICETTI; BORRELLI, 2000). Ambos são incapazes de atravessar a barreira hematoencefálica, portanto, devem ser produzidos no próprio cérebro através dos seguintes aminoácidos precursores: triptofano (que se converte em serotonina) e fenilalanina (que se converte em tirosina e, posteriormente, em dopamina). Davis e Bailey (DAVIS; BAILEY, 1997) propuseram uma interação entre a serotonina e dopamina cerebral no desenvolvimento da fadiga em exercícios prolongados, salientando que a dopamina possui um papel importante na motivação, memória e atenção (MEEUSEN; WATSON; HASEGAWA; ROELANDS *et al.*, 2006). Além disso, Meeusen e colaboradores sugeriram fortemente que o aumento na razão do conteúdo de serotonina/dopamina está associado com os sentimentos de cansaço e letargia, podendo acelerar a instalação da fadiga.

Jager e colaboradores (JAGER; O'BRIEN; MANLOVE; KRIZMAN *et al.*, 2014) elegantemente demonstraram que a proteína *rev-erb- α* possui papel crucial na regulação dos genes dopaminérgicos no hipocampo de camundongos. Animais KO para *rev-erb- α* apresentaram aumento da tirosina hidroxilase (TH), enzima responsável pela conversão da tirosina em dopamina, sendo a TH considerada como fator limitante na síntese desse neurotransmissor. Nesse sentido, considerando o papel da razão serotonina/dopamina no desenvolvimento da fadiga do SNC e a função repressiva da *rev-erb- α* na síntese de dopamina no hipocampo, os seguintes questionamentos científicos merecem destaque:

- a) *Qual a resposta da rev-erb- α no hipocampo após uma sessão de exercício físico exaustivo?*
- b) *Qual a resposta da dopamina e serotonina após uma sessão de exercício físico exaustivo?*

1.3.2 Via da quinurenina

Além de o triptofano ser o precursor da síntese de serotonina no cérebro, esse aminoácido também é elemento chave na formação de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), molécula importante para produção de energia celular que é mediada pela via da quinurenina (BADAWY, 2017). Essa via é responsável por aproximadamente 90% da metabolização periférica do triptofano, ocorrendo principalmente no fígado, células imunes e músculo esquelético (MÜLLER;

SCHWARZ, 2007). A via da quinurenina, seus principais metabólitos e enzimas estão representados na figura 2.

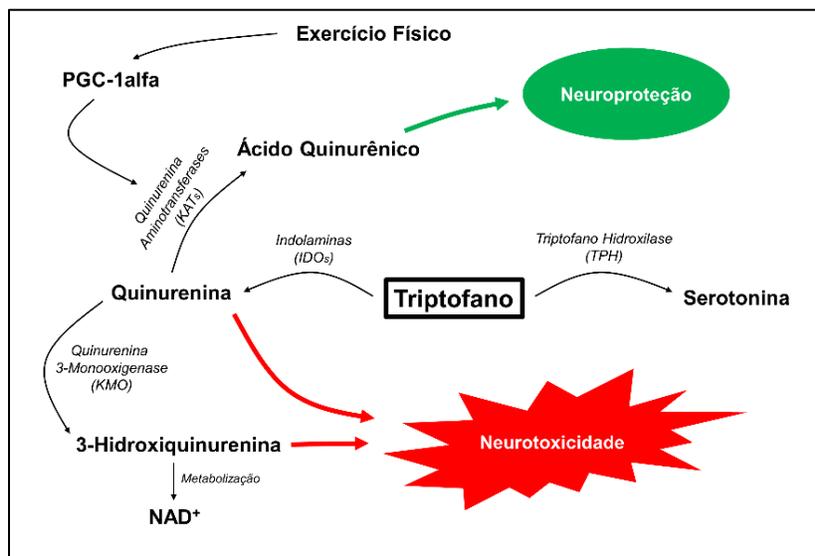


Figura 2. Via da quinurenina e seus principais metabólitos. O aminoácido triptofano pode ser metabolizado em serotonina ou quinurenina por enzimas específicas. Em seqüência, a quinurenina pode ser convertida em ácido quinurênico pelas quinurenina aminotransferases (KATs), que são estimuladas pela PGC-1 α ativada pelo exercício físico, ou para 3-HK que, juntamente com a própria quinurenina, possui efeito neurotóxico. **Fonte:** Próprio autor.

Altos níveis de quinurenina e seu metabólito 3-hidroxiquinurenina (3-HK) estão fortemente correlacionados com sintomas de depressão (MÜLLER; SCHWARZ, 2007). Essas moléculas são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e contribuir com o desenvolvimento da depressão através de características neurotóxicas, como modulação da morte neuronal e neuroinflamação (MYINT; KIM, 2014; SCHWARCZ; BRUNO; MUCHOWSKI; WU, 2012). A degradação do triptofano pela via da quinurenina é particularmente ativada por estresse e diretamente por fatores inflamatórios (GIBNEY; MCGUINNESS; PRENDERGAST; HARKIN *et al.*, 2013; LIU; SHENG; XU; LIU *et al.*, 2013). Strasser e colaboradores (STRASSER; GEIGER; SCHAUER; GATTERER *et al.*, 2016) sugeriram que elevados níveis da razão quinurenina/triptofano podem indicar uma limitação da disponibilidade de triptofano para biossíntese de serotonina no cérebro, provocando um desequilíbrio no balanço dos neurotransmissores e assim levando ao desenvolvimento de depressão e fadiga (WIDNER; LAICH; SPERNER-UNTERWEGER; LEDOCHOWSKI *et al.*, 2002).

Recentemente, Agudelo e colaboradores (AGUDELO; FEMENÍA; ORHAN; PORSMYR-PALMERTZ *et al.*, 2014) evidenciaram que a PGC-1 α muscular possui um efeito protetor no desenvolvimento da depressão através da ativação do eixo PGC-1 α - *peroxisome proliferator-*

activated receptor (PPAR). A ativação do fator de transcrição PPAR pelo exercício físico, juntamente com seu co-ativador PGC-1 α , é capaz de aumentar a expressão das quinurenina aminotransferases (KATs) musculares, que possuem a importante função de metabolizar a quinurenina em ácido quinurênico (HAN; CAI; TAGLE; LI, 2010). Esse metabólito, ao contrário da quinurenina, é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica (FUKUI; SCHWARCZ; RAPOPORT; TAKADA *et al.*, 1991), apresentando assim uma característica neuroprotetiva.

Como citado previamente no item 1.1, a *rev-erb- α* possui papel regulatório sobre a PGC-1 α (WOLDT; SEBTI; SOLT; DUHEM *et al.*, 2013), a qual pode modular a via da quinurenina diretamente através do exercício físico. Essa é uma importante relação entre o músculo esquelético e o cérebro que pode contribuir para a elucidação do desenvolvimento da fadiga do SNC. Dessa maneira, os seguintes questionamentos científicos merecem destaque:

- a) *A rev-erb- α é capaz de modular a via da quinurenina?*
- b) *Qual a resposta da via da quinurenina após uma sessão de exercício físico exaustivo?*

1.4 Exercício físico e autofagia

A autofagia preencheu o cenário científico mundial pelas recentes descobertas de Yoshinori Ohsumi sobre os mecanismos que a regulam, rendendo-lhe o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2016. De forma resumida, a autofagia é um mecanismo de proteção celular, que compõe algumas formas de entrega de substratos citoplasmáticos para degradação lisossomal (RUBINSZTEIN; MARIÑO; KROEMER, 2011), sendo esses substratos nocivos para o bom funcionamento da célula, caracterizando assim um mecanismo de reciclagem celular. A autofagia pode ser ativada pela restrição calórica (MORSELLI; MAIURI; MARKAKI; MEGALOU *et al.*, 2010), diminuição de fatores de crescimento (LUM; BAUER; KONG; HARRIS *et al.*, 2005) e exercício físico (HE; SUMPTER; LEVINE, 2012). A figura 3 demonstra os principais passos e proteínas responsáveis pela via autofágica.

A resposta autofágica ao exercício físico no músculo esquelético apresenta uma característica bifásica, caracterizada por um rápido aumento do fluxo autofágico que ocorre dentro de minutos a horas, sendo mediado por modificações pós-traducionais das proteínas responsáveis por essa via. Geralmente, após esse estímulo inicial, ocorre em longo prazo a ativação do programa transcricional dos genes autofágicos no sentido de potencializar essa resposta autofágica (VAINSHTEIN; HOOD, 2016). Interessantemente, He e colaboradores (HE; BASSIK; MORESI; SUN *et al.*, 2012) também demonstraram que o exercício físico é capaz de induzir a autofagia no

cérebro. A figura 4 sumariza a interação das vias moleculares moduladas pelo exercício físico, e como a autofagia no músculo esquelético participa desses eventos.

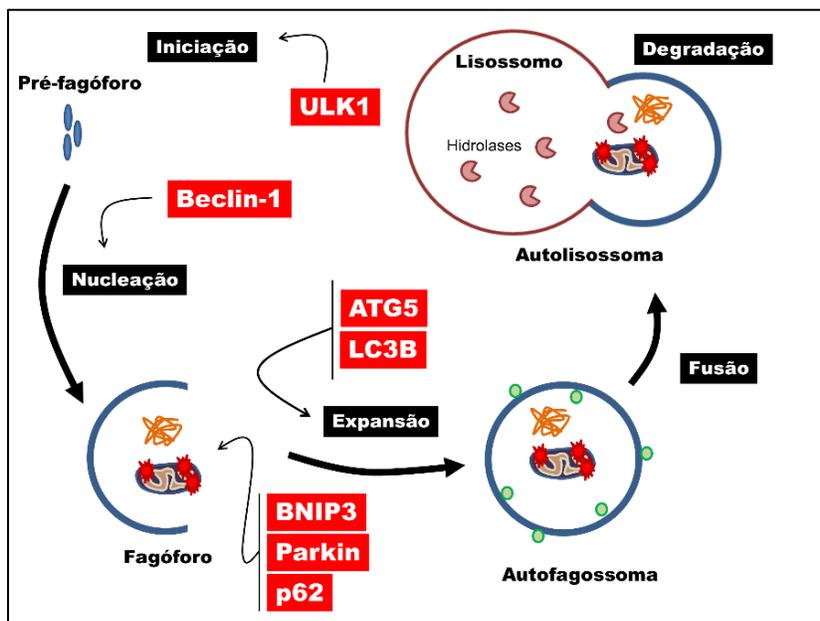


Figura 3. Passos e principais proteínas responsáveis pelos eventos da autofagia. A formação do pré-fagóforo (sítios de montagem do fagóforo) é iniciada pela proteína *unc-51-like kinase 1* (ULK1), ativando a Beclin-1. Depois de ativada, a Beclin-1 leva a formação do fagóforo. *BCL2 interacting protein 3* (BNIP3) e *Parkin* são proteínas que sinalizam especificamente a autofagia de mitocôndrias, já a p62 sinaliza substratos autofágicos diversos. As proteínas *autophagy protein 5* (ATG5) e *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B* (LC3B) são responsáveis pela expansão/alongamento do fagóforo até a formação do autofagossoma. O autofagossoma em sequência se funde ao lisossomo para entrega e degradação do material envolto. **Fonte:** Próprio autor.

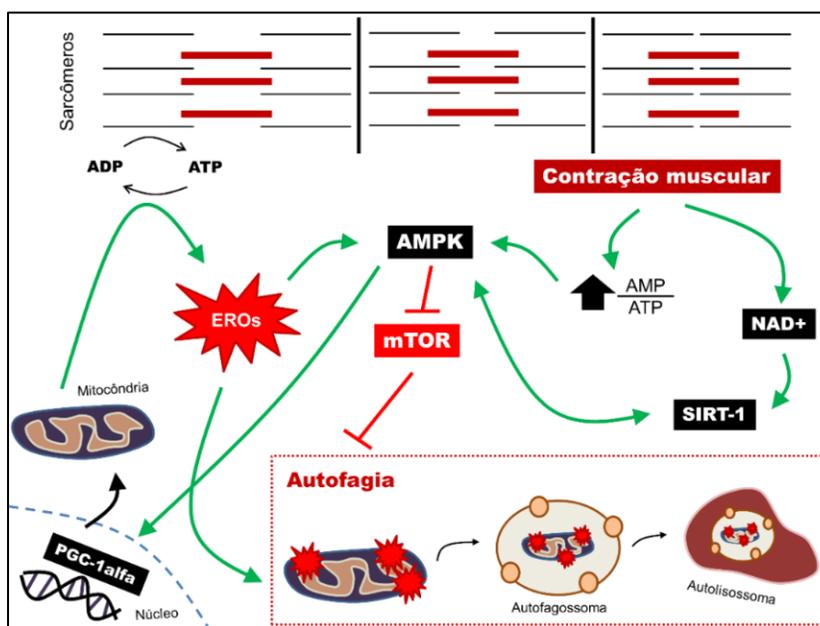


Figura 4. Relação entre exercício físico e autofagia. O exercício físico aumenta a razão AMP/ATP e concentrações de NAD⁺ ativando as proteínas AMPK e SIRT-1. Essa via de sinalização ativa a PGC-1 α , que leva ao aumento da

biogênese mitocondrial. A ressíntese de ATP realizada pelas mitocôndrias gera espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem prejudicar o funcionamento da própria mitocôndria, induzindo um sinal pró-autofágico. A AMPK, além de induzir a biogênese mitocondrial e a autofagia diretamente, também inibe a mTOR, uma proteína inibitória da via autofágica. **Fonte:** Próprio autor.

Recentemente, verificou-se que a rev-erb- α também apresenta um papel regulador repressivo direto na transcrição dos genes que participam na via autofágica (WOLDT; SEBTI; SOLT; DUHEM *et al.*, 2013). No entanto, a correlação entre a rev-erb- α e a resposta autofágica induzida pelo exercício físico permanece desconhecida. Além disso, os efeitos de diferentes modelos e intensidades de exercício físico na resposta autofágica no hipocampo, local que revelou possuir grande potencial na regulação da fadiga do SNC (conforme descrito no item 1.3.1), ainda não foram explorados. Portanto, considerando as relações previamente descritas do exercício físico com a fadiga do SNC e do exercício físico com a autofagia, três questões científicas precisam ser respondidas:

- a) *Qual a resposta da via autofágica no músculo esquelético em diferentes modelos de exercício físico agudo (endurance/força/exaustivo)?*
- b) *Qual a resposta da via autofágica no hipocampo após esses mesmos modelos de exercício físico agudo?*
- c) *Essas respostas são dependentes da intensidade do exercício físico?*

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral da presente tese de doutorado foi analisar a relação da rev-erb- α nas adaptações moleculares, induzidas por diferentes modelos de exercício físico agudo, que regulam o desempenho físico, fadiga do SNC e autofagia, além de verificar seu comportamento no estado de *overreaching* não funcional.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1. Analisar se o tipo (*endurance*/força/exaustivo) e a intensidade do exercício físico agudo provocam respostas diferentes da rev-erb- α no músculo esquelético. (itens 1.1-a, 1.1-b e 1.2-a);

3.2. Analisar as respostas da rev-erb- α , dopamina e serotonina no hipocampo após uma sessão de exercício físico exaustivo. (itens 1.3.1-a e 1.3.1-b);

3.3. Analisar se a rev-erb- α é capaz de modular a via da quinurenina. (item 1.3.2-a);

3.4. Analisar qual a resposta da via da quinurenina após uma sessão de exercício físico exaustivo. (item 1.3.2-b);

3.5. Analisar as respostas da via autofágica do músculo esquelético e hipocampo após diferentes modelos (*endurance*/força/exaustivo) e intensidades de exercício físico agudo (itens 1.4-a e 1.4-b);

3.6. Analisar o comportamento da rev-erb- α no músculo esquelético em resposta ao estado de *overreaching* não funcional induzido através de exercício físico crônico exaustivo. (item 1.2-b);

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Animais experimentais*

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com 8 semanas de vida provenientes do Biotério da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em micro isoladores, em rack ventilada com pressão positiva, três animais por gaiola, com temperatura controlada (22 ± 2 ° C) em um ciclo de 12h claro-escuro, com livre acesso a ração (Purina) e água. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto (EEFERP) da USP (Protocolo 2017.5.33.90.7). Os camundongos foram distribuídos em 5 grupos para os protocolos de exercício físico agudo: controle (CT; sedentários), *endurance* (END; submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbio contínuo), *intervalado* (INT; submetidos ao protocolo de exercício aeróbio intervalado), força (FOR; submetidos ao protocolo de exercício físico de força) e exaustivo (EX; submetidos ao protocolo de exercício físico exaustivo em declive). Para o protocolo de exercício físico crônico, os animais foram distribuídos em 2 grupos: sedentário (SE; animais que não tiveram nenhuma manipulação experimental durante as 8 semanas) e *overtaining* (OT; submetidos ao protocolo de *overtraining* de 8 semanas).

4.2 *Protocolos de exercício físico agudo e overtraining*

Antes de qualquer manipulação experimental, os camundongos dos grupos END, INT, EX e OT foram submetidos a uma semana de adaptação na esteira rolante (INSIGHT®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) durante 5 dias, 10min/dia, na velocidade de $6\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$. Já os camundongos do grupo FOR foram submetidos a uma semana de adaptação de escalada na escada com e sem a utilização de carga externa conforme Wang e colaboradores (WANG; CHOI; SOLARES; TSENG *et al.*, 2015).

4.2.1 *Protocolo de exercício físico aeróbio contínuo (END)*

As características do protocolo END estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Protocolo da sessão de treino aeróbio contínuo. Carga de treino = intensidade x volume.

Intensidade (%P _{máx})	Volume (min)	Inclinação da corrida (%)	Carga de treino (u.a.)
60	60	0	3.600

4.2.2. Protocolo de exercício físico aeróbio intervalado (INT)

As características do protocolo INT estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Protocolo da sessão de treino aeróbio intervalado. Carga de treino = intensidade x volume.

Intensidade (%P _{máx})	Volume (min)	Inclinação da corrida (%)	Carga de treino (u.a.)
40	5	0	200
80	5	0	400
40	5	0	200
80	5	0	400
40	5	0	200
80	5	0	400
40	5	0	200
80	5	0	400
40	5	0	200
80	5	0	400
40	5	0	200
80	5	0	400
Total	60	0	3.600

4.2.3. Protocolo de exercício físico de força (FOR)

As características do protocolo de FOR estão descritas na tabela 3. O protocolo foi adaptado do estudo de Wang e colaboradores (WANG; CHOI; SOLARES; TSENG *et al.*, 2015). A carga utilizada foi aplicada na base da cauda de cada camundongo e consistiu de 75% do peso corporal. A sessão de treino iniciou com uma repetição sem carga (aquecimento), seguida de 10 escaladas com 2min de recuperação entre as séries.

Tabela 3. Protocolo da sessão de treino de força.

Intensidade (%Peso corporal)	Volume (séries)
75	10

4.2.4. Protocolo de exercício físico exaustivo (EX)

Para a realização da sessão aguda de exercício físico exaustivo, os camundongos correram até a exaustão com intensidade e inclinação correspondentes a semana 5 do protocolo de *overtraining* (Tabela 4).

4.2.5. Protocolo de *overtraining* (OT)

O protocolo de OT é composto por 8 semanas e cada semana foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de repouso (Tabela 4).

Tabela 4. Protocolo de *overtraining*. Carga de treino = intensidade x volume.

Semana	Intensidade (%P _{máx})	Volume (min)	Sessões diárias	Inclinação (%)	Intervalo entre as sessões (h)	Carga de treino (u.a.)
1	60	15	1	0	24	900
2	60	25	1	0	24	1.750
3	60	35	1	0	24	2.800
4	60	45	1	0	24	3.600
5	60	60	1	-14	24	3.600
6	70	60	1	-14	24	4.200
7	75	75	1	-14	24	5.625
8	75	75	2	-14	4	11.250

4.3 Avaliação do desempenho físico

Somente o grupo experimental OT foi submetido aos seguintes testes de desempenho físico: 1) teste de carga incremental e 2) teste de rotarod. Os testes foram realizados nas semanas 0, 4 e 8, sendo que nas semanas 4 e 8, as avaliações foram aplicadas 48 horas após as últimas sessões de treinamento.

4.3.1 Teste de carga incremental (TCI)

O teste de carga incremental teve velocidade inicial de 6m.min⁻¹, com 0% de inclinação e incrementos de 3m.min⁻¹ a cada 3min até a exaustão voluntária dos camundongos, que ocorreu quando os mesmos encostarem 5 vezes no final da esteira no intervalo de 1min. A potência máxima (P_{máx}), definida como a velocidade (m.min⁻¹) de exaustão do animal, foi utilizada tanto para a prescrição das intensidades nos protocolos de exercício físico agudo END, INT, FOR e EX, quanto para as sessões crônicas de OT.

4.3.2 Teste do rotarod

Nesse teste, o aparelho foi programado para apresentar velocidade inicial de 1rpm e final de 40rpm que foi alcançada 300s após o início do movimento. A aceleração durante todo teste foi constante. Foram realizadas três tentativas por animal, com intervalo de 10s entre cada tentativa, e o tempo (s) até a queda de cada animal foi registrado.

4.4. Coleta de sangue e extração dos músculos esqueléticos e hipocampo

Os animais foram anestesiados com injeções intraperitoneais de xilazina (10 mg/kg de peso corporal) e quetamina (100 mg/kg de peso corporal) misturadas na mesma seringa. Assim que o efeito da anestesia foi confirmado pela perda dos reflexos pedal e corneano, os animais foram decapitados, o sangue coletado e em sequência centrifugado para obtenção do soro. Imediatamente após a decapitação, os músculos esqueléticos sóleo e gastrocnêmio (amostras em que a *rev-erb- α* é mais expressa em resposta ao exercício físico) e o hipocampo foram extraídos e armazenados de forma específica para a realização das técnicas de *immunoblotting* (armazenamento a -80°C), *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay* (ELISA) (armazenamento a -80°C) e *real time polymerase chain reverse* (RT-PCR) [armazenamento a -80°C com *RNAlater* (Ambion, Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

4.5 Técnica de immunoblotting (IB)

A técnica de *immunoblotting* foi realizada conforme descrito em artigos publicados pelo nosso grupo de pesquisa (DA ROCHA; PEREIRA; PAULI; DE SOUZA *et al.*, 2016). Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: *Rev-erb- α* (sc-393215), *p-Rev-erb- α* (#2129s), *Gapdh* (#2118s), *Tyrosine hydroxylase* (sc-25269), *Vmat2* (sc-374079), *Kat1* (sc-271709), *Kmo* (MAB8050), *Ido* (sc-53978). Os reagentes químicos de rotina foram provenientes da *Sigma Chemical Corporation* (St. Louis, MO, USA). Para o fracionamento subcelular foi utilizado o método descrito por Dimauro e colaboradores (DIMAURO; PEARSON; CAPOROSSI; JACKSON, 2012).

4.6 Técnica de Real time-quantitative PCR (RTqPCR)

O RNA total dos músculos esqueléticos e hipocampo foi extraído com TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA). A reação de transcrição reversa (1 μg do RNA total) foi realizada utilizando o Superscript III Reverse Transcriptase e outros Primers (Invitrogen). Para realização do RTqPCR foram utilizados os *primers* para *Nr1d1*, *Kyat1*, *Kmo*, *Gapdh*, *Th*, *Slc18a2*, *Atg5*, *Bnip3*, *Map11c3b*, *Ulk1* e *P62*. A tabela 5 apresenta o desenho de cada *primer*. A reação de

RTqPCR foi realizada utilizando os seguintes reagentes: 5µl de *iTaq Universal SYBR Green Supermix* da Biorad (CA, EUA), 1 µl do primer *forward* (2 µM), 1 µl do primer *reverse* (2 µM), 1µl de cDNA (10ng) e 2µl de água tratada com DEPC. O protocolo utilizado para amplificação foi: 30 segundos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. A quantificação relativa foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando o software *Thermo Fischer Cloud Software, RQ* versão 3.7 (CA, EUA). Todos os valores foram corrigidos pelo valor obtido na amplificação do *Gapdh* (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*).

Tabela 5. Sequência dos nucleotídeos dos *primers* utilizados.

Gene	Sequência forward	Sequência reverse
<i>Nr1d1</i>	AGAGAGGCCATCACAACCTC	TGTAGGTGATAACACCACCTGT
<i>Kyat1</i>	AAAGGAACAGACTTCTGCAACC	CCACACACAGTTCTGCTTCAG
<i>Kmo</i>	CAAGGAATGAATGCGGGCTT	ATGCGCTCGCATCTCTATGT
<i>Gapdh</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
<i>Th</i>	TGGTCACCAAGTTTGACCCT	GCTCACCTGCTTGTATTGG
<i>Slc18a2</i>	GGTTTTGCCATTGGGATGGT	TACCCCATGCAGAAGGCTAC
<i>Atg5</i>	GCTTTTGCCAAGAGTCAGCTAT	AACCAATTGGATAATGCCATTTTCAG
<i>Bnip3</i>	CAGCATGAGAAACACAAGCG	TCCAATGTAGATCCCCAAGCC
<i>Map1lc3b</i>	AGATAATCAGACGGCGCTTG	TCGTACACTTCGGAGATGGG
<i>Ulk1</i>	AACATCCGAGTCAAGATTGCTG	ATAATGACCTCAGGAGCCATGT
<i>Sqstm1</i>	ACAGCCAGAGGAACAGATGG	GTAGAGACTGGAGTTCACCTGTA

4.7 Análise por ELISA

As amostras de hipocampo e gastrocnêmio foram homogeneizadas em tampão PBS e posteriormente centrifugadas a 5.000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e subsequentemente analisado para mensuração da concentração de proteínas totais pelo método BCA. Foram utilizadas quantidades iguais de proteína entre as amostras para as análises posteriores. Foram utilizados os kits MOFI01315 (quinurenina), MOEB2506 (serotonina) e UNFI0013 (dopamina) da empresa Assay Genie (Dublin, Irlanda); MBS7256170 (ácido quinurênico) e MBS1607987 (triptofano) da empresa Mybiosource (CA, EUA). Todas as análises seguiram os protocolos e recomendações requisitadas pelo fabricante.

4.8 *Análise dos resultados*

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão médio. Os testes de Shapiro-Wilk e Levene foram utilizados para verificar a normalidade e homogeneidade dos dados, respectivamente. A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas (distribuição normal) foi utilizado para verificar o efeito do protocolo experimental crônico nos testes de desempenho. Para os demais parâmetros, a ANOVA *two-way* foi utilizado para verificar os efeitos dos protocolos experimentais agudos e crônico nas comparações entre grupos e tempos. Quando a ANOVA *two-way* indicou significância estatística, o teste *post hoc* de Bonferroni foi utilizado. Quando comparações entre somente dois grupos foi necessária, foi realizado o teste *t* para amostras independentes. Para verificar a correlação entre os níveis proteicos de rev-erb- α e as moléculas relacionadas a via da quinurenina foi utilizada a correlação de Pearson. Todas as análises foram bilaterais e o nível de significância foi pré-fixado em $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando software *Graphpad Prism* v8.0.1 para Windows.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Experimento 1

Para responder aos objetivos específicos 3.1, 3.2, 3.4 e 3.5, o desenho experimental 1 foi utilizado (Figura 5). No entanto, foram utilizados diferentes grupos experimentais, tecidos e análises para cada objetivo. O *time course* (0, 6, 12, 18h) foi utilizado para verificar o comportamento das variáveis em resposta aos estímulos, assim como para preservar a característica oscilatória da rev-erb- α (YANG; DOWNES; RUTH; BOOKOUT *et al.*, 2006).

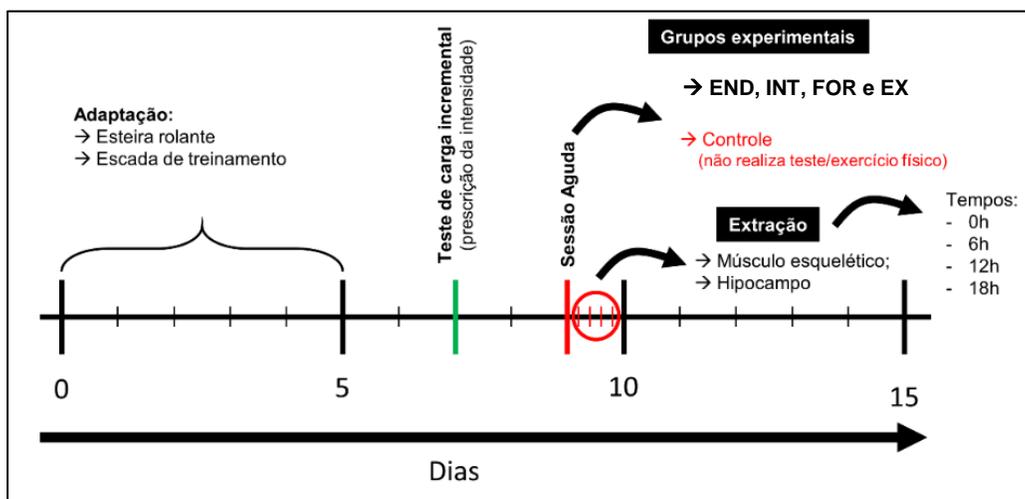


Figura 5. Desenho experimental 1. END: aeróbio contínuo; INT: aeróbio intervalado; FOR: força; EX: exaustivo.

5.2 Experimento 2

O desenho experimental 2 (Figura 6) foi utilizado para responder o objetivo específico 3.6. Para verificar o comportamento da rev-erb- α , foi realizado o *time course* na extração dos tecidos com início após 2 dias de recuperação (~48 horas) do último teste físico. O *time course* respeitou o padrão oscilatório dessa proteína (Figura 7).

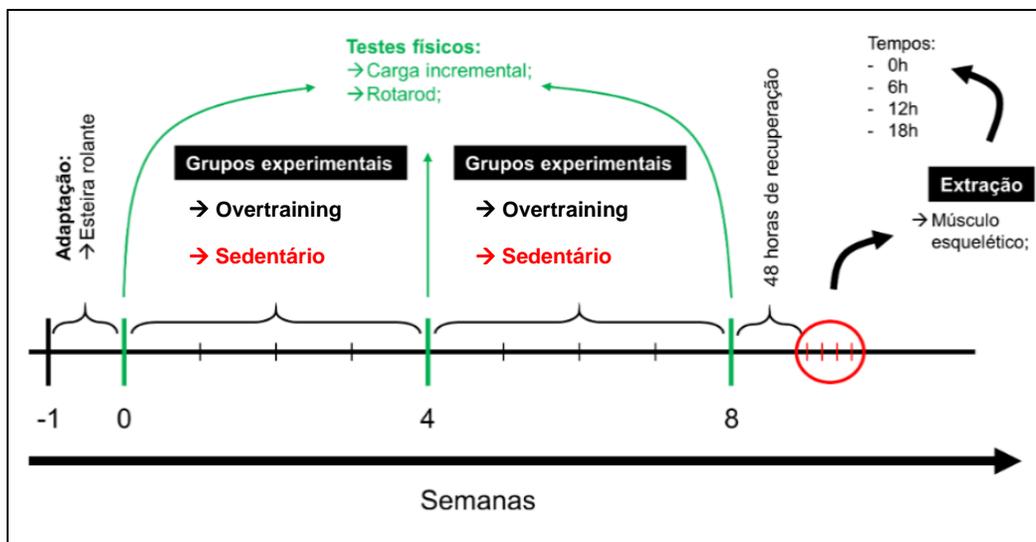


Figura 6. Desenho experimental 2. Grupo sedentário não realiza testes físicos.

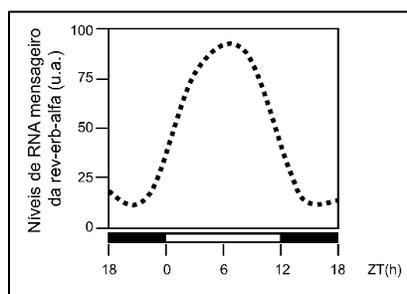


Figura 7. Padrão oscilatório dos níveis de RNAm da rev-erb- α segundo *zeitberg time* (ZT). As luzes são acesas e apagadas no ZT0 e ZT12, respectivamente.

5.3 Experimento 3

O desenho experimental 3 foi utilizado para responder o objetivo específico 3.3. Nesse experimento, um grupo de camundongos foi tratado com o fármaco SR9009, um agonista da rev-erb- α , por 3 dias consecutivo com 2 doses (100mg/kg) por dia (às 06:00 e 12:00; horários que a Rev-erb- α apresentou maior expressão de RNAm), conforme protocolo de Mayeuf-Louchard (MAYEUF-LOUCHARTE; THOREL; DELHAYE; BEAUCHAMP *et al.*, 2017). Após 1 hora da última injeção com SR9009 ou solução veículo (Kolliphor EL 30%), foi extraído o músculo gastrocnêmio, hipocampo e o soro para mensurar as proteínas relacionadas à via da quinurenina.

6. RESULTADOS

6.1 Características dos grupos referentes ao experimento 1

A figura 8.A apresenta o peso corporal dos grupos experimentais CT, END, INT, FOR e EX. O grupo EX apresentou menor peso corporal quando comparado com o grupo INT e FOR. Já na figura 8.B, é possível verificar a velocidade de exaustão, através do teste de carga incremental, dos grupos que foram submetidos a algum protocolo de exercício físico de corrida na esteira. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados (END, INT e EX). Na figura 8.C está apresentada as características do protocolo de exercício END e INT de forma gráfica. O grupo END foi submetido a uma corrida contínua de 60 minutos a uma intensidade de 60% da P_{máx}, já o grupo INT foi submetido a uma corrida de 60 minutos, oscilando a intensidade a cada 5 minutos entre 40 e 80% da P_{máx}. Na figura 8.D pode-se observar a distribuição das cargas de treino utilizadas pelos camundongos no protocolo de treino de força. Os grupos INT e EX apresentaram redução significativa da glicemia quando comparados os tempos pré e pós exercício físico (Figura 8.E). Na figura 8.F está apresentado o volume da sessão de treino dos camundongos que realizaram o protocolo de exercício END, INT e EX.

6.2 Características dos grupos submetidos ao experimento 2

O grupo submetido ao protocolo de OT apresentou menor peso corporal na semana 8 quando comparado ao grupo SE (Figura 9.A). Na figura 9.B pode-se observar que o grupo submetido ao protocolo de OT apresentou ganho de *performance* física, avaliada pelo teste de carga incremental, na semana 4 quando comparada a semana 0. Na semana 8, o grupo OT apresentou redução da velocidade de exaustão quando comparada a sua semana 4, caracterizando uma queda de *performance* física. Esse mesmo grupo não apresentou diferença significativa na avaliação pelo teste do Rotarod entre as semanas 0, 4 e 8 (Figura 9.C).

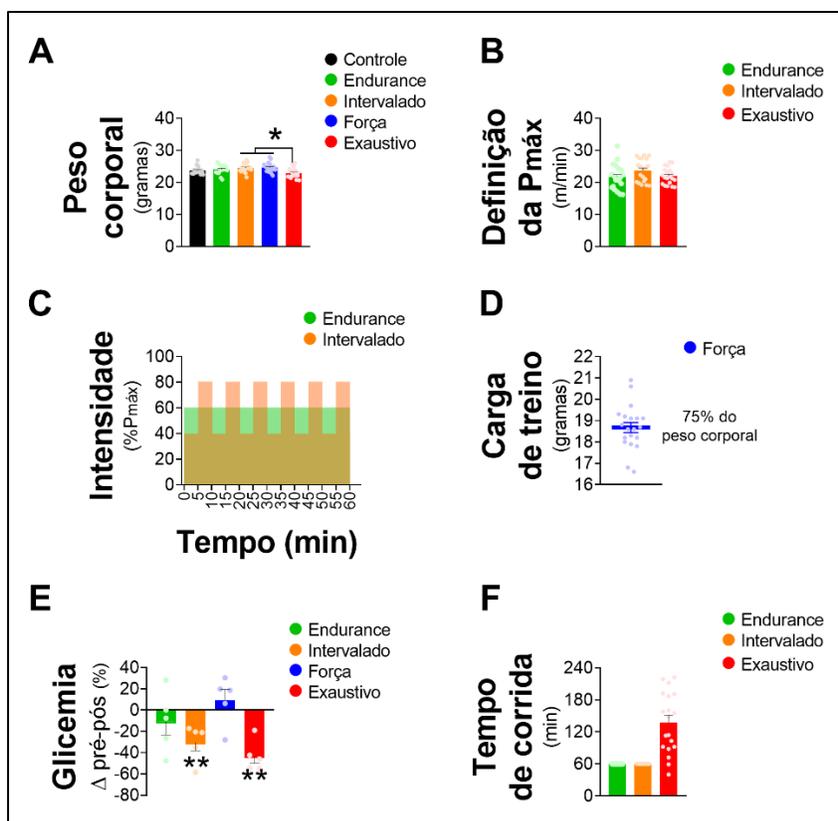


Figura 8. Média \pm erro padrão médio. (A) Peso corporal dos grupos experimentais. (B) Resultado do teste de carga incremental para definição da P_{máx}. (C) Representação gráfica das características do protocolo de exercício físico de *endurance* (END) e intervalado (INT). (D) Demonstração das cargas de treino utilizadas no protocolo de exercício de força. (E) Variação da glicemia pré pós sessão aguda de exercício físico. (F) Volume de treino dos diferentes protocolos de exercício físico realizado na esteira. * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$ vs momento pré-pós.

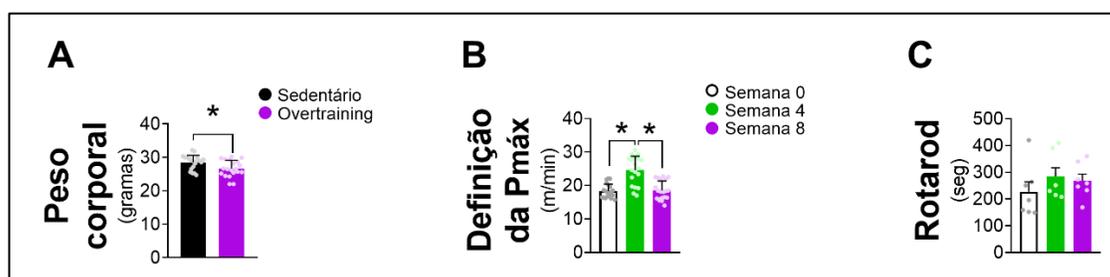


Figura 9. Média \pm erro padrão médio. (A) Peso corporal dos grupos experimentais crônicos na semana 8. (B) Resultados do teste de carga incremental para definição da P_{máx}. (C) Resultados do teste de Rotarod. * $p < 0,05$; $n = 20$ por grupo na figura A e B. $n = 7$ por grupo na figura C.

6.3 Respostas do *Nr1d1* e da *Rev-erb- α* aos diferentes modelos de exercício físico

Os grupos END e FOR apresentaram menores valores de *Nr1d1* no gastrocnêmio quando comparados aos grupos CT e INT no tempo 12 horas. Já no tempo 18 horas, o grupo INT demonstrou maiores valores de *Nr1d1* quando comparado ao grupo END (Figura 10.A). Quando comparados entre os diferentes tempos, os grupos CT, INT e FOR exibiram maiores valores de

Nr1dl no gastrocnêmio nos tempos 12 e 18h quando comparados aos tempos 0 e 6 horas. O grupo END apresentou maiores valores somente no tempo 18h quando comparado aos tempos 0, 6 e 12h. Ambos os grupos, INT e FOR, demonstraram maiores valores de *Nr1dl* no tempo 18h quando comparado ao tempo 12h (Figura 10.B). No músculo sóleo, o grupo END exibiu menores valores de *Nr1dl* no tempo 12 horas quando comparado aos grupos CT e INT (Figura 10.C). Em relação aos diferentes tempos (Figura 10.D), os grupos CT e INT apresentaram maiores valores de *Nr1dl* nos tempos 12 e 18h quando comparados aos tempos 0 e 6h. Esses mesmos grupos também apresentaram aumento na expressão desse gene no tempo 18h quando comparado ao tempo 12h. Os grupos END e FOR apresentaram maiores valores de *Nr1dl* no sóleo somente no tempo 18h quando comparado aos tempos 0, 6 e 12h. O grupo INT apresentou maiores valores de *Nr1dl* no hipocampo quando comparado aos grupos CT e END no tempo 12 horas. Já no tempo 18 horas o grupos INT exibiu maiores valores somente quando comparado ao grupo END (Figura 10.E). Quando comparado entre os diferentes tempos, o grupo INT demonstrou maiores valores de *Nr1dl* nos tempos 12 e 18h quando comparados ao tempo 6h. Os outros grupos experimentais não apresentaram diferença entre os diferentes tempos analisados (Figura 10.F).

Na figura 11 está apresentado o comportamento da Rev-erb- α no músculo gastrocnêmio. Os grupos END, INT e FOR exibiram redução na expressão da Rev-erb- α nos tempos 0 e 6 horas após o término da sessão aguda de exercício físico (Figura 11.A). Quando comparados com os diferentes tempos, o grupo CT apresentou menores valores no tempo 6, 12 e 18h quando comparado ao tempo 0h. Já o grupo INT, exibiu maiores valores dessa proteína no tempo 18h quando comparado com o tempo 6h (Figura 11.B). Já no extrato nuclear, os grupos END, INT e FOR apresentaram redução do conteúdo de Rev-erb- α quando comparado com o grupo CT imediatamente após a sessão de treino (Figura 12.A). Não houve diferenças entre os grupos no conteúdo de Rev-erb- α no extrato citosólico para esses grupos experimentais (Figura 12.B).

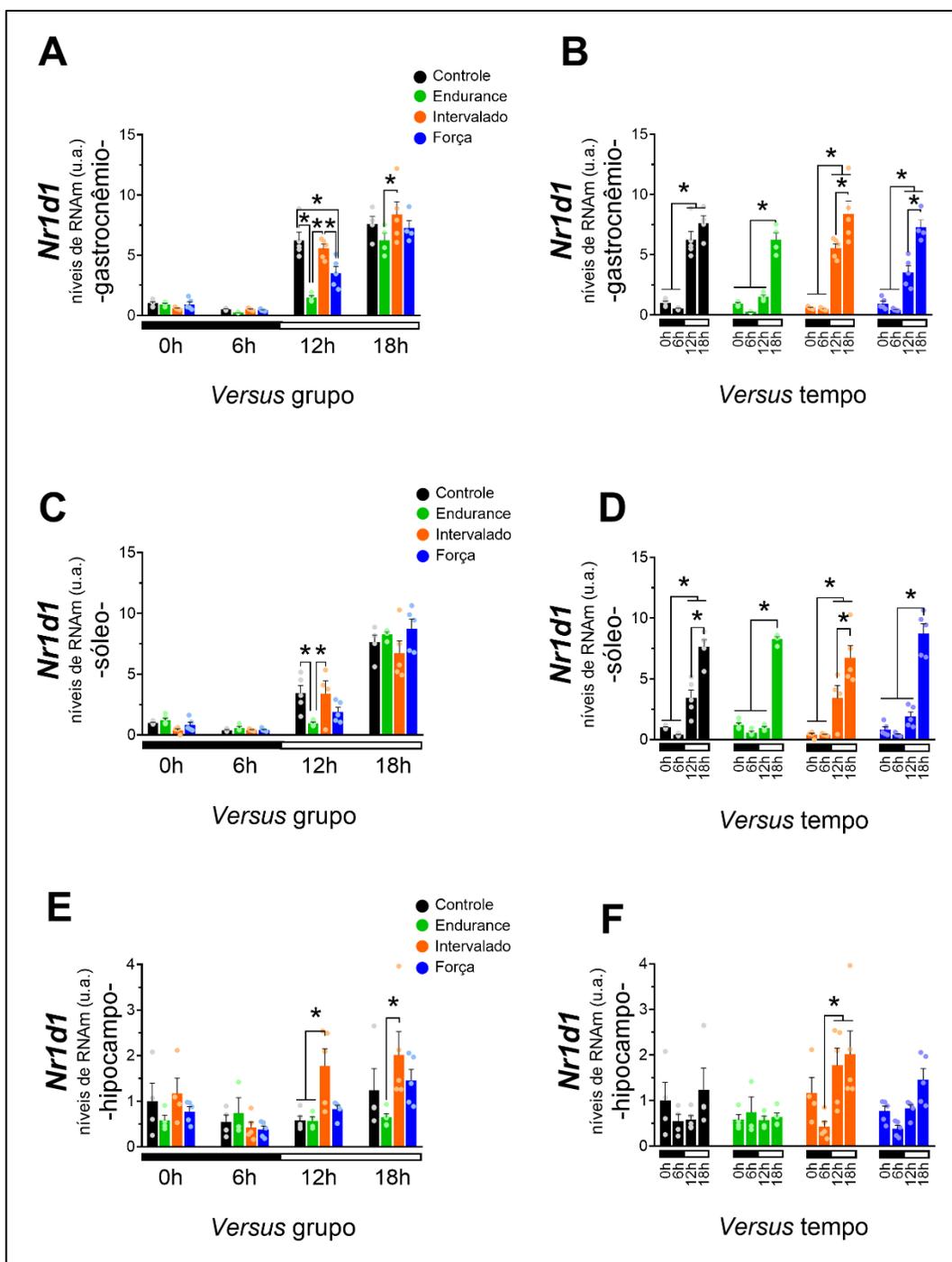


Figura 10. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm (A) *Nr1d1* vs grupos no gastrocnêmio, (B) *Nr1d1* vs tempo no gastrocnêmio, (C) *Nr1d1* vs grupos no sóleo, (D) *Nr1d1* vs tempo no sóleo, (E) *Nr1d1* vs grupos no hipocampo, (F) *Nr1d1* vs tempo no hipocampo. * $p < 0,05$; $n = 3-5$ por grupo.

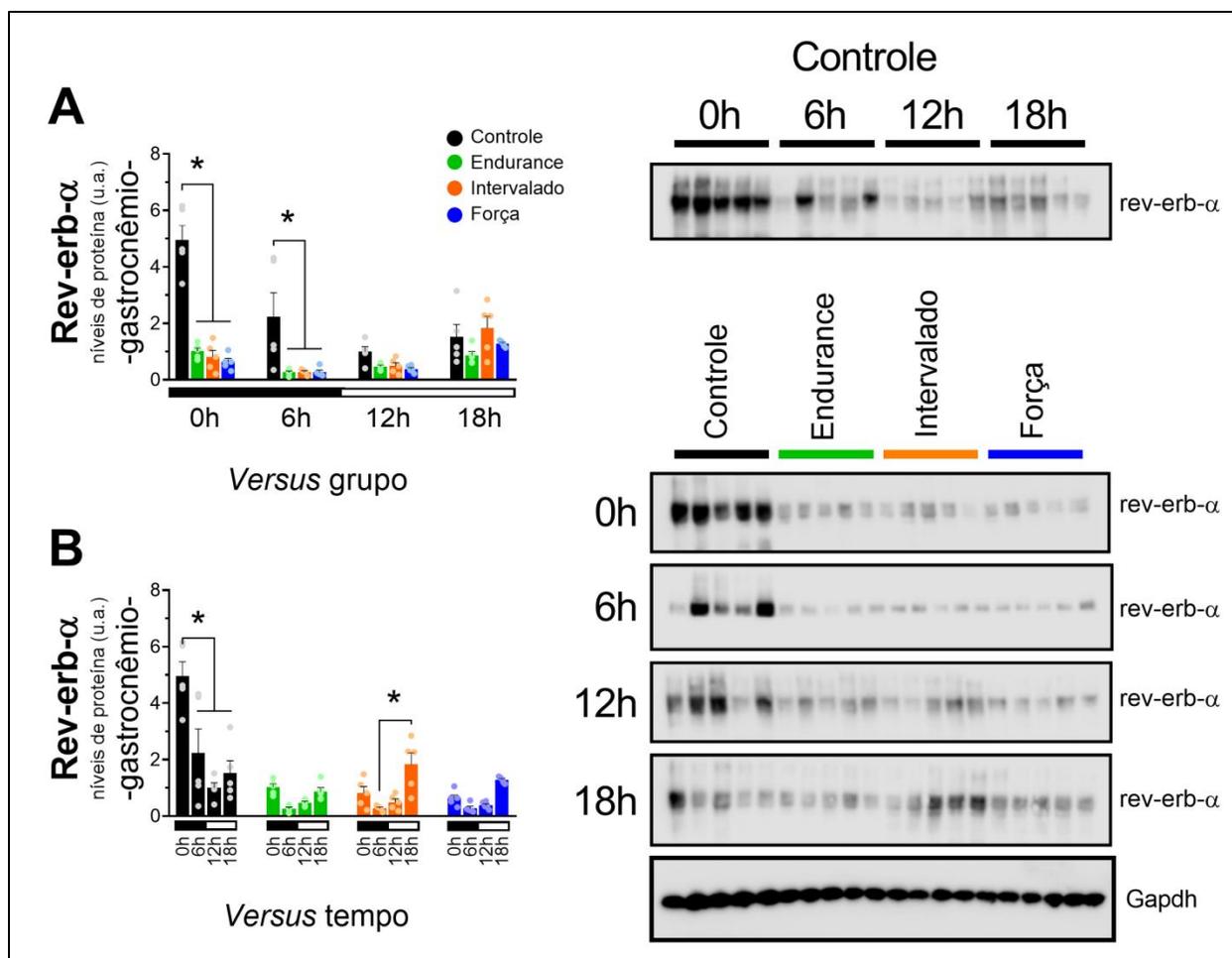


Figura 11. Média \pm erro padrão médio. Conteúdo proteico de (A) Rev-erb- α vs. Grupos e (B) Rev-erb- α vs. Tempo no gastrocnêmio. * $p < 0,05$; $n = 4-5$ por grupo.

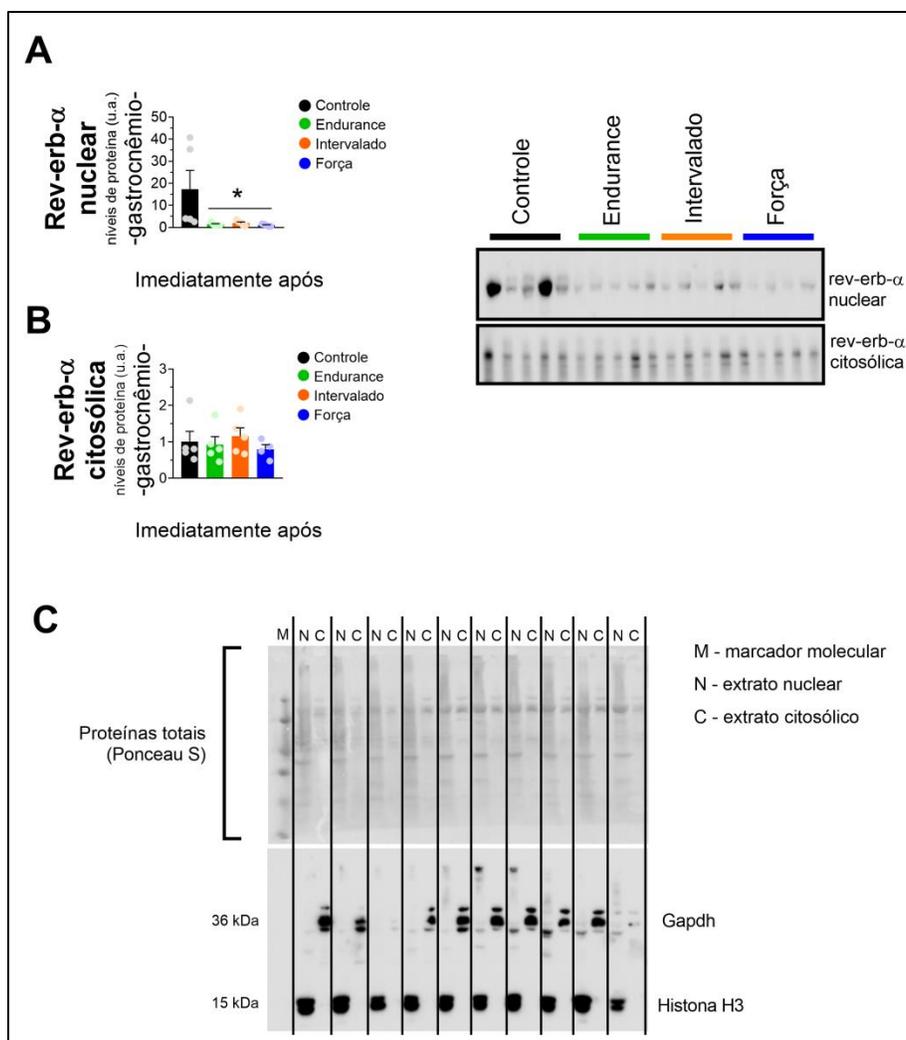


Figura 12. Média \pm erro padrão médio. Conteúdo proteico de (A) Rev-erb- α nuclear vs. Grupos, (B) Rev-erb- α citosólica vs. Grupos e (C) teste de contaminação do extrato nuclear e citosólico no gastrocnêmio. Os diferentes extratos celulares foram incubados com anticorpos específicos para núcleo (Histona H3) e citosol (Gapdh). * $p < 0,05$; $n = 4-5$ por grupo.

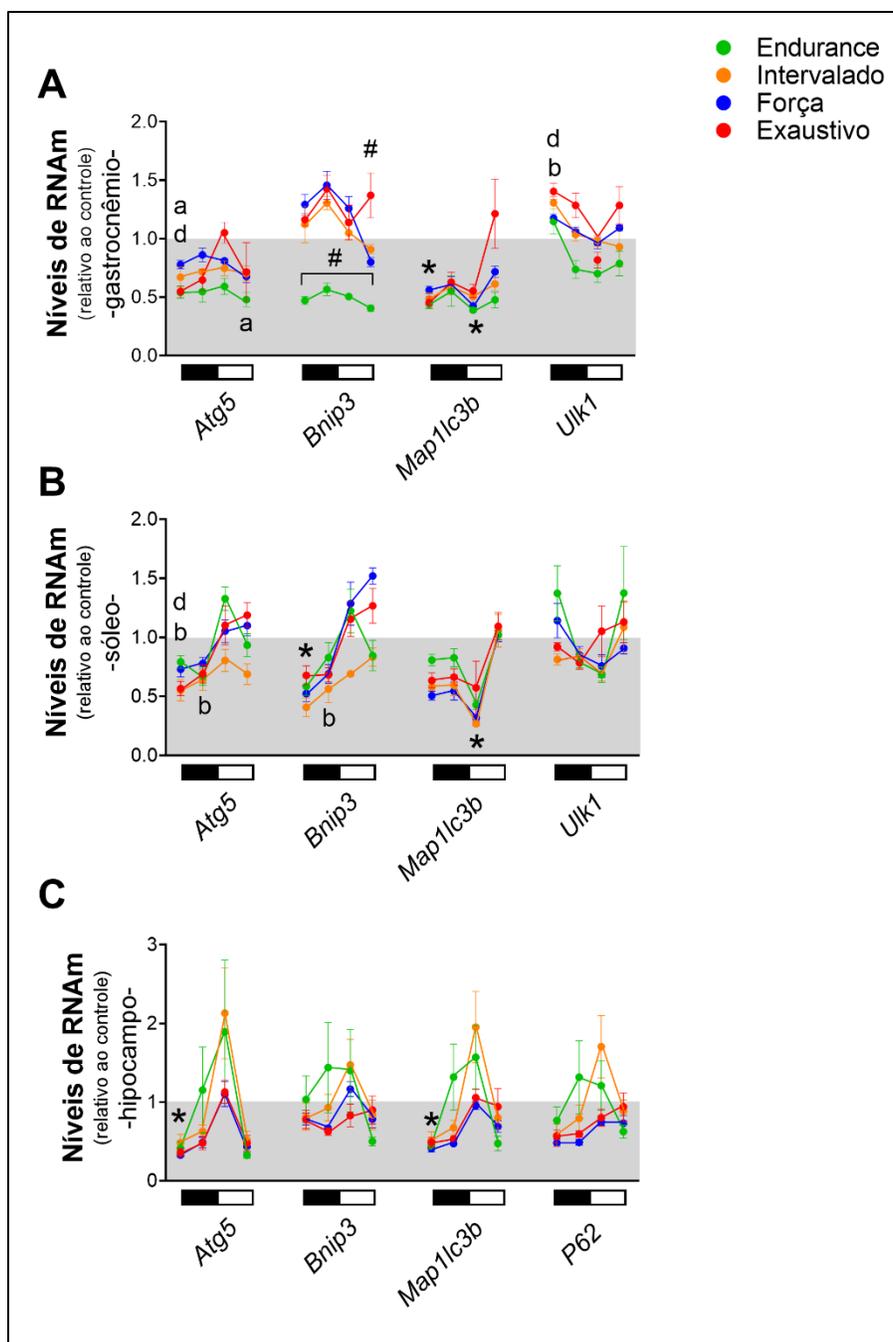
6.4 Respostas dos genes relacionados à autofagia induzidos por diferentes modelos de exercício físico no hipocampo

A figura 13 apresenta as respostas dos genes autofágicos a diferentes modelos de exercício físico no gastrocnêmio, sóleo e hipocampo. Considerando o músculo gastrocnêmio (Figura 13.A), os grupos END e EX exibiram diminuição da *Atg5* no tempo 0h quando comparado ao grupo CT. O grupo END também apresentou diminuição na expressão desse gene no tempo 18h quando comparado com CT. O grupo END apresentou menores valores para *Bnip3* quando comparado a todos os outros grupos experimentais em todos os tempos analisado. O grupo EX apresentou maiores níveis de *Bnip3* quando comparado a todos os outros grupos experimentais no tempo 18h. Os grupos END, INT, FOR e EX demonstraram menor expressão gênica de *Map1lc3b* nos tempos

0 e 12h quando comparados aos grupos CT. O grupo EX exibiu maior expressão de *Ulk1* quando comparado ao grupo CT no tempo 0h. Já no tempo 6h, o grupo EX apresentou maiores níveis de *Ulk1* quando comparado ao grupo END. No tempo 18h, o grupo EX apresentou maiores níveis de *Ulk1* quando comparado aos grupos END e INT.

No músculo sóleo (Figura 13.B), os grupos END e INT apresentaram diminuição na expressão de *Atg5* quando comparados ao grupo CT no tempo 0h. No tempo 6h, somente o grupo INT apresentou redução nos níveis de *Atg5* quando comparado ao grupo CT. O grupo END demonstrou maior expressão de *Atg5* no tempo 12h quando comparado com INT. Já no tempo 18h, os grupos FOR e EX apresentaram maiores níveis de *Atg5* quando comparado ao grupo INT. Os grupos END, INT, FOR e EX apresentaram redução na expressão de *Bnip3* quando comparado ao grupo CT no tempo 0h. O grupo INT demonstrou menores níveis de *Bnip3* quando comparado ao grupo CT no tempo 6h. O grupo FOR apresentou maiores níveis de *Bnip3* quando comparado ao grupo INT nos tempos 12 e 18h. Os grupos END, INT, FOR e EX apresentaram redução na expressão de *Map1lc3b* no tempo 12h quando comparado com o grupo CT.

No hipocampo (Figura 13.C), os grupos END, INT, FOR e EX apresentaram redução na expressão de *Atg5* e *Map1lc3b* quando comparados ao grupo CT no tempo 0h. O grupo END apresentou maior expressão de *Map1lc3b* e *P62* no tempo 6h quando comparado ao grupo FOR. O grupo INT apresentou maior expressão de *P62* no tempo 12h quando comparado ao grupo FOR.



6.5 Respostas do *Nr1d1* e da *Rev-erb- α* ao exercício físico exaustivo

A figura 14 apresenta o comportamento do gene *Nr1d1* dos grupos CT e EX nos diferentes tempos analisados e em diferentes tecidos. O grupo EX não apresentou diferenças quando comparado ao grupo CT na expressão de *Nr1d1* nos músculos gastrocnêmio e sóleo (Figura 14.A

e 14.C). Quando comparados entre os diferentes tempos, os grupos CT e EX apresentaram aumento na expressão do *Nr1d1* nos tempos 12 e 18h quando comparados aos tempos 0 e 6h em ambos os músculos analisados (Figura 14.B e 14.D). No entanto, somente no músculo sóleo o grupo CT apresentou maiores valores de *Nr1d1* no tempo 18h quando comparado ao tempo 12h. Já no hipocampo, o grupo EX apresentou maior expressão de *Nr1d1* quando comparado ao grupo CT no tempo 18h (Figura 14.E). Quando comparado entre os diferentes tempos, o grupo EX exibiu maiores valores no tempo 18h quando comparado com o tempo 6h (Figura 14.F).

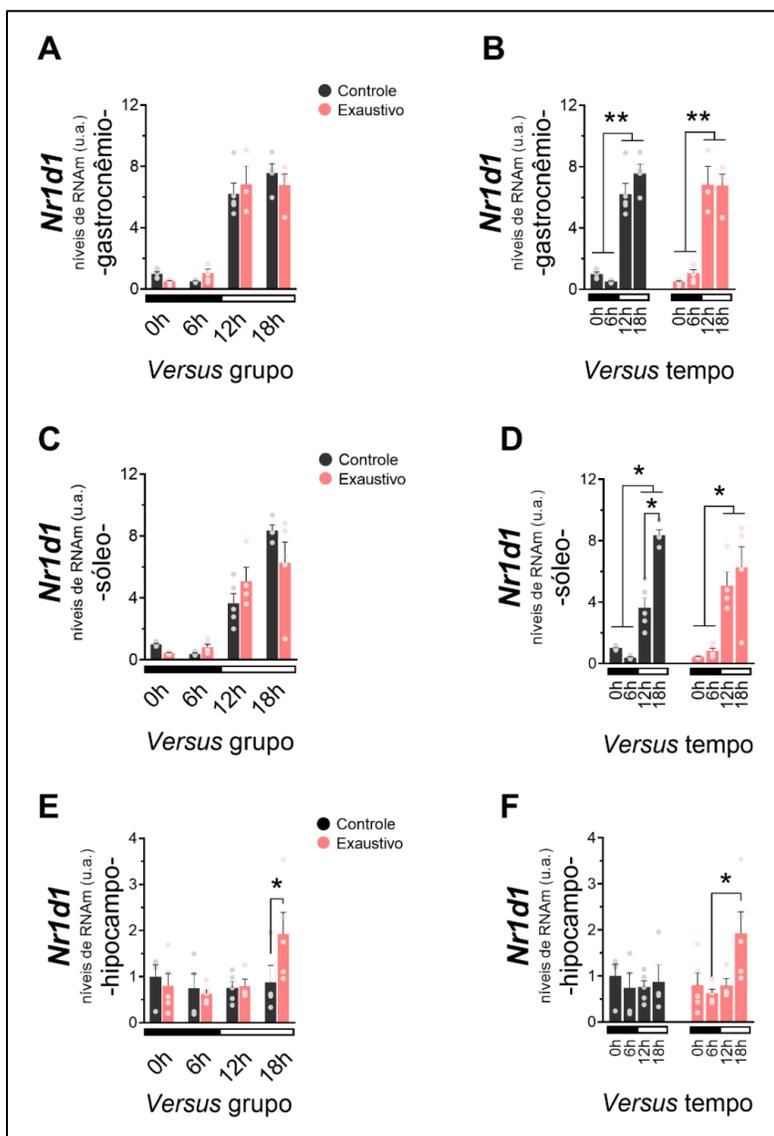


Figura 14. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de *Nr1d1* no gastrocnêmio (A e B), sóleo (C e D) e hipocampo (E e F). * $p < 0,05$; $n = 3-5$ por grupo/tempo. u.a = unidades arbitrárias

A figura 15 apresenta as respostas da proteína Rev-erb- α , Rev-erb- α fosforilada e a razão entre as duas análises no músculo gastrocnêmio. O grupo EX demonstrou menores concentrações

de Rev-erb- α nos tempos 0 e 6h quando comparado com o grupo CT (Figura 15.A). Em relação ao tempo, o grupo CT demonstrou menores concentrações de Rev-erb- α nos tempos 6, 12 e 18h quando comparados com o tempo 0h. Além disso, os tempos 12 e 18h apresentaram menores valores quando comparado ao tempo 6h nesse mesmo grupo (Figura 15.B). Os grupos CT e EX não apresentaram diferenças entre si nas concentrações da p-Rev-erb- α nos diferentes tempos analisados (Figura 15.C). Quando comparados entre os tempos, o grupo CT apresentou maiores valores de p-Rev-erb- α no tempo 18h quando comparado ao tempo 0h (Figura 15.D). Quando feita a razão entre a p-Rev-erb- α e a Rev-erb- α total, o grupo EX apresentou maiores valores nos tempos 0 e 6h quando comparado ao grupo CT (Figura 15.E). Já entre os diferentes tempos, o grupo CT apresentou maiores valores dessa razão nos tempos 12 e 18h quando comparados com o tempo 0h, e maiores valores no tempo 12h quando comparado com o tempo 6h (Figura 15.F).

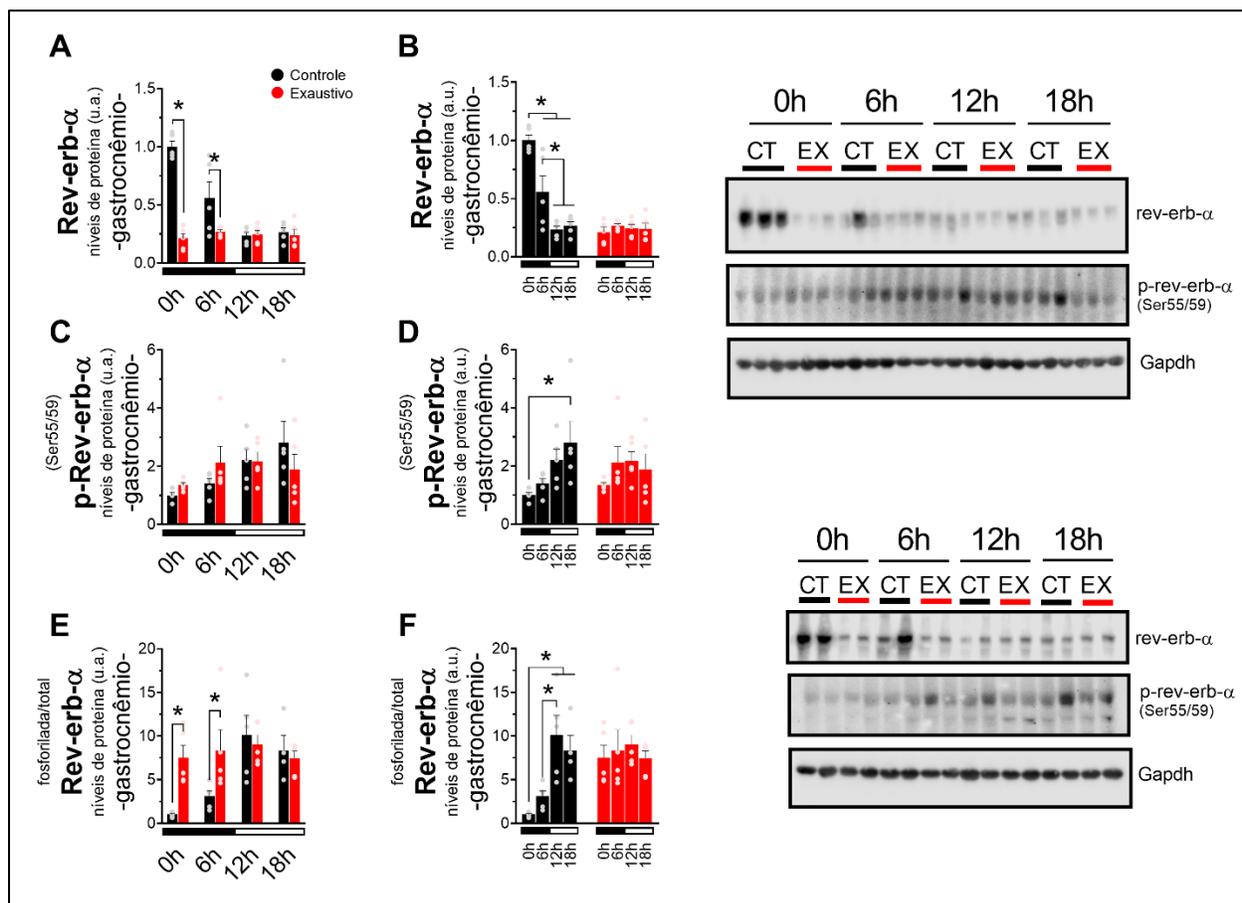


Figura 15. Média \pm erro padrão médio. Conteúdo proteico de (A e B) Rev-erb- α total, (C e D) p-Rev-erb- α e (E e F) razão fosforilada/total no gastrocnêmio. * $p < 0,05$; $n = 5$ por grupo/tempo. u.a = unidades arbitrárias

A figura 16 apresenta o conteúdo de Rev-erb- α nuclear e citosólica no gastrocnêmio imediatamente ao final da sessão de exercício físico exaustivo. O grupo EX apresentou redução

nos níveis de Rev-erb- α nuclear e citosólica quando comparado com o grupo CT (Figura 16.A e 16.B)

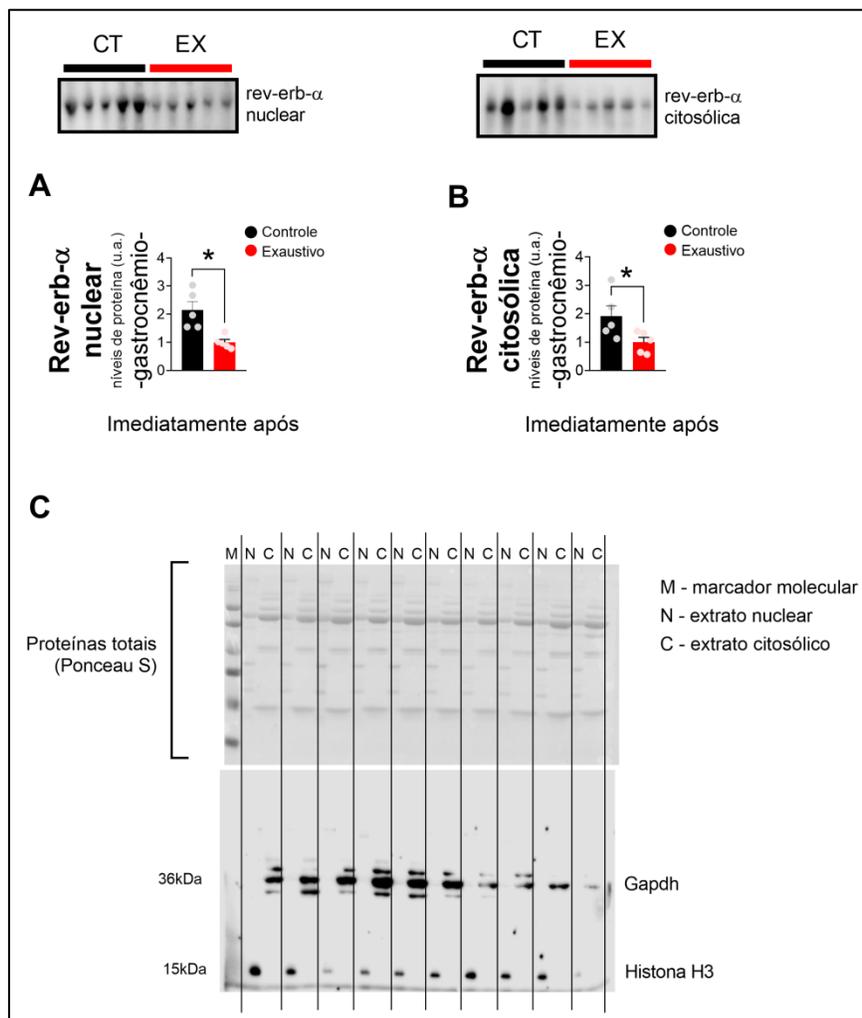
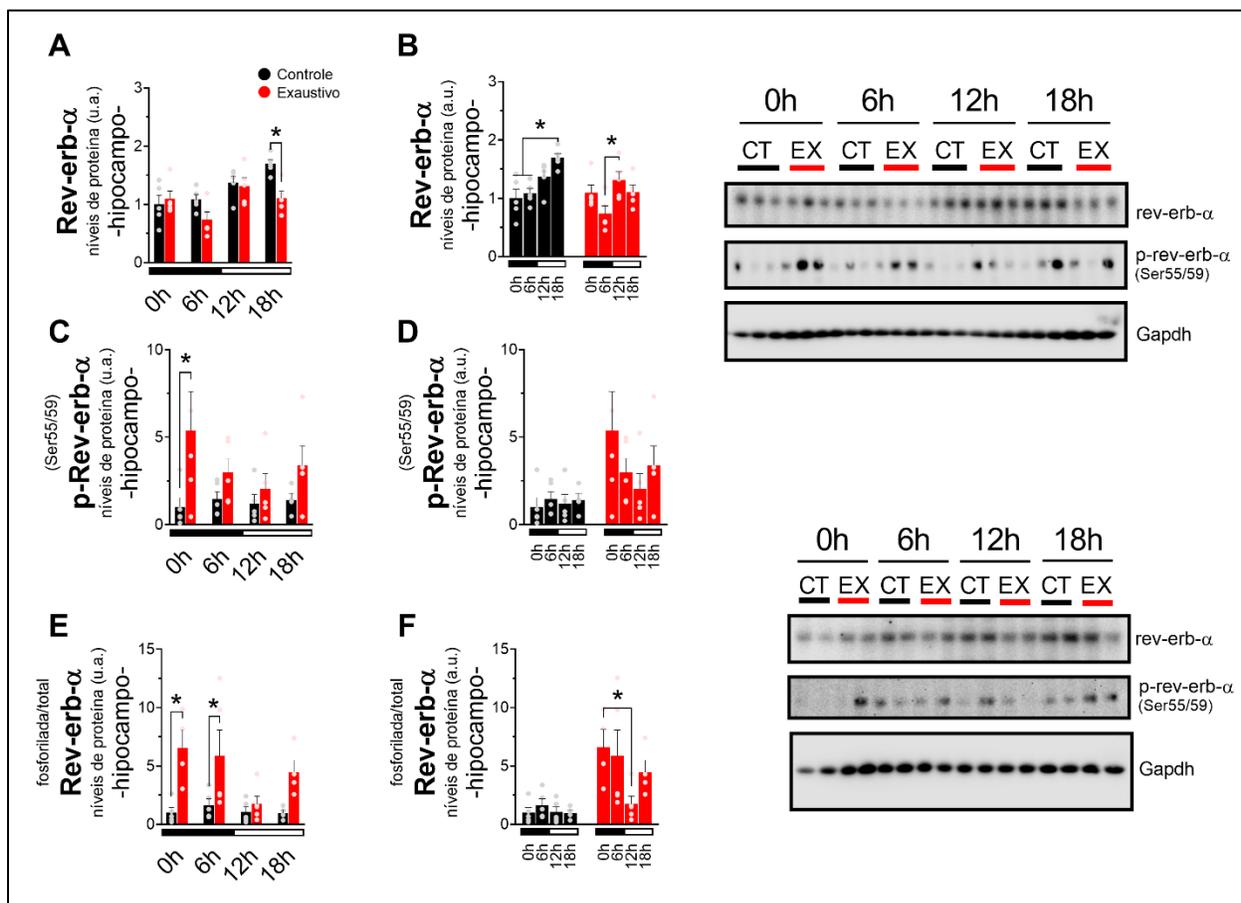


Figura 16. Média \pm erro padrão médio. Conteúdo proteico de (A) Rev-erb- α nuclear, (B) Rev-erb- α citosólica e (C) teste de contaminação do extrato nuclear e citosólico no gastrocnêmio imediatamente ao final da sessão de exercício físico exaustivo. Os diferentes extratos celulares foram incubados com anticorpos específicos para núcleo (Histona H3) e citosol (Gapdh). * $p < 0,01$; $n = 4-5$. u.a = unidades arbitrárias

A figura 17 apresenta a resposta da proteína Rev-erb- α , Rev-erb- α fosforilada e a razão das duas no hipocampo. O grupo EX exibiu menor concentração da Rev-erb- α quando comparado com o grupo CT no tempo 18h (Figura 17.A). Quando comparado entre os tempos, o grupo CT apresentou maiores valores no tempo 18h quando comparado aos tempos 0 e 6h. Já o grupo EX demonstrou maior concentração da Rev-erb- α no tempo 12h quando comparado ao tempo 6h (Figura 17.B). O grupo EX exibiu maior concentração de p-Rev-erb- α quando comparado com o grupo CT no tempo 0h (Figura 17.C). Os grupos experimentais não apresentaram diferenças nas

concentrações de p-Rev-erb- α entre os tempos analisados (Figura 17.D). Quando realizada a razão entre a p-Rev-erb- α e Rev-erb- α total, o grupo EX apresentou maiores valores quando comparado com o grupo CT nos tempos 0 e 6h (Figura 17.E). O grupo EX apresentou menores valores no tempo 12h quando comparado com o seu próprio tempo 0h (Figura 17.F).



6.6 Respostas da 5-HT, DOPA e genes/proteínas da via dopaminérgica

A figura 18 apresenta o comportamento da serotonina e dopamina (DOPA) no hipocampo em resposta ao exercício físico exaustivo. Os grupos EX e CT não apresentaram diferenças, nem entre si e nem entre tempos, nas concentrações de 5-HT no hipocampo (Figura 18.A e 18.B). O grupo EX exibiu maiores concentrações de DOPA no hipocampo quando comparado com o grupo CT no tempo 0h (Figura 18.C). Quando comparado entre os tempos, o grupo EX exibiu maiores valores no tempo 0h quando comparado com os tempos 6, 12 e 18h (Figura 18.E).

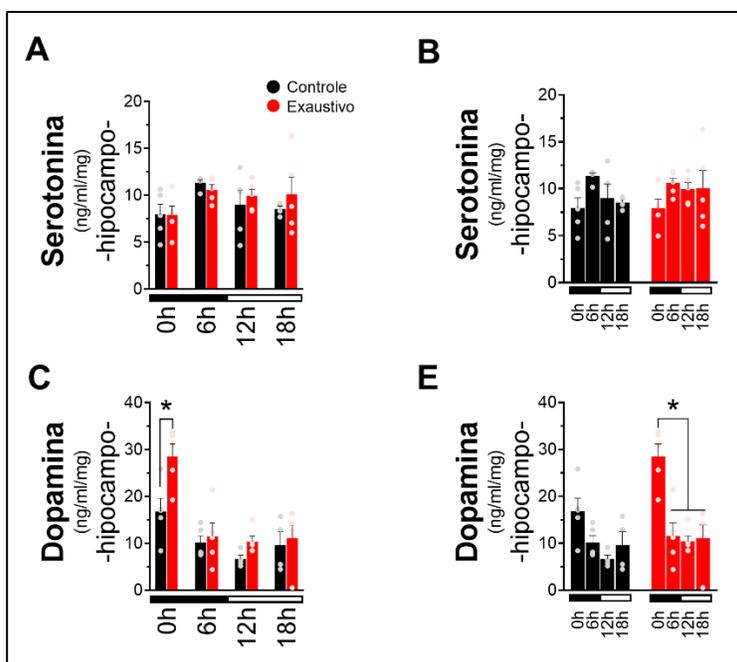


Figura 18. Média \pm erro padrão médio. Concentração de (A e B) serotonina e (C e D) dopamina no hipocampo. * $p < 0,05$; $n = 4-5$.

A figura 19 apresenta as respostas dos genes e proteínas relacionadas a síntese e liberação de DOPA no hipocampo. O grupo EX apresentou menor expressão do gene *Th* quando comparado com o grupo CT no tempo 0h (Figura 19.A). Quando comparados entre os tempos, os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa (Figura 19.B). Não existem diferenças na expressão do gene *Slc18a2*, nem entre os grupos experimentais (Figura 19.C), nem entre os diferentes tempos analisados (Figura 19.D). O grupo EX apresentou menor concentração da proteína *Tyrosine hydroxylase* quando comparado ao grupo CT no tempo 0h (Figura 19.E). O grupo CT apresentou menores valores dessa proteína no tempo 6h quando comparado com o tempo 0h (Figura 19.F). O grupo EX apresentou menores concentrações da proteína *Synaptic vesicular ammine transporter* quando comparado com o grupo CT no tempo 6h (Figura 19.G). Os grupos não apresentaram diferença significativa entre os diferentes tempos analisados para essa proteína (Figura 19.H).

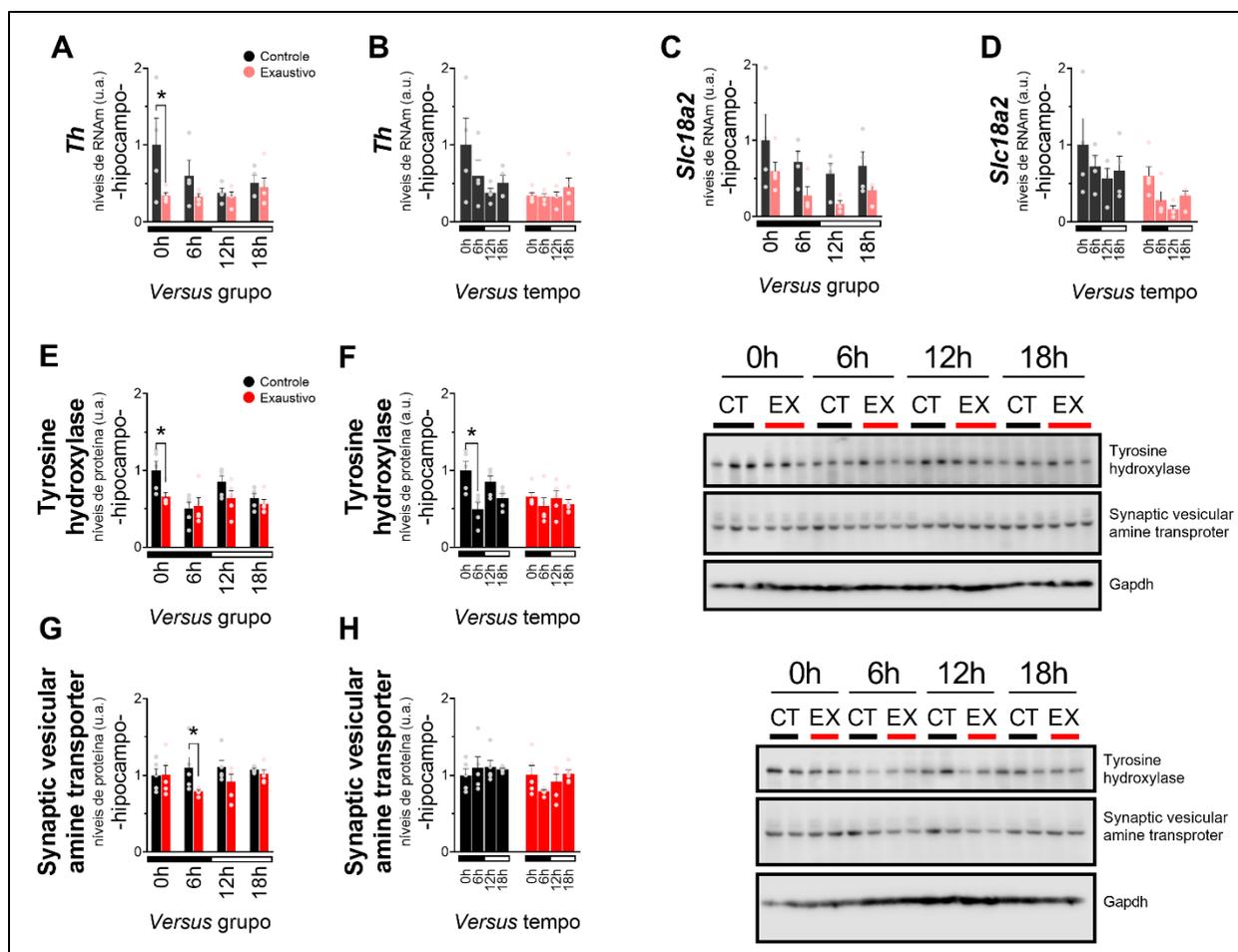


Figura 19. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de (A e B) *Th* e (C e D) *Slc18a2* no hipocampo. Níveis proteicos de (A e B) *Tyrosine hydroxylase* e (C e D) *Synaptic vesicular amine transporter* no hipocampo. * $p < 0,05$; $n = 5$ por grupo/tempo.

6.7 Respostas dos metabólitos, genes e proteínas da via da KYN ao exercício físico exaustivo

A figura 20 apresenta as respostas dos metabólitos triptofano (TRP), quinurenina (KYN) e ácido quinurênico (KYNA) no gastrocnêmio, soro e hipocampo do grupo CT e grupo dos animais submetidos a uma sessão de exercício físico exaustivo. Os grupos não apresentaram diferença significativa nas concentrações de TRP em nenhum dos tecidos analisados (Figura 20.A, 20.B e 20.C). Comparado com grupo CT, o grupo EX apresentou menor concentração de KYN no músculo gastrocnêmio. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nas concentrações de KYNA nesse tecido (Figura 20.D). Os grupos não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de KYN e KYNA nem no soro e nem no hipocampo (Figura 20.E e 20.F). Quando realizada a razão entre KYN e TRP, o grupo EX exibiu menores valores quando

comparado com o grupo CT no músculo gastrocnêmio e maiores valores no hipocampo (Figuras 20.G e 20.I).

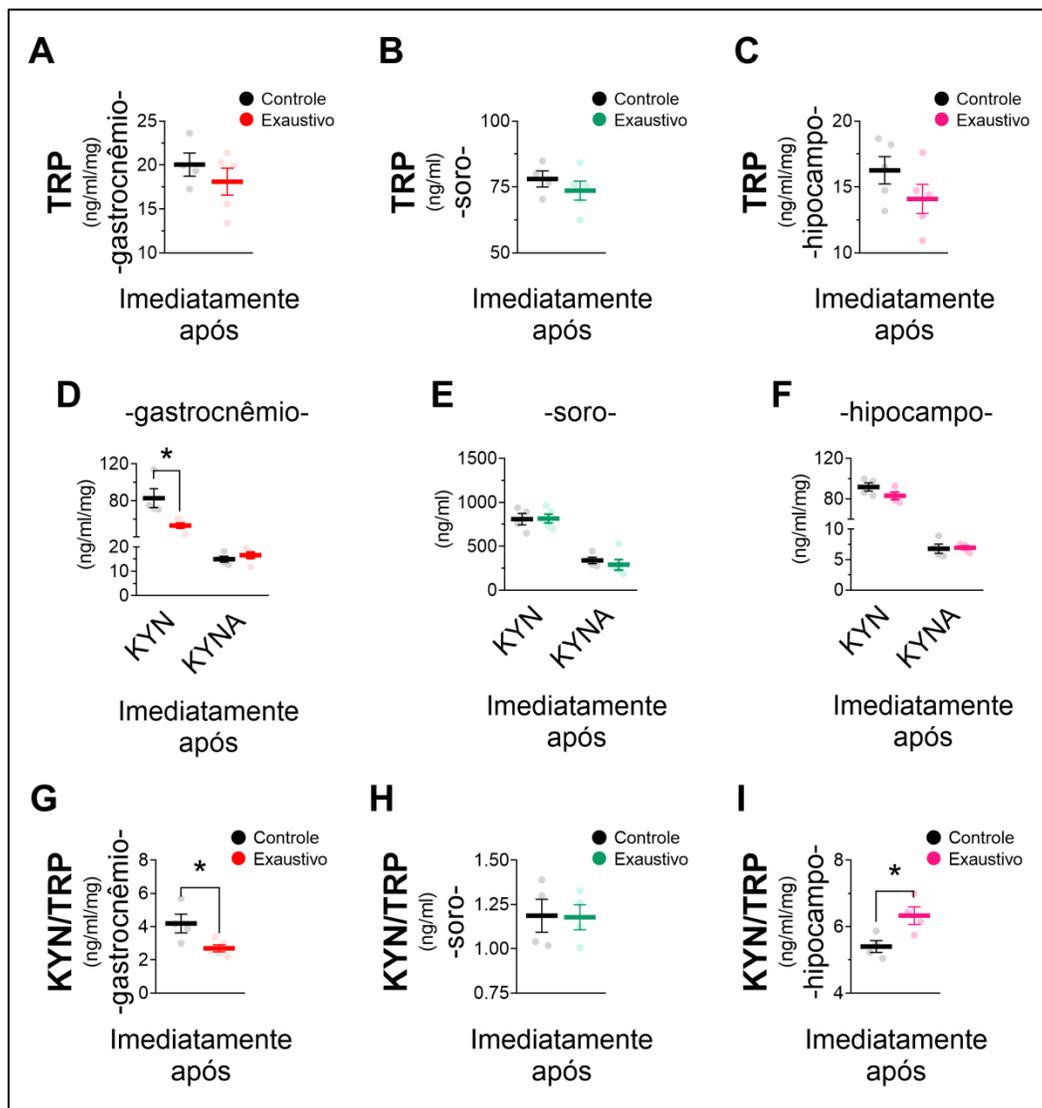


Figura 20. Média \pm erro padrão médio. Concentração de triptofano (TRP) no (A) gastrocnêmio, (B) soro e (C) hipocampo; quinurenina (KYN) e ácido quinurênico (KYNA) no (D) gastrocnêmio, (E) soro e (F) hipocampo; razão KYN/TRP no (G) gastrocnêmio, (H) soro e (I) hipocampo imediatamente após sessão de exercício físico exaustivo. * $p < 0,05$; $n = 4-5$.

A figura 21 apresenta as respostas dos principais genes e proteínas responsáveis pela produção dos metabólitos da via da KYN no gastrocnêmio. O grupo EX apresentou menor expressão de *Kyat1* quando comparado com o grupo CT nos tempos 0, 6 e 12h (Figura 21.A). O grupo CT exibiu redução na expressão de *Kyat1* no tempo 18h quando comparado ao tempo 6h (Figura 21.B). O grupo EX apresentou maior expressão de *Kmo* quando comparado com o grupo CT no tempo 18h (Figura 21.C). Além disso, esse grupo demonstrou aumento da expressão da

Kmo nos tempos 12 e 18h quando comparado com o tempo 0h (Figura 21.D). O grupo EX apresentou menores concentrações da enzima *Kynurenine aminotransferase I* quando comparado com o grupo CT nos tempos 0 e 6h (Figura 21.E). Quando comparado entre os tempos, o grupo CT apresentou redução na concentração da *Kynurenine aminotransferase I* nos tempos 6, 12 e 18h quando comparado com o tempo 0h. Além disso, o tempo 12h apresentou menores valores quando comparado com o tempo 6h (Figura 21.F). Os grupos experimentais não apresentaram diferença entre si nas concentrações da enzima *Kynurenine 3-monooxygenase* no gastrocnêmio (Figura 21.G). Quando comparado entre os tempos, o grupo EX apresentou aumento na expressão da *Kynurenine 3-monooxygenase* no tempo 8h quando comparado com os tempos 6 e 12h (Figura 21.H). A proteína Rev-erb- α apresentou forte correlação com a *Kynurenine aminotransferase I*, *Kmo* e *Nr1d1* no gastrocnêmio dos animais do grupo CT (Figura 22).

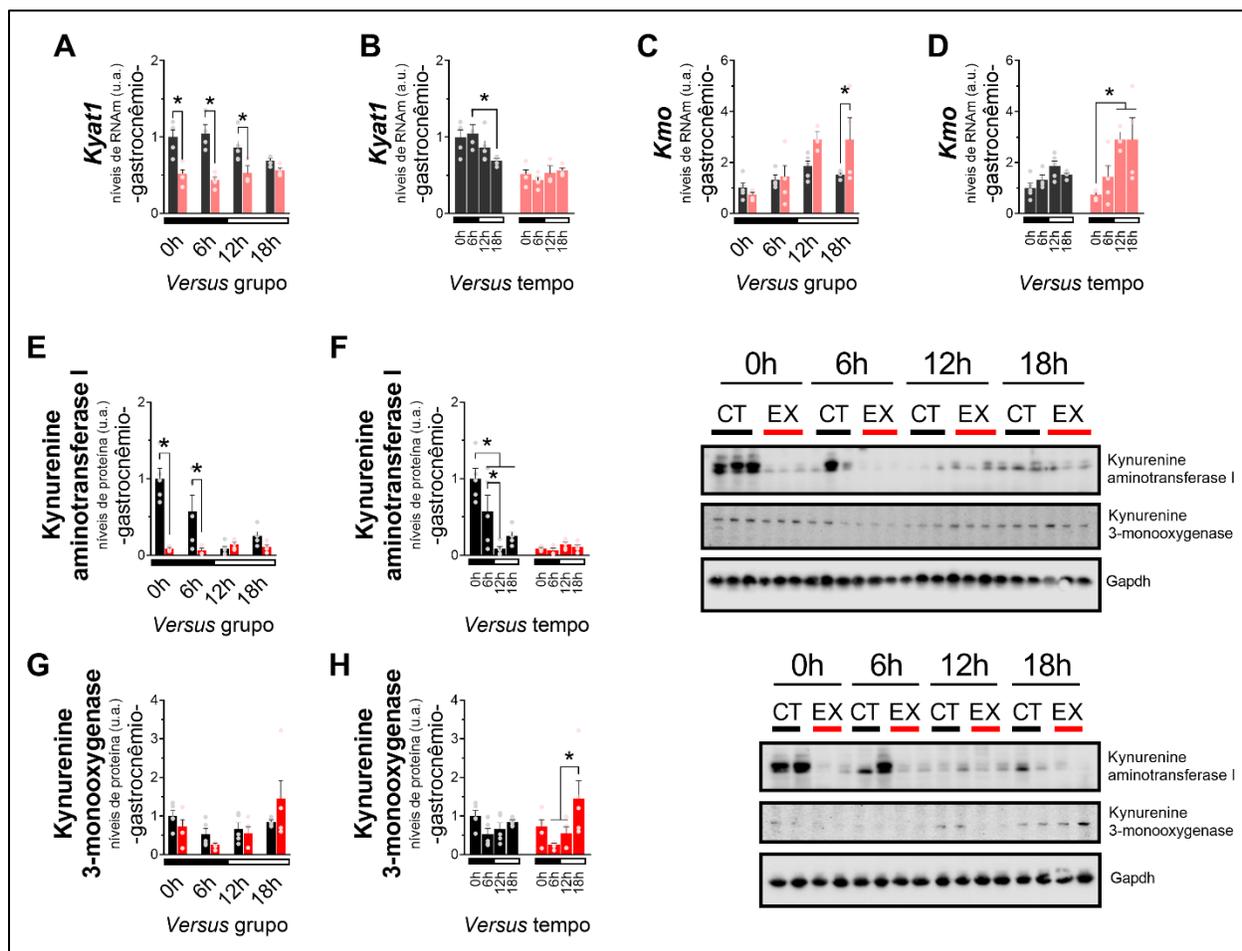


Figura 21. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de (A e B) *Kyat1* e (C e D) *Kmo* no gastrocnêmio. Conteúdo proteico de (E e F) *Kynurenine aminotransferase I* e (G e H) *Kynurenine 3-monooxygenase* no gastrocnêmio. * $p < 0,05$; $n = 5$.

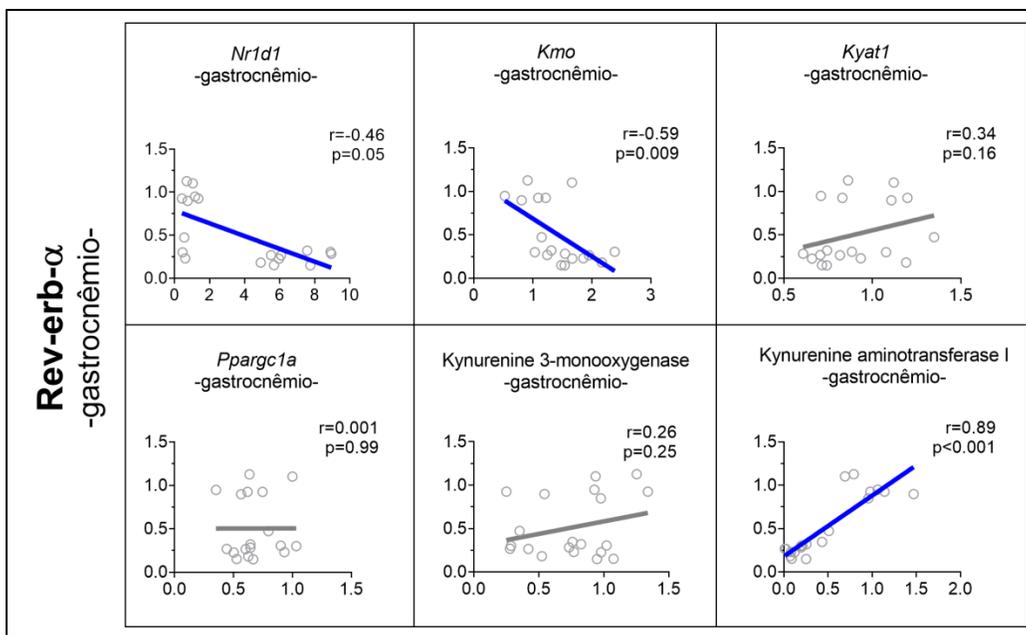


Figura 22. Correlação entre o conteúdo proteico de Rev-erb- α e RNAm de: *Nr1d1*, *Ppargc1a*, *Kmo* e *Kyat1*; e conteúdo proteico de: *Kynurenine 3-monooxygenase* e *Kynurenine aminotransferase I* no gastrocnêmio. n=20.

A figura 23 apresenta as respostas dos principais genes e proteínas responsáveis pela produção dos metabólitos da via da KYN no hipocampo. Os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa na expressão do gene *Kyat1* nem entre si, nem entre os tempos analisados (Figura 23.A e 23.B). O grupo EX demonstrou maior expressão do gene *Kmo* quando comparado ao grupo CT nos tempos 12 e 18h (Figura 23.C). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os tempos dos grupos experimentais para a expressão desse gene (Figura 23.D). O grupo EX apresentou menores concentrações da enzima *Kynurenine aminotransferase I* quando comparado ao grupo CT no tempo 0h no hipocampo (Figura 23.E). Quando comparados entre os tempos, os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa nas concentrações dessa enzima (Figura 23.F). Os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa nas concentrações da enzima *Kynurenine 3-monooxygenase* nem entre si, nem entre os tempos analisados (Figura 23.G e 23.H).

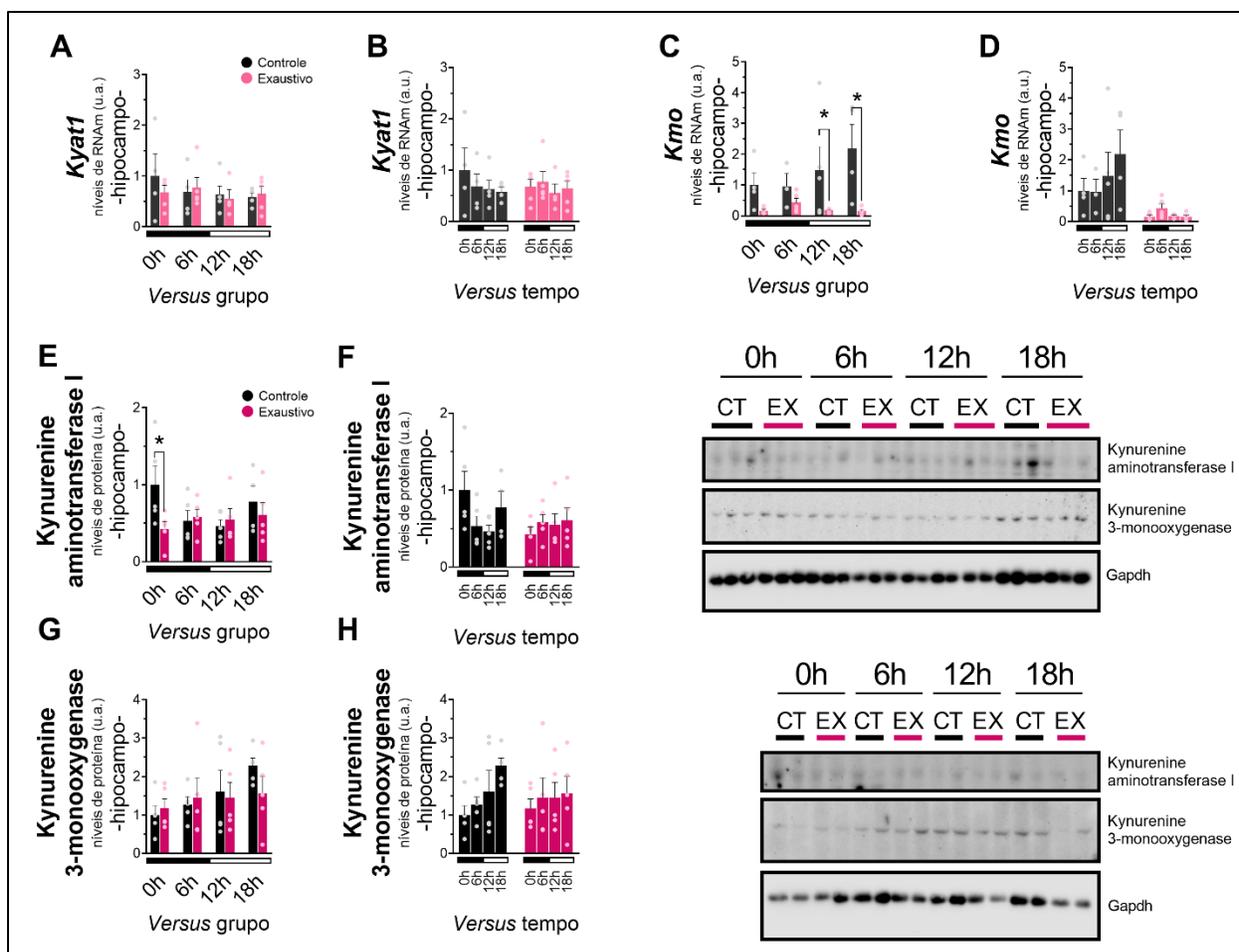


Figura 23. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de (A e B) *Kyat1* e (C e D) *Kmo* no hipocampo. Conteúdo proteico de (E e F) *Kynurenine aminotransferase I* e (G e H) *Kynurenine 3-monoxygenase* no hipocampo. * $p < 0,05$; $n = 5$.

6.8 Respostas dos metabólitos, genes e proteínas ao tratamento com SR9009

A figura 24 apresenta as respostas dos metabólitos TRP, KYN, KYNA, 5-HT e DOPA ao tratamento com o fármaco SR9009 no gastrocnêmio, soro e hipocampo. O grupo SR9009 não apresentou diferenças nas concentrações de TRP quando comparado com o grupo Veículo em nenhum dos tecidos analisados (gastrocnêmio e hipocampo) e no soro (Figura 24.A, 24.B e 24.C, respectivamente). O grupo SR9009 apresentou maiores concentrações de KYN, tanto no gastrocnêmio, quanto no soro, quando comparado ao grupo Veículo (Figuras 24.D e 24.E). Os grupos não apresentaram diferença significativa nas concentrações de KYN no hipocampo (Figura 24.F). Além disso, não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de KYNA em nenhum tecido analisado. Quando realizada a razão entre KYN e TRP, somente no soro o grupo SR9009 apresentou maiores valores quando comparado com o grupo Veículo (Figura 24.H). O grupo SR9009 apresentou maiores concentrações de 5-HT no hipocampo quando comparado com

o grupo Veículo (Figura 24.J). Não foram encontradas diferenças nas concentrações de DOPA no hipocampo entre os grupos experimentais (Figura 24.K).

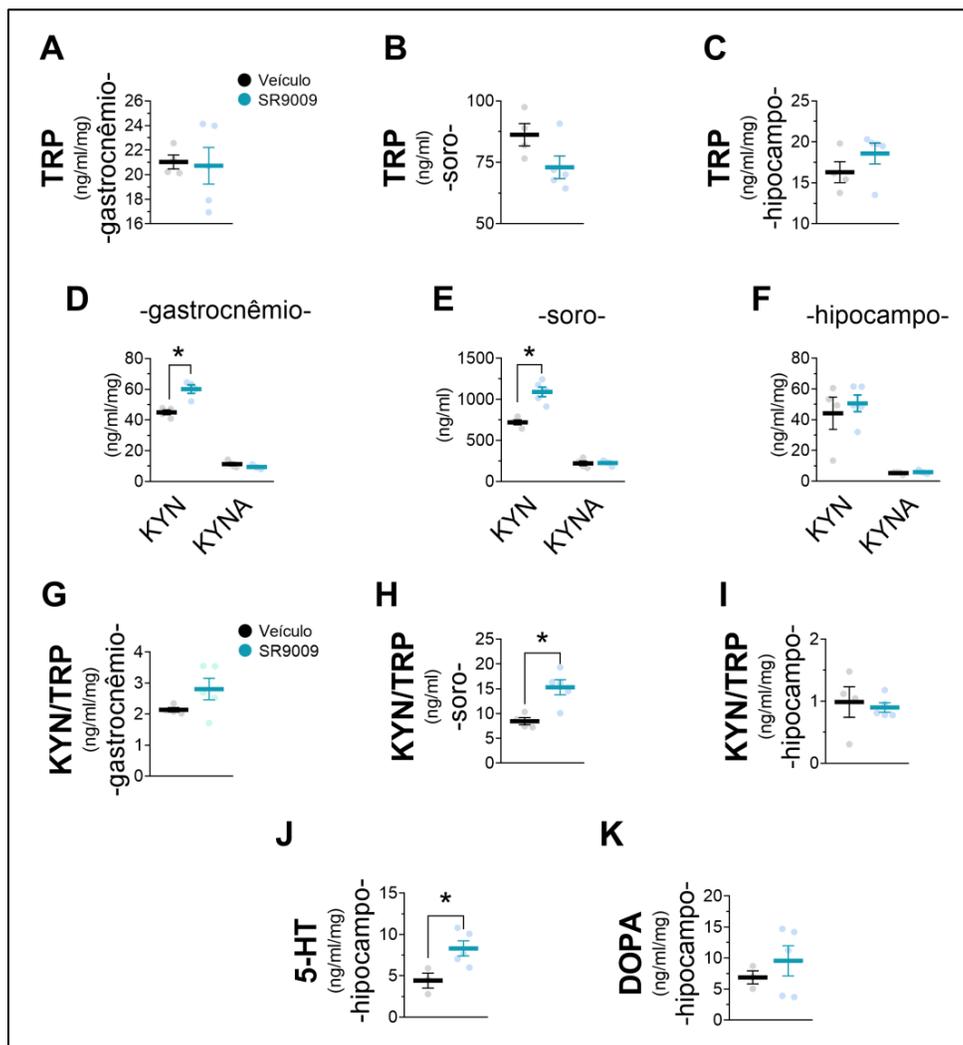


Figura 24. Média \pm erro padrão médio. Concentrações de triptofano (TRP) no (A) gastrocnêmio, (B) soro e (C) hipocampo; quinurenina (KYN) e ácido quinurênico (KYNA) no (D) gastrocnêmio, (E) soro e (F) hipocampo; razão KYN/TRP no (G) gastrocnêmio, (H) soro e (I) hipocampo; (J) serotonina (5-HT) e (K) dopamina (DOPA) no hipocampo de animais tratados por 3 dias consecutivos com Veículo (cromophor 15%) ou SR9009. * $p < 0,05$; $n = 3-5$.

A figura 25 apresenta as respostas dos genes e proteínas relacionadas a Rev-erb- α e via da KYN. O grupo SR9009 demonstrou maior expressão do gene *Kyat1* quando comparado com o grupo Veículo, tanto no gastrocnêmio, quanto no hipocampo (Figura 25.A e 25.B). Os genes *Nr1d1* e *Kmo* não apresentaram diferença entre os grupos experimentais em nenhum dos tecidos analisados. O grupo SR9009 apresentou maiores concentrações da p-Rev-erb- α e da razão com a Rev-erb- α total no músculo gastrocnêmio quando comparado com o grupo Veículo (Figura 25.C).

Já no hipocampo, o grupo SR9009 apresentou menores concentrações da p-Rev-erb- α e da razão com a Rev-erb- α total quando comparado com o grupo Veículo (Figura 25.D). O grupo tratado apresentou diminuição do conteúdo de *Kynurenine 3-monooxygenase* no hipocampo (Figura 25.F) Não foram encontradas diferenças nas concentrações das outras proteínas relacionadas a via da KYN (Figura 25.E e 25.F).

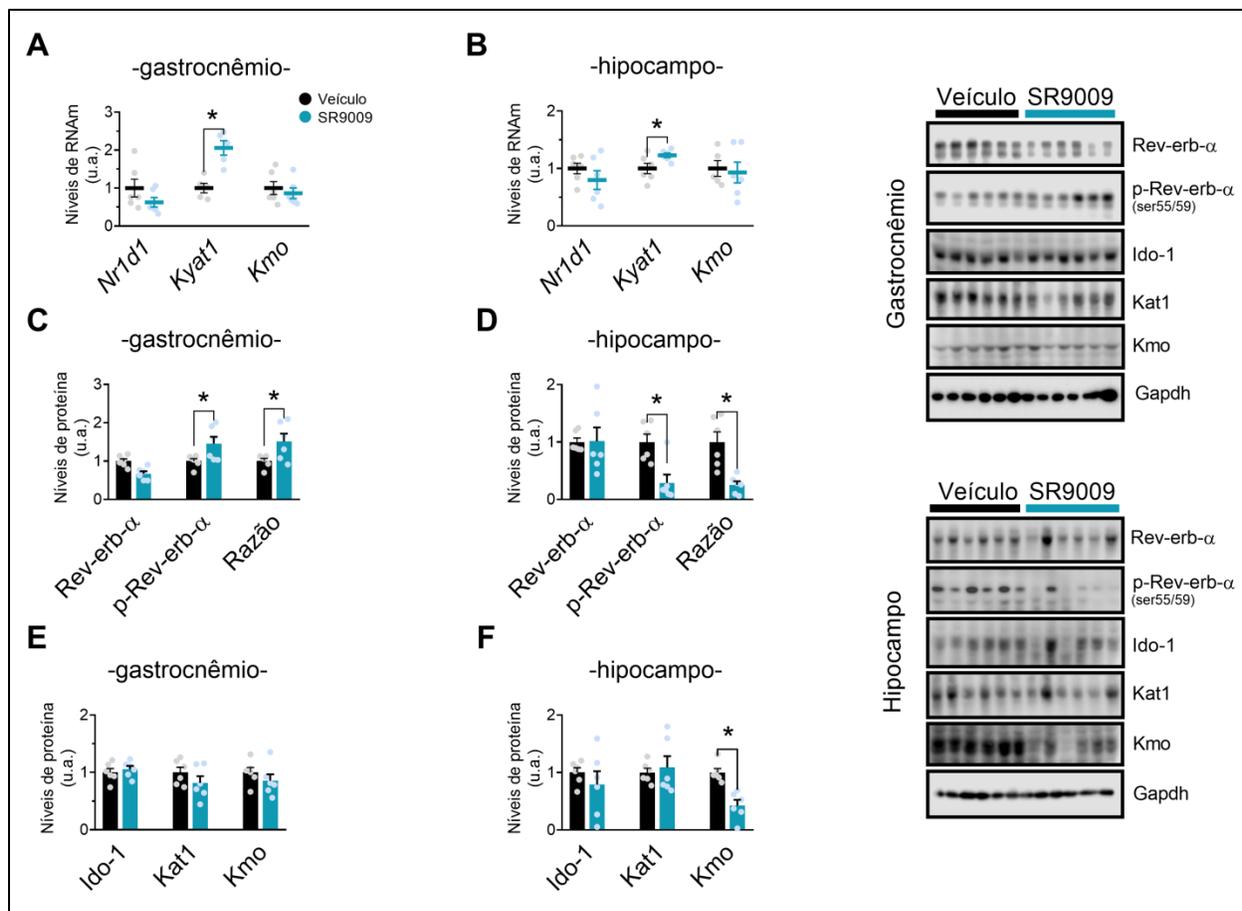


Figura 25. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de *Nr1d1*, *Kyat1* e *Kmo* no (A) gastrocnêmio e (B) hipocampo. Conteúdo proteico de Rev-erb- α , p-Rev-erb- α e razão entre fosforilada e total no (C) gastrocnêmio e (D) hipocampo. Conteúdo de *Indoleamine 2,3-dioxygenase 1* (Ido-1), *Kynurenine aminotransferase* (Kat1) e *Kynurenine 3-monooxygenase* (Kmo) no (E) gastrocnêmio e (F) hipocampo. * $p < 0,05$; $n = 5-6$.

6.9 Respostas do *Nr1d1* e da Rev-erb- α ao overtraining

A figura 26 apresenta o comportamento do gene *Nr1d1* no músculo gastrocnêmio e no hipocampo em animais submetidos ao protocolo de *overtraining*. O grupo OT apresentou maior expressão do *Nr1d1* quando comparado ao grupo SE no horário 12:00 no gastrocnêmio (Figura 26.A). Quando comparados aos diferentes horários, ambos os grupos apresentaram aumento na

expressão de *Nr1d1* no tempo 12:00 quando comparado aos horários 18:00, 00:00 e 06:00 (Figura 26.B). Já no hipocampo, o grupo OT apresentou menor expressão de *Nr1d1* quando comparado ao grupo SE no horário 18:00 (Figura 26.C). Somente o grupo SE apresentou diferenças significativas na expressão do gene *Nr1d1* entre os horários 18:00/12:00 e 00:00/06:00 (Figura 26.D).

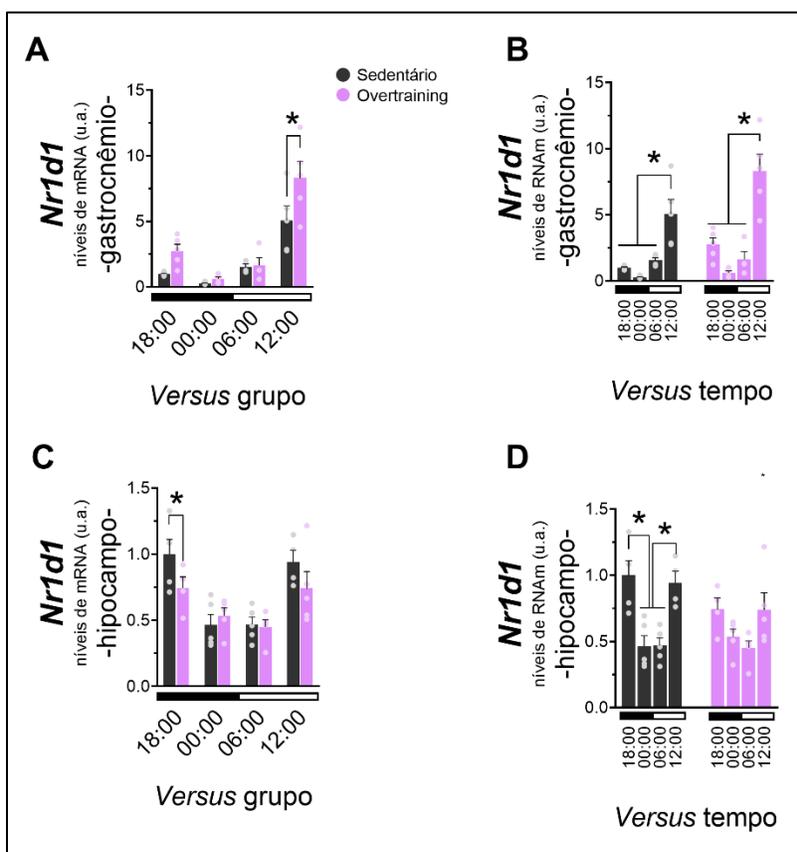


Figura 26. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de *Nr1d1* no (A e B) gastrocnêmio e (C e D) hipocampo em grupos sedentários e submetidos ao protocolo de *overtraining* em diferentes horários do ciclo circadiano. * $p < 0,05$; $n = 5$.

A figura 27 apresenta o comportamento da proteína Rev-erb- α , p-Rev-erb- α e sua razão no gastrocnêmio em animais submetidos ao protocolo de *overtraining*. O grupo OT exibiu menores concentrações da proteína Rev-erb- α no horário 12:00 quando comparado ao grupo SE (Figura 27.A). Não foram encontradas diferenças significativas da Rev-erb- α entre os horários nos grupos experimentais (Figura 27.B). Os grupos não apresentaram diferença significativa entre si nas concentrações de p-Rev-erb- α nos diferentes horários analisados (Figura 27.C). O grupo OT exibiu maior fosforilação da Rev-erb- α no tempo 12:00 quando comparado com os horários 18:00 e 00:00 (Figura 27.D). A razão entre p-Rev-erb- α e Rev-erb- α total apresentou maiores valores para o grupo OT no horário 12:00 quando comparado com o grupo SE (Figura 27.E). Quando comparado

entre seus diferentes horários, o grupo OT demonstrou maiores valores da razão nos horários 06:00 e 12:00 quando comparados aos horários 18:00 e 00:00 (Figura 27.F).

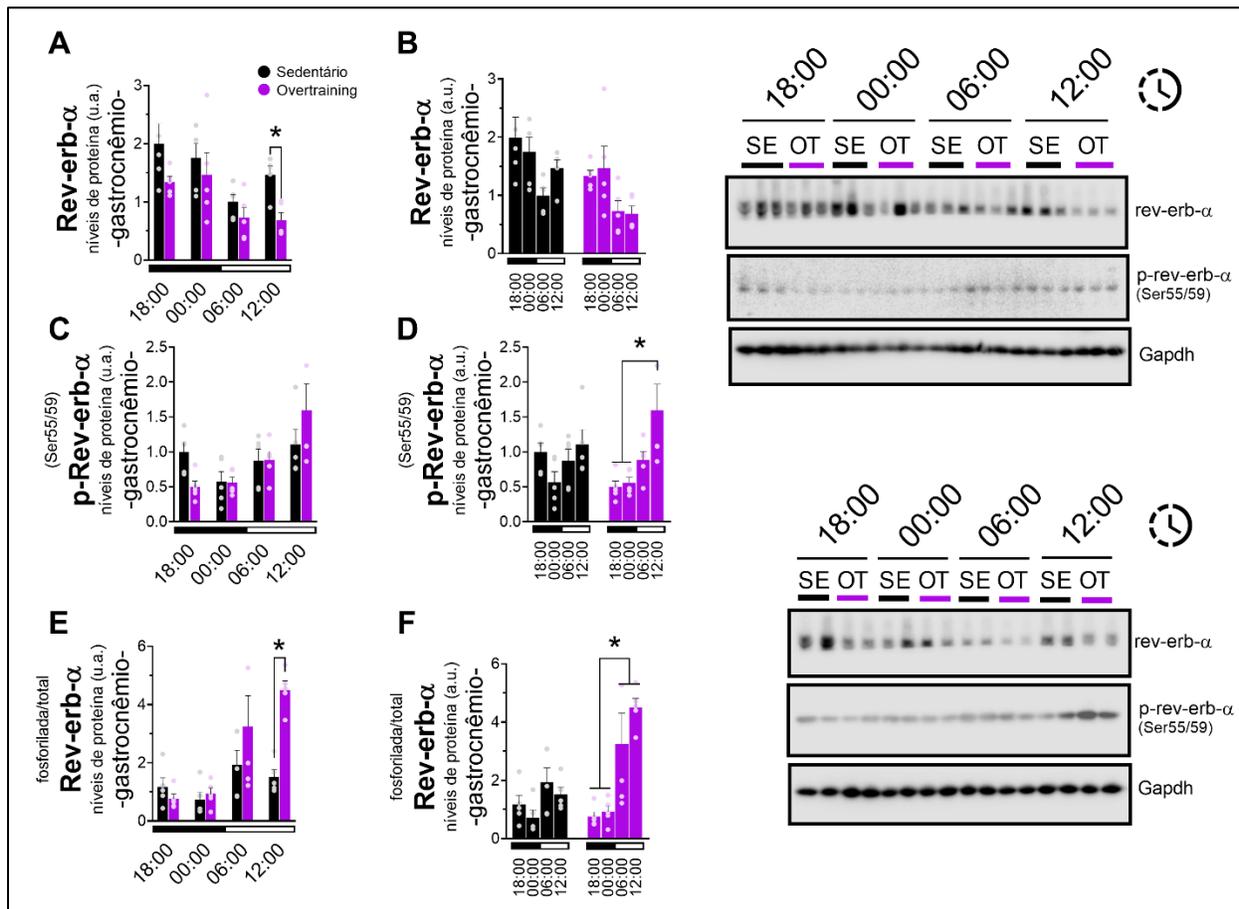


Figura 27. Média \pm erro padrão médio. Conteúdo proteico de (A e B) Rev-erb- α total, (C e D) p-Rev-erb- α e (E e F) razão fosforilada/total no gastrocnêmio de animais sedentários e submetidos ao protocolo de *overtraining*. * $p < 0,05$; $n = 5$ por grupo.

A figura 28 apresenta o comportamento da proteína Rev-erb- α , p-Rev-erb- α e sua razão no hipocampo em animais submetidos ao protocolo de *overtraining*. O grupo OT apresentou maior concentração da proteína Rev-erb- α no tempo 12:00 quando comparado com o grupo SE no hipocampo (Figura 28.A). Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de Rev-erb- α entre os diferentes horários analisados dos grupos experimentais (Figura 28.B). Não foram encontradas diferenças nas concentrações da p-Rev-erb- α , nem entre grupos, nem entre horários analisados (Figuras 28.C e 28.D). O grupo OT demonstrou redução nos valores da razão entre p-Rev-erb- α e Rev-erb- α total no horário 18:00 quando comparado com o grupo SE (Figura 28.E). Quando comparado entre os diferentes horários, o grupo SE apresentou menores valores da razão nos horários 06:00 e 12:00 quando comparados ao horário 18:00 (Figura 28.F).

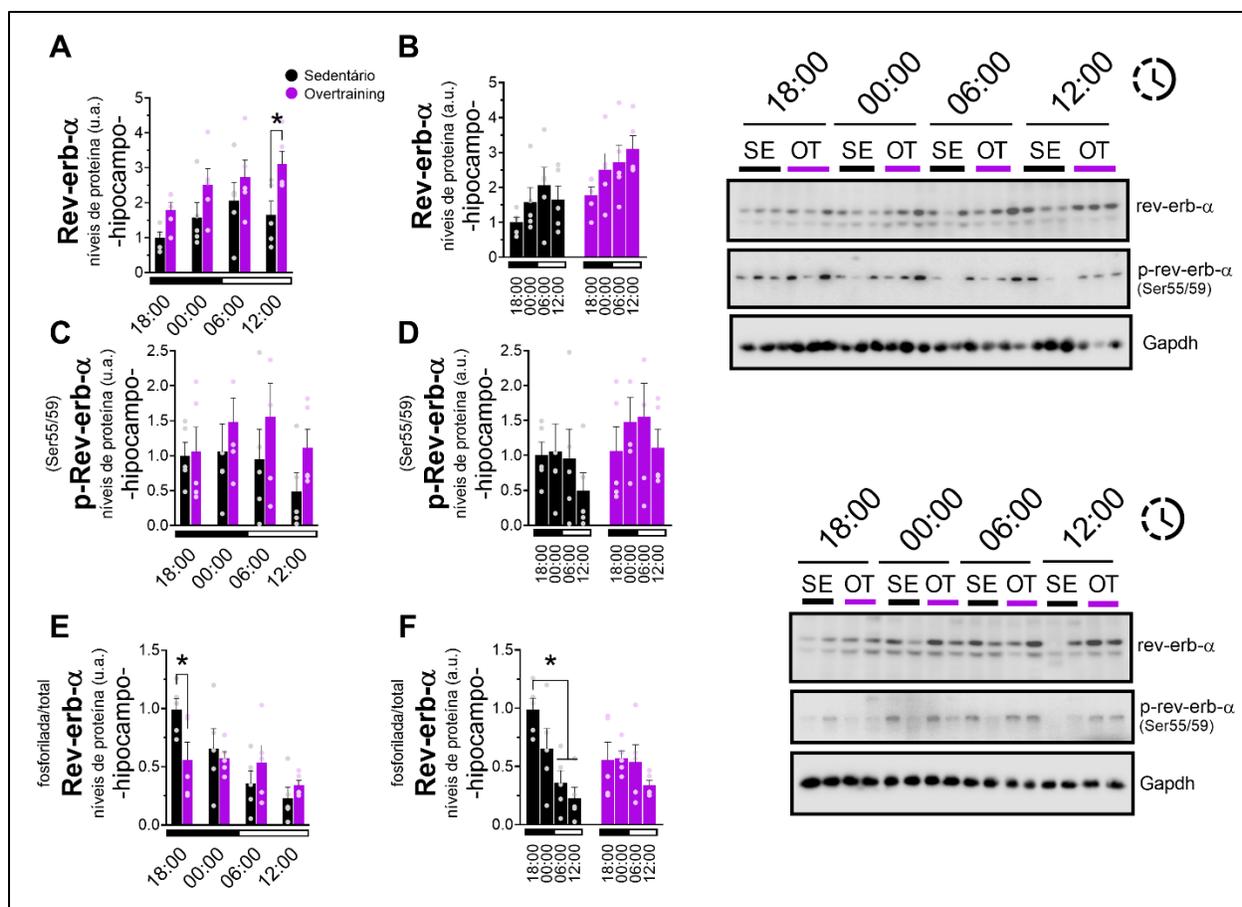


Figura 28. Média \pm erro padrão médio. Conteúdo proteico de (A e B) Rev-erb- α total, (C e D) p-Rev-erb- α e (E e F) razão fosforilada/total no hipocampo de animais sedentários e submetidos ao protocolo de *overtraining*. * $p < 0,05$; $n = 5$ por grupo.

6.10 Respostas dos metabólitos, genes e proteínas da via da KYN ao *overtraining*

A figura 29 apresenta as concentrações de triptofano (TRP), quinurenina (KYN), ácido quinurênico (KYNA) no soro e serotonina (5-HT) e dopamina (DOPA) no hipocampo. Os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa nas concentrações de TRP, KYN, KYNA e 5-HT (Figura 29.A e 29.B). O grupo OT apresentou uma tendência para maiores valores de DOPA no horário 12:00 quando comparado ao grupo sedentário (Figura 29.D).

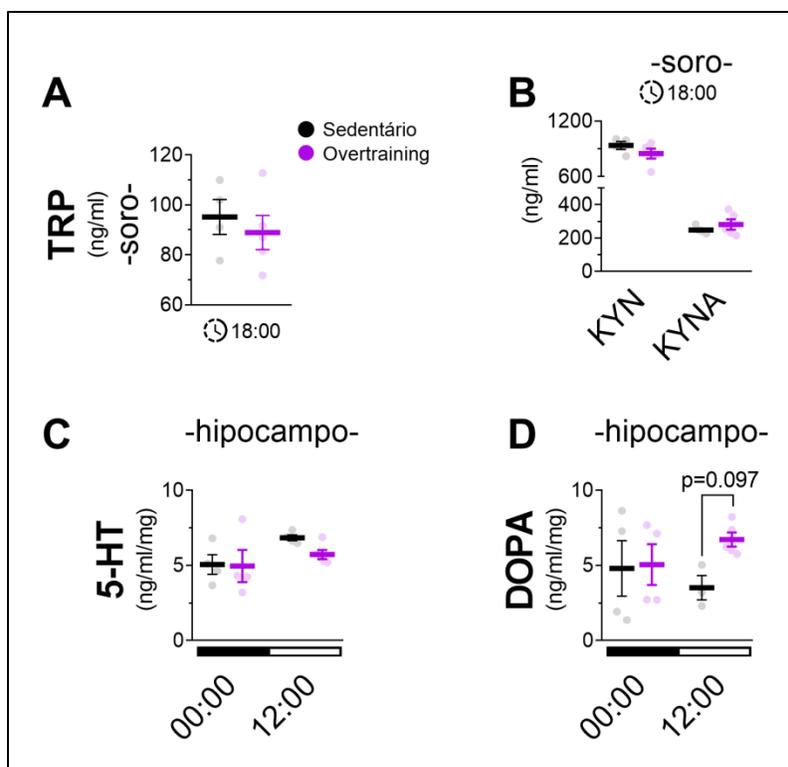


Figura 29. Média \pm erro padrão médio. Concentrações de (A) triptofano (TRP), (B) quinurenina (KYN) e ácido quinurênico (KYNA) no soro e, (C) serotonina (5-HT) e (D) dopamina (DOPA) no hipocampo de animais sedentário e submetidos ao protocolo de *overtraining*; n=4-5.

A figura 30 exibe as respostas dos principais genes e proteínas relacionadas a via KYN no gastrocnêmio. O grupo OT apresentou menor expressão de *Kyat1* no tempo 12:00 quando comparado ao grupo SE (Figura 30.A). Não houve diferenças significativas quando os grupos foram comparados entre diferentes horários (Figura 30.B). O grupo OT demonstrou maiores níveis de *Kmo* nos tempos 06:00 e 12:00 quando comparado ao grupo SE (Figura 30.C). Quando comparado entre diferentes tempos, o grupo OT apresentou maior expressão de *Kmo* no horário 12:00 quando comparado aos horários 18:00 e 00:00 (Figura 30.D). O grupo OT apresentou menores concentrações de *Kynurenine aminotransferase I* nos tempos 00:00, 06:00 e 12:00 quando comparado ao grupo SED (Figura 30.E). Quando comparados entre diferentes horários, os grupos não apresentaram diferença significativa (Figura 30.F)

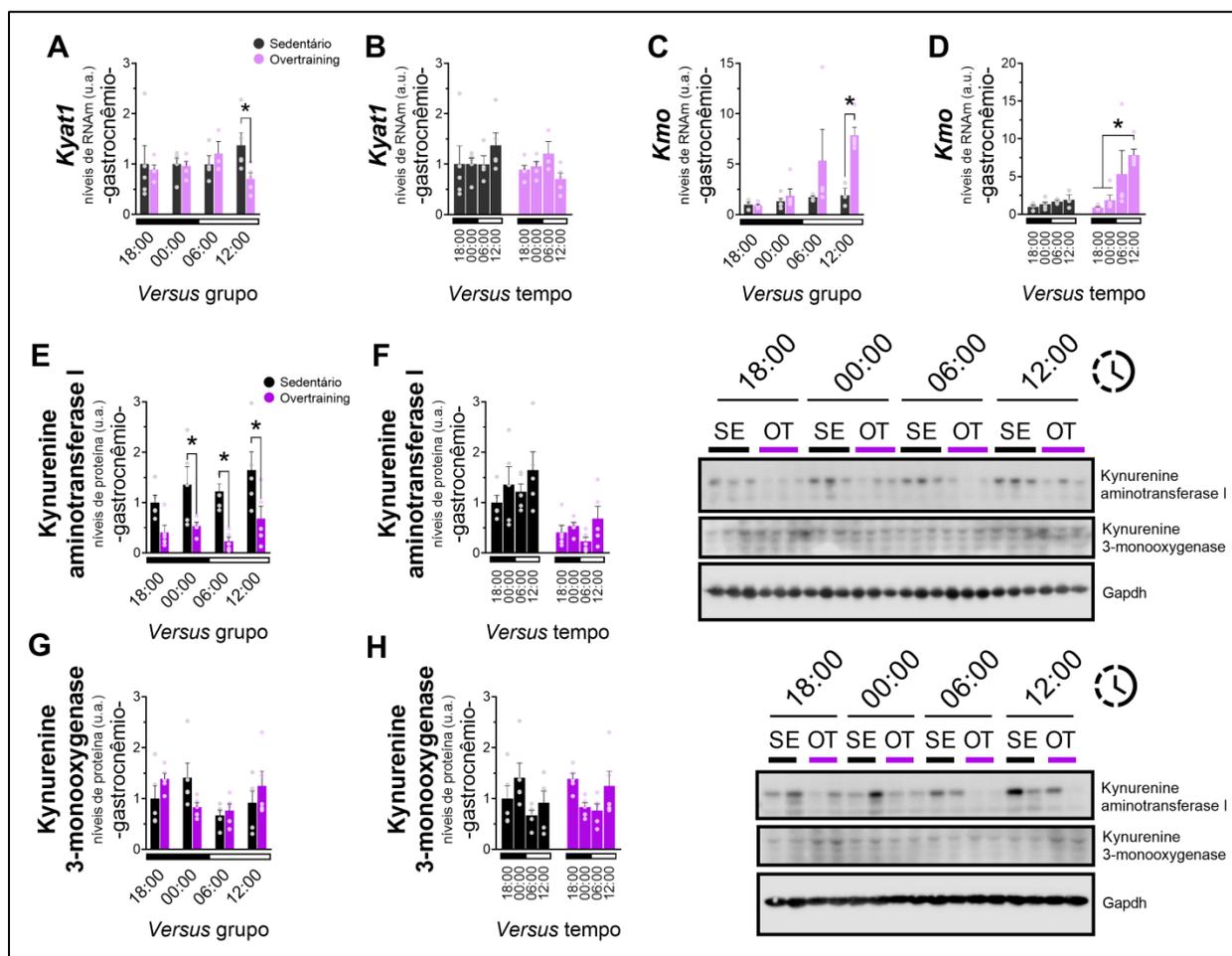


Figura 30. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de (A e B) *Kyat1* e (C e D) *Kmo* no hipocampo. Conteúdo proteico de (E e F) *Kynurenine aminotransferase I* e (G e H) *Kynurenine 3-monooxygenase* no gastrocnêmio. * $p < 0,05$; $n = 5$.

A figura 31 exibe as respostas dos principais genes e proteínas relacionadas a via KYN no hipocampo. O grupo OT apresentou menor expressão do gene *Kyat1* nos horários 18:00 e 00:00 quando comparado ao grupo SED (Figura 31.A). Quando comparado entre os diferentes horários, o grupo SE apresentou menor expressão de *Kyat1* nos horários 06:00 e 12:00 quando comparado ao horário 18:00 (Figura 31.B). O grupo OT demonstrou menor expressão do gene *Kmo* nos horários 18:00 e 00:00 quando comparado ao grupo SE (Figura 31.C). Não houve diferença significativa entre os horários analisados para esse gene (Figura 31.D). Os grupos experimentais não apresentaram diferença, nem entre si, nem entre os horários analisados, para as concentrações da enzima *Kynurenine aminotransferase I* (Figuras 31.E e 31.F). Os grupos não apresentaram diferença entre si nas concentrações da enzima *Kynurenine 3-monooxygenase* (Figura 31.G). O

grupo SE exibiu redução na concentração da *Kynurenine 3-monoxygensase* no horário 12:00 quando comparado aos horários 18:00 e 06:00 (Figura 31.H).

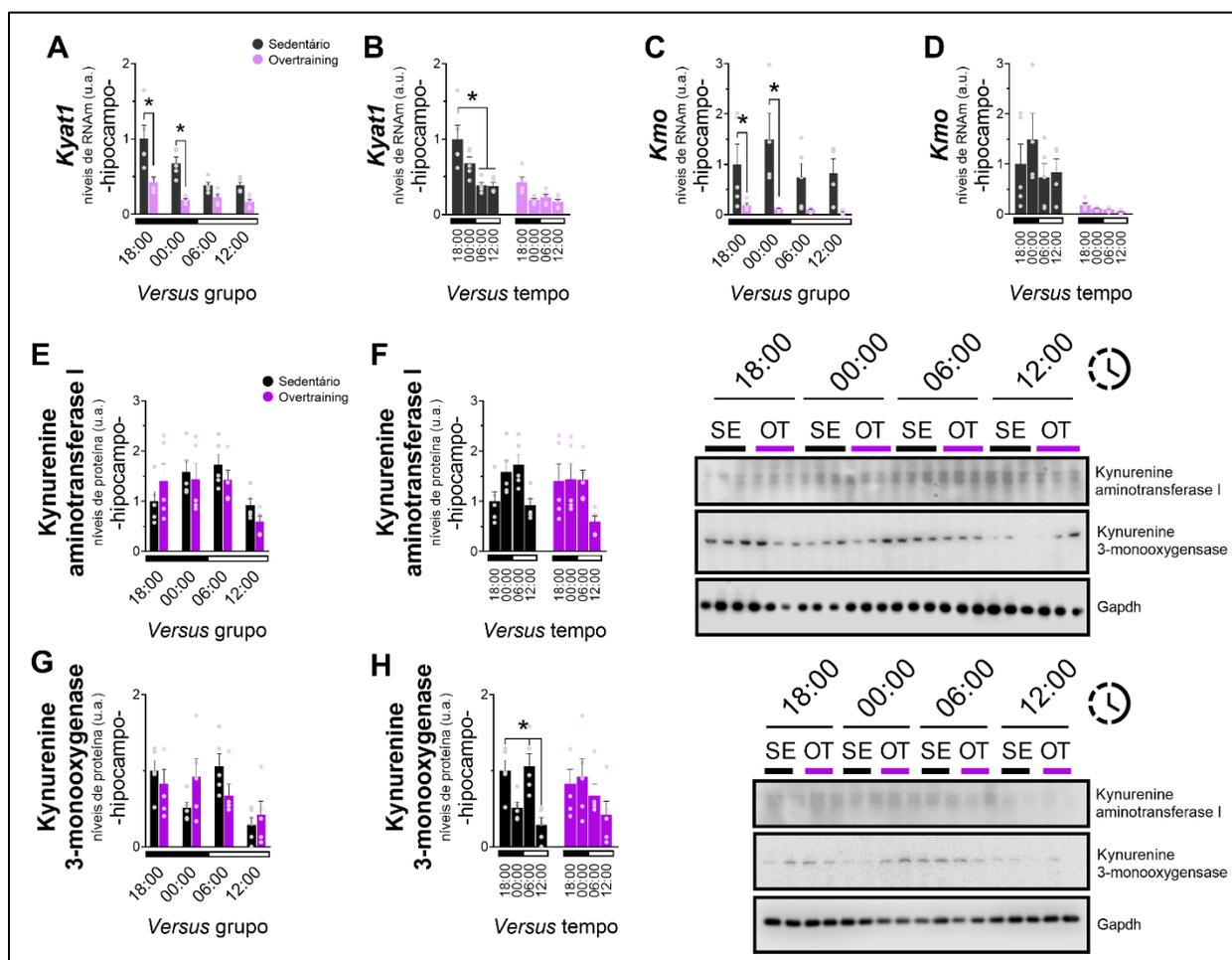


Figura 31. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de (A e B) *Kyat1* e (C e D) *Kmo* no hipocampo. Conteúdo proteico de (E e F) *Kynurenine aminotransferase I* e (G e H) *Kynurenine 3-monoxygensase* no hipocampo. * $p < 0,05$; $n = 5$.

6.11 Respostas da 5-HT, DOPA e proteínas relacionadas a via dopaminérgica ao *overtraining*

A figura 32 apresenta os níveis de RNAm e conteúdo proteico da *Tyrosine hydroxylase* e *Synaptic vesicular amine transporter* durante o ciclo circadiano. Os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa na expressão de RNAm para os genes analisados. O grupo OT apresentou maiores concentrações da proteína *Tyrosine hydroxylase* no horário 12:00 quando comparado ao grupo SE (Figura 32.E). Não houve diferença significativa nas concentrações dessa proteína entre os horários analisados (Figura 32.F). O grupo OT exibiu maiores concentrações da proteína *Synaptic vesicular amine transporter* no horário 18:00 quando comparado com o grupo

SE (Figura 32.G). Não houve diferença significativa nas concentrações dessa proteína entre os horários analisados (Figura 32.H).

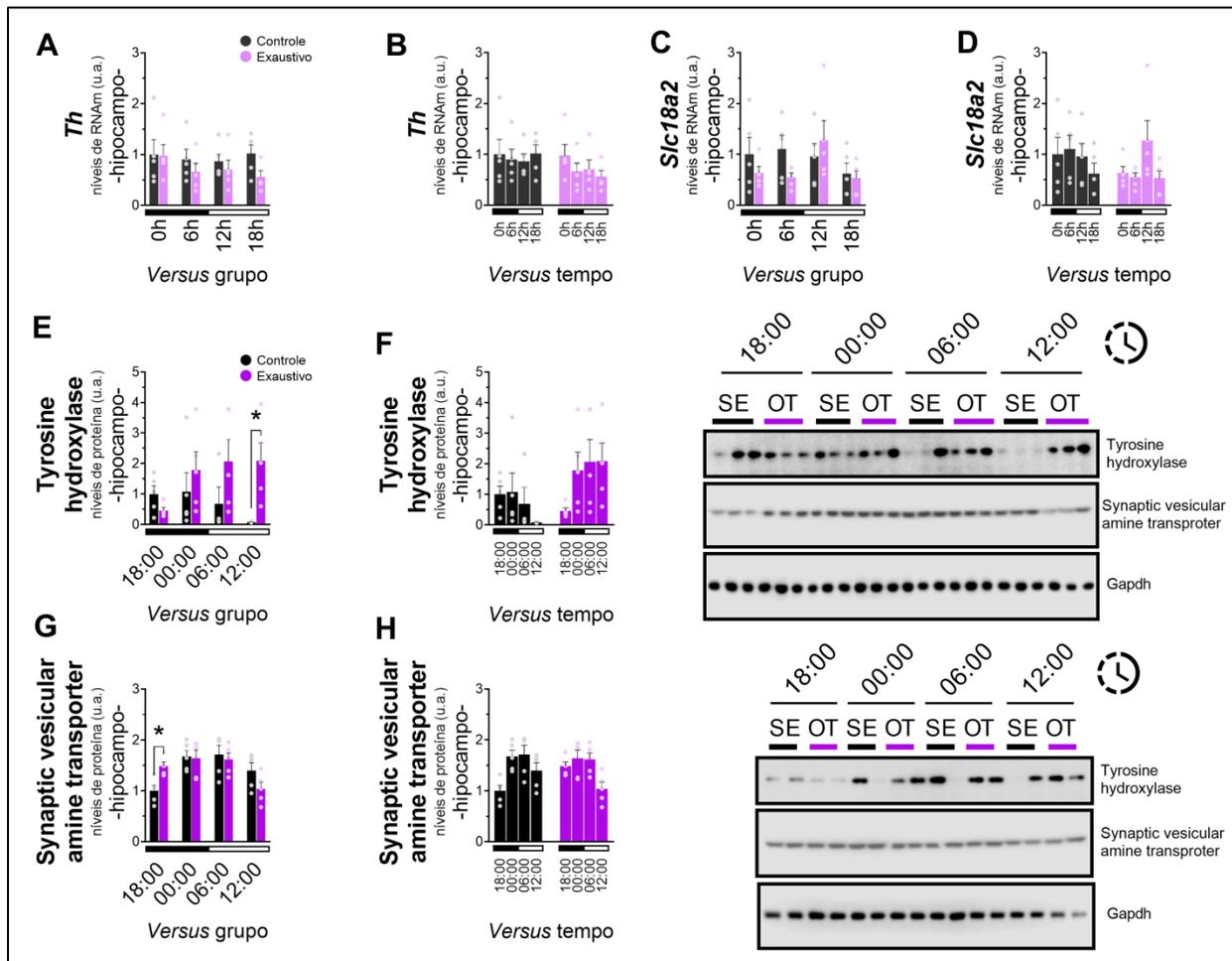


Figura 32. Média \pm erro padrão médio. Níveis de RNAm de (A e B) *Th* e (C e D) *Slc18a2* e, conteúdo proteico de (E e F) *Tyrosine hydroxylase* e (G e H) *Synaptic vesicular monoamine transporter* no hipocampo de animais sedentários e submetidos ao protocolo de *overtraining*. * $p < 0,05$; $n = 3-5$.

7. DISCUSSÃO

Os principais resultados encontrados foram: a) a Rev-erb- α apresentou redução de seu conteúdo proteico no gastrocnêmio por até 6 horas após a sessão de treino, independentemente do modelo de exercício físico realizado; b) Os diferentes modelos de exercício físico diminuíram o conteúdo de Rev-erb- α nuclear no gastrocnêmio imediatamente após a sessão de exercício físico; c) diferentes intensidades do mesmo modelo de exercício físico induziram diferentes repostas do gene que codifica a Rev-erb- α (*Nr1d1*), tanto no gastrocnêmio, quanto no hipocampo; d) o exercício físico exaustivo diminuiu: o conteúdo de Rev-erb- α , tanto no gastrocnêmio, quanto no hipocampo, porém em momentos diferentes; o conteúdo de Rev-erb- α nuclear e citosólico no gastrocnêmio imediatamente após a sessão de treino; a expressão e conteúdo da enzima *Tyrosine hydroxylase* no hipocampo; as concentrações de quinurenina (KYN) no gastrocnêmio; a expressão e conteúdo da enzima *Kynurenine aminotransferase I* no gastrocnêmio; a expressão gênica da enzima *Kynurenine 3-monooxygenase* e o conteúdo proteico da *Kynurenine aminotransferase I* no hipocampo; e) o exercício físico exaustivo aumentou: a expressão de *Nr1d1* no hipocampo após 18h da sessão de treino; o conteúdo de fosforilação da Rev-erb- α nas primeiras 6 horas após a sessão de treino, tanto no gastrocnêmio, quanto no hipocampo; as concentrações de dopamina no hipocampo; a biodisponibilidade de KYN no hipocampo imediatamente após a sessão de treino; a expressão da enzima *Kynurenine 3-monooxygenase* no gastrocnêmio; f) o tratamento com SR9009 induziu ao aumento: da KYN, tanto no gastrocnêmio, quanto no soro; nas concentrações de serotonina (5-HT) no hipocampo; na fosforilação da Rev-erb- α no gastrocnêmio; g) o tratamento com SR9009 diminuiu: a fosforilação da Rev-erb- α no hipocampo; o conteúdo da enzima *Kynurenine 3-monooxygenase* no hipocampo; h) o protocolo de *overtraining* aumentou: a expressão de *Nr1d1*, a fosforilação da Rev-erb- α e a expressão da *Kynurenine 3-monooxygenase* no gastrocnêmio; o conteúdo da enzima *Tyrosine hydroxylase* no hipocampo; i) o protocolo de *overtraining* diminuiu: a expressão de *Nr1d1* e a expressão das enzimas *Kynurenine aminotransferase* e *Kynurenine 3-monooxygenase* no hipocampo; o conteúdo da enzima *Kynurenine aminotransferase I* no gastrocnêmio.

O exercício físico é um potente fator que induz a diversas alterações no corpo humano (PEDERSEN; SALTIN, 2015). A literatura científica estabeleceu basicamente dois modelos tradicionais de exercício, *endurance* e força, que culminam em adaptações específicas (EGAN; ZIERATH, 2013). Essas adaptações são mediadas por vias de sinalização distintas que

normalmente acabam convergindo em proteínas centrais, como a Ampk (no caso do exercício de *endurance*) e a mTOR (no caso do exercício de força). O presente estudo aprofundou nas respostas da Rev-erb- α como possível molécula sensível a diferentes modelos de exercício físico, já que sua ativação/inibição via fármacos e manipulação genética demonstrou possuir influência nessas proteínas (MAYEUF-LOUCHARTE; THOREL; DELHAYE; BEAUCHAMP *et al.*, 2017; WOLDT; SEBTI; SOLT; DUHEM *et al.*, 2013) responsáveis pelas adaptações positivas do treinamento físico.

A Rev-erb- α é um repressor transcricional, portanto, atua reprimindo a expressão de certos genes através de mecanismos moleculares específicos. De modo simplificado, ela recruta as histonas deacetilases para a região do gene, a qual retira os grupos acetil da cromatina deixando a região mais condensada (EVERETT; LAZAR, 2014). Essa modificação epigenética diminui a disponibilidade das regiões promotoras do gene para fazer o processo de transcrição, diminuindo assim a formação de novas proteínas. Dessa forma, fica explícito que o local de atuação da Rev-erb- α é o núcleo, e saber a localização celular dela é de extrema importância para ajudar a desvendar as suas funções e respostas a diferentes estímulos.

Os modelos de exercício físico de *endurance* (END) e força (FOR) apresentaram uma atenuação similar na expressão gênica da Rev-erb- α durante o ciclo circadiano no músculo esquelético. Por outro lado, o modelo de exercício aeróbio intervalado (INT) apresentou maior expressão de *Nr1d1* durante o ciclo circadiano quando comparado com o modelo de exercício aeróbio contínuo (END) tanto no músculo esquelético, quanto no hipocampo. Esse comportamento sugere que, embora END e INT sejam modelos de exercício físico que buscam adaptações similares, eles apresentam respostas distintas. Vale salientar que ambos os modelos utilizados no presente estudo foram equiparados com a mesma carga de treino (3.600 u.a.) e mesmo volume (60 minutos), apresentando diferença somente na intensidade da corrida. Dessa forma, esses resultados sugerem que a resposta a nível transcricional da Rev-erb- α pode ser influenciada pela intensidade do exercício.

O exercício físico aeróbio intervalado surgiu como um novo método de treinamento para aumentar a capacidade aeróbia dos atletas, se mostrando tão eficiente quanto o treinamento aeróbio contínuo (END) (WESTON; WISLØFF; COOMBES, 2014). A vantagem desse modelo de exercício *versus* o modelo de *endurance* clássico seria o ganho de *performance* aeróbia com a necessidade de um menor tempo da sessão de treino (BURGOMASTER, 2008). Além disso,

Radak e colaboradores (RADAK; ISHIHARA; TEKUS; VARGA *et al.*, 2017) sugerem que o tempo de recuperação após uma sessão de treino intervalado é menor quando comparado com o exercício de *endurance* de longa duração. Já os mecanismos moleculares que levam as adaptações no músculo esquelético parecem ser similares em ambos os modelos de exercício, convergindo para a via de sinalização Ampk/Pgc1 α que culminam na biogênese mitocondrial (SCARPULLA; VEGA; KELLY, 2012). No entanto, o exercício INT acaba recrutando mais fibras de contração rápida (tipo II) devido a maior intensidade do exercício físico, sendo uma característica específica desse modelo de treinamento (TORMA; GOMBOS; JOKAI; TAKEDA *et al.*, 2019). No presente estudo, o músculo gastrocnêmio (composto por fibras mistas) do grupo INT apresentou uma resposta mais robusta da *Nr1d1* em relação ao sóleo (predominantemente de fibras oxidativas; tipo I), quando comparado ao grupo END. Esse dado reforça a ideia de que a intensidade do exercício e o tipo de fibra muscular é um fator importante nas respostas da *Nr1d1* ao exercício físico.

A Rev-erb- α é uma proteína que apresenta oscilação durante o ciclo circadiano (YANG; DOWNES; RUTH; BOOKOUT *et al.*, 2006). Essa oscilação é importante para o controle dos ritmos circadianos e do metabolismo em diversos tecidos, como o hipotálamo, fígado, tecido adiposo, músculo esquelético, entre outros (DUEZ; STAELS, 2009). A disfunção do ciclo circadiano pode aumentar a chance no desenvolvimento de obesidade, diabetes tipo 2, hiperlipidemia, aumento da pressão sanguínea e doenças cardiovasculares. Gabriel e Zierath (GABRIEL; ZIERATH, 2019) discutiram em seu estudo de revisão a importância do exercício físico como uma intervenção não farmacológica no tratamento de doenças metabólicas, destacando a necessidade na elucidação do *link* entre o exercício físico e oscilação da maquinaria responsável pelo ciclo circadiano (i.e., *clock genes*) nos tecidos metabólicos. De fato, o exercício físico é capaz de modular a amplitude e a fase do ritmo circadiano no músculo esquelético (SANER; BISHOP; BARTLETT, 2018), caracterizando um *re-set* dos *clock genes* (GABRIEL; ZIERATH, 2019). Interessantemente, foi demonstrado no presente estudo que o exercício físico (independente do modelo) foi capaz de diminuir o conteúdo da Rev-erb- α no músculo esquelético, abolindo sua oscilação característica durante as 18 horas seguintes ao término da sessão de treino. Além disso, esse fenômeno foi acompanhado da exclusão da Rev-erb- α do compartimento nuclear da célula imediatamente ao final do treino. Esses resultados reforçam a concepção do exercício físico como potente fator no *re-set* de um importante componente de controle do ciclo circadiano no músculo esquelético.

Os mecanismos moleculares pelo qual ocorre a redução do conteúdo da Rev-erb- α em resposta ao exercício físico no músculo esquelético são desconhecidos, já que essa é a primeira vez que foi demonstrada a dinâmica de resposta dessa proteína nessa situação. No entanto, já é bem descrito na literatura científica que as proteínas intracelulares, em situações estáveis, estão em constante *turnover*, sendo degradadas e resintetizadas para manutenção de um *pool* proteico funcional (LECKER; GOLDBERG; MITCH, 2006). Em todos os tecidos, a maior parte das proteínas intracelulares são degradadas pela via ubiquitina-proteassoma (UPP) (LECKER; GOLDBERG; MITCH, 2006). Resumidamente, a UPP consiste na ligação de cadeias do co-fator polipeptídico Ub (ubiquitina) nas proteínas, sinalizando-as para serem degradadas pelos proteassomas. Pariollaud e colaboradores (PARIOLLAUD; GIBBS; HOPWOOD; BROWN *et al.*, 2018) identificaram uma via de sinalização, unindo a inflamação e a degradação da Rev-erb- α pela UPP, constituindo um importante sistema regulatório na função desse receptor nuclear em células epiteliais pulmonares. De fato, a Rev-erb- α foi rapidamente degradada via UPP em resposta as interleucinas IL-1 β e TNF- α (PARIOLLAUD; GIBBS; HOPWOOD; BROWN *et al.*, 2018). Sabe-se que o exercício físico é capaz de produzir diversas citocinas, tanto pró quanto anti-inflamatórias, dependendo do modelo, intensidade e duração do estímulo (PEDERSEN, 2000). De acordo com os dados e as informações apresentadas, pode-se sugerir uma teoria de que a redução da Rev-erb- α no músculo esquelético pode acontecer pela via UPP induzida por citocinas pró-inflamatórias produzidas em resposta ao exercício físico.

A modulação do conteúdo de Rev-erb- α no núcleo pode caracterizar outro mecanismo de regulação dessa proteína, dado que ela é um repressor transcricional, e tem sua atuação descrita no núcleo (EVERETT; LAZAR, 2014). Dessa forma, a biodisponibilidade no compartimento nuclear pode sugerir com maior precisão a atividade da Rev-erb- α . Curiosamente, além da redução do conteúdo total de Rev-erb- α , os diferentes modelos de exercício físico reduziram o conteúdo dessa proteína no núcleo sem alterações no extrato citosólico. Essa resposta foi encontrada imediatamente ao final da sessão de treino, evidenciando que existe algum mecanismo para reduzir o conteúdo de Rev-erb- α exclusivamente no núcleo. A Rev-erb- α pode ser fosforilada nos resíduos serina 55 e 59 pela GSK-3 β , e essa modificação pós-traducional parece aumentar a estabilidade dessa proteína (DUEZ; STAELS, 2009). Possivelmente, a fosforilação da Rev-erb- α , além de aumentar sua estabilidade, também possa mudar sua localização celular, como acontece com alguns fatores de transcrição (VAN DER HEIDE; HOEKMAN; SMIDT, 2004) (CHRISTIAN;

SMITH; CARMODY, 2016). Essa migração da Rev-erb- α fosforilada do núcleo para o citosol pode aumentar a estabilidade e proteger a sua degradação pela via UPP, como proposto anteriormente. Dessa forma a Rev-erb- α localizada no núcleo pode ser mais suscetível a degradação quando comparada a Rev-erb- α citosólica. Futuros estudos devem investigar essa teoria e elucidar os mecanismos responsáveis por essa resposta.

A redução do conteúdo de Rev-erb- α nuclear aconteceu concomitantemente com o aumento na expressão do gene *Ulk1* no gastrocnêmio. A Ulk1 é uma proteína chave para o evento de iniciação no processo da autofagia (ZACHARI; GANLEY, 2017). Woldt e colaboradores (WOLDT; SEBTI; SOLT; DUHEM *et al.*, 2013) demonstraram que diversos genes autofágicos são alvos diretos da Rev-erb- α , ou seja, ela atua como um mecanismo de controle da maquinaria autofágica, suprimindo-a. Embora todos os modelos de exercício físico apresentaram aumento na expressão da *Ulk1* no gastrocnêmio imediatamente após a sessão de treino, somente o grupo com maior intensidade (INT) apresentou aumento significativo na expressão desse gene. Schwalm e colaboradores (SCHWALM; JAMART; BENOIT; NASLAIN *et al.*, 2015) demonstraram que a ativação da autofagia no músculo esquelético é dependente da intensidade do exercício físico. Esse dado reforça os resultados encontrados no presente estudo, sugerindo que as respostas autofágicas podem ser parcialmente influenciadas pela exclusão nuclear da Rev-erb- α e por sua maior sensibilidade a intensidade do exercício físico.

Além dos diferentes modelos, existem outras características que podem influenciar as adaptações adquiridas através do exercício físico. O exercício físico exaustivo, quando realizado de forma desestruturada e repetitiva, pode acarretar o desenvolvimento do estado de *overreaching* não-funcional (NFOR) e até a síndrome do *overtraining*, sendo ambos caracterizados pela queda inexplicável de *performance* física (MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY *et al.*, 2013). Diversas más adaptações já foram descritas na literatura científica em resposta a essas sessões de exercício exaustivas, como a resistência à insulina, inflamação e sinais de atrofia muscular, inflamação crônica de baixo grau, sinais de hipertrofia cardíaca patológica, entre outros (DA ROCHA; PINTO; KOHAMA; PAULI *et al.*, 2019). No entanto, o mecanismo chave pelo qual o estado de NFOR se desenvolve ainda é desconhecido. Em 2013 (WOLDT; SEBTI; SOLT; DUHEM *et al.*, 2013) foi demonstrado que quando camundongos são geneticamente modificados para silenciar a Rev-erb- α , eles apresentam queda de *performance* física. No entanto, quando camundongos selvagens são tratados com o agonista da Rev-erb- α (i.e., fármaco SR9009), eles apresentam

aumento de *performance* física. Esses dados colocam a Rev-erb- α como um promissor alvo de investigação para esse modelo de exercício físico exaustivo.

No presente estudo, os animais que foram submetidos a uma sessão de exercício físico exaustiva não apresentaram nenhuma alteração a nível transcricional da Rev-erb- α no músculo esquelético durante o ciclo circadiano. No entanto, o exercício físico exaustivo aumentou a expressão da *Nr1d1* no hipocampo 18 horas após a sessão de treino. Esse padrão de resposta, tanto no músculo esquelético, quanto no hipocampo é similar ao encontrado no grupo INT. Interessantemente, esses dois modelos de exercício físico foram os únicos a apresentar redução significativa da glicemia no soro após a sessão de treino, o que caracteriza uma maior demanda energética e sinal de fadiga (KEYSER, 2010). Esses dados corroboram com a noção de que, a nível transcricional, a Rev-erb- α é sensível a intensidade do exercício físico, tanto no tecido muscular (periférico), quanto no tecido cerebral (sistema nervoso central).

No tecido muscular, o exercício exaustivo reduziu o conteúdo de Rev-erb- α no gastrocnêmio e extinguiu o seu padrão de oscilação circadiana, se mantendo constante pelas 18 horas seguintes a sessão de treino. Surpreendentemente, tanto o conteúdo nuclear, quanto o citoplasmático da Rev-erb- α foi reduzido no músculo esquelético. Essa resposta pode ser explicada pela característica específica desse modelo de exercício, que é baseado na corrida com predominância de contrações excêntricas (corrida em declive). Reid (REID, 2005) demonstrou em seu artigo de revisão que o exercício físico é capaz de ativar a via UPP no músculo esquelético, sendo que os exercícios baseados em contrações excêntricas são os que apresentam as modulações mais robustas. De forma resumida, a via da UPP responde ao exercício de forma bifásica e dependente do tempo. A fase inicial de estimulação acontece após segundos/minutos do início do exercício físico. Já o aumento tardio dessa via acontece após algumas horas e pode atingir seu pico entre 6-24 horas. Essa resposta tardia é ativada no sentido de remodelar o músculo esquelético, regulando a degradação de proteínas no processo de adaptação ao exercício físico (REID, 2005). Dessa forma, esses dados complementam a teoria da degradação da Rev-erb- α via UPP induzida pelo exercício físico citada anteriormente. No caso do exercício exaustivo, essa resposta seria mais expressiva, apresentando redução tanto no núcleo, quanto no citosol, devido a característica específica da predominância de contrações excêntricas e extrema demanda energética.

O conteúdo da Rev-erb- α fosforilada apresentou um comportamento inverso ao da Rev-erb- α total durante o ciclo circadiano no músculo esquelético em situações basais/estáveis. É a

primeira vez que essa dinâmica é apresentada, a qual pode ajudar a elucidar os mecanismos de regulação dessa proteína. Como já citado anteriormente, a fosforilação nos resíduos serina 55/59 pela GSK3 β parece aumentar a sua estabilidade (YIN, 2004). A Rev-erb- α participa de um grupo de proteínas (Clock, Bmal1, ROR, Per, Cry) que se autorregulam através de alças de *feedback* negativo a nível transcricional. Essas oscilações entre estímulo/inibição transcricional provocam as alterações nas concentrações totais dessas proteínas que se repetem a cada 24 horas (SOLT; KOJETIN; BURRIS, 2011). Já a modificação pós-traducional de fosforilação da Rev-erb- α no músculo esquelético, parece funcionar como um mecanismo de sensor de sua biodisponibilidade. Tanto durante o ciclo circadiano no grupo controle, quanto nas respostas agudas ao exercício físico exaustivo, essa relação entre proteína total e fosforilada parece ser inversamente proporcional. Dessa forma, a razão entre a Rev-erb- α fosforilada e a Rev-erb- α total pode ser uma estratégia para indicar sua disponibilidade e/ou atividade. No entanto, futuros estudos são necessários para elucidar essa relação e investigar essa teoria.

Os animais submetidos ao protocolo de exercício exaustivo apresentaram um aumento de aproximadamente 5x na fosforilação da Rev-erb- α imediatamente após a sessão de treino no hipocampo. Porém, essa alteração não foi acompanhada da redução da Rev-erb- α total. Essa divergência entre o hipocampo e o tecido muscular pode se dar pela característica dos estímulos estressores do exercício físico. O músculo esquelético, além de receber estímulo de diversos metabólitos e condições (citocinas, hormônios, pH, hipóxia) (MORTON; KAYANI; MCARDLE; DRUST, 2009), também sofre o estresse mecânico da contração muscular que pode levar a dano tecidual (especialmente no exercício excêntrico) e desencadear respostas específicas desse local, como a ativação da degradação proteica pela via UPP (MURTON; CONSTANTIN; GREENHAFF, 2008). Já o cérebro é protegido pela barreira hematoencefálica, a qual regula a passagem de substâncias e metabólitos que possam ser nocivos, tornando o ambiente do sistema nervoso central (SNC) mais estável (MAŁKIEWICZ; SZARMACH; SABISZ; CUBAŁA *et al.*, 2019). No entanto, a razão entre a Rev-erb- α fosforilada e a Rev-erb- α total em ambos os tecidos (músculo esquelético e hipocampo) apresentam repostas similares em magnitude e *time-course*. Como proposto anteriormente no presente estudo, essa razão pode indicar além da biodisponibilidade, a sua atividade. Vale salientar, que essa fosforilação pode provocar mudança de sua localização subcelular, porém mais estudos devem ser realizados para verificar essa teoria. Em relação a essa razão, os dois tecidos apresentaram resultados semelhantes, porém, via

mecanismos diferentes. No músculo esquelético houve a redução da Rev-erb- α total e, no hipocampo, houve aumento da fosforilação dessa proteína.

No hipocampo a Rev-erb- α atua como repressor da principal enzima limitante na produção de dopamina, a *Tyrosine hydroxylase* (TH)(JAGER; O'BRIEN; MANLOVE; KRIZMAN *et al.*, 2014). Além dessa função, Schenell e colaboradores (SCHNELL; CHAPPUIS; SCHMUTZ; BRAI *et al.*, 2014) verificaram que a Rev-erb- α também atua como importante regulador da neurogênese no hipocampo, região do cérebro responsável pela aprendizagem e memória. Em ambos os estudos foram utilizados camundongos *knockout* para a proteína Rev-erb- α . Esses camundongos geneticamente modificados apresentaram distúrbios comportamentais como hiperatividade e prejuízo na formação de memória de curto e longo prazo (JAGER; O'BRIEN; MANLOVE; KRIZMAN *et al.*, 2014). Interessantemente, o exercício físico exaustivo é capaz de prejudicar o desempenho cognitivo, demonstrado através da redução da capacidade de memória em camundongos (ROSA; TAKAHASHI; ABOULAFIA; NOUAILHETAS *et al.*, 2007).

A liberação de dopamina na região do hipocampo promove a atenção, formação de memória, aprendizado e plasticidade sináptica (KAHNT; TOBLER, 2017). A área tegmental ventral (VTA) é classicamente um dos principais centros dopaminérgicos responsáveis pela produção e liberação de dopamina em diversas regiões do cérebro. Em 2016, Kempadoo e colaboradores (KEMPADOO; MOSHAROV; CHOI; SULZER *et al.*, 2016) demonstraram que os neurônios que se originam do *locus coeruleus* também possuem papel importante na liberação desse neurotransmissor no hipocampo. De forma geral, o hipocampo recebe projeções desses neurônios originários de regiões produtoras que estimulam o seu circuito dopaminérgico. Especificamente, a TH é compartimentalizada nos axônios e terminais neurais que produzem e liberam a dopamina (MELIA; TREMBLEAU; ODDI; SANNA *et al.*, 1994). No presente estudo, o exercício exaustivo atenuou a TH, tanto a nível transcricional, quanto no conteúdo total de proteína no hipocampo imediatamente após a sessão de treino. Além disso, os camundongos apresentaram aumento de aproximadamente 2x do conteúdo de dopamina no hipocampo. Essa redução da TH pode ser uma resposta de *feedback* negativo ao aumento da dopamina verificado.

Para chegar ao final da sessão de treino exaustiva, os camundongos demonstraram sinais de fadiga e foram incapazes de continuar correndo na velocidade pré-estabelecida. Meeusen e colaboradores (MEEUSEN; WATSON; HASEGAWA; ROELANDS *et al.*, 2006) sugerem que em exercícios físicos extenuantes e de longa duração o desequilíbrio entre os neurotransmissores

pode ser a causa para o desenvolvimento da fadiga cognitiva. Mais especificamente o aumento na razão serotonina/dopamina poderia levar aos sentimentos de cansaço e letargia, impossibilitando a sustentação do exercício físico. No presente estudo foi encontrada uma tendência para a diminuição dessa razão serotonina/dopamina no hipocampo, contrariando o mecanismo proposto por Meeusen e colaboradores (MEEUSEN; WATSON; HASEGAWA; ROELANDS *et al.*, 2006). No entanto, futuros estudos devem avaliar as concentrações desses neurotransmissores em diferentes áreas do cérebro após uma sessão de exercício físico exaustivo para elucidar essa relação. Além disso, outros mecanismos além desses neurotransmissores podem corroborar para o desenvolvimento da fadiga do SNC, como a via da quinurenina (ÅKESSON; PETTERSSON; STÅHL; SUROWIEC *et al.*, 2018).

A via da quinurenina (KYN) possui metabólitos intermediários que exercem característica neuro-tóxicas, como morte neuronal e neuro-inflamação (MYINT; KIM, 2014; SCHWARCZ; BRUNO; MUCHOWSKI; WU, 2012). Esses metabólitos podem ser estimulados através de estresse e inflamação (GIBNEY; MCGUINNESS; PRENDERGAST; HARKIN *et al.*, 2013; LIU; SHENG; XU; LIU *et al.*, 2013). Sabe-se que o exercício físico exaustivo é extremamente estressante para o metabolismo e está ligado com um perfil inflamatório (DA ROCHA; PINTO; KOHAMA; PAULI *et al.*, 2019). No presente estudo foi verificado que o exercício exaustivo induziu ao aumento da biodisponibilidade de KYN no hipocampo em relação ao triptofano (aminoácido precursor para síntese de serotonina e da própria KYN), e diminuiu as concentrações de KYN no músculo esquelético imediatamente após a sessão de treino. Interessantemente, o exercício físico exaustivo suprimiu a proteína *Kynurenine aminotransferase I* (Kat1), tanto no músculo esquelético, quanto no hipocampo. As Kats são enzimas responsáveis por converter a KYN em ácido quinurênico (KYNA), que possui característica neuro-protetora por ser incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica (FUKUI; SCHWARCZ; RAPOPORT; TAKADA *et al.*, 1991), sendo assim metabolizado e posteriormente eliminado pelo organismo (FUKUI; SCHWARCZ; RAPOPORT; TAKADA *et al.*, 1991). Especificamente no hipocampo, esse aumento da biodisponibilidade de KYN pode explicar a supressão na expressão da *Kmo* (responsável por codificar a enzima *Kynurenine 3-monooxygenase* [Kmo] que converte a KYN em 3-hidroxiquinurenina [3-HK], outro metabólito nocivo ao cérebro) como mecanismo de proteção.

O exercício físico regular possui uma estreita relação com a metabolização da KYN no músculo esquelético e proteção neural. Agudelo e colaboradores (AGUDELO; FEMENÍA; ORHAN; PORSMYR-PALMERTZ *et al.*, 2014) demonstraram que o exercício físico regular é capaz de aumentar a expressão das Kats no músculo esquelético, via *Pgc1 α* . Além disso, a superexpressão de *Pgc1 α* no músculo esquelético foi capaz de aumentar o conteúdo das Kats no próprio músculo e prevenir o desenvolvimento de desordens neurológicas induzidas por tratamento de KYN. Dessa forma, a supressão do gene e do conteúdo proteico de *Kat1* no músculo esquelético induzido pelo exercício exaustivo, somado ao aumento na expressão do gene *Kmo*, caracteriza uma mudança no perfil do músculo esquelético para produção de metabólitos neuro-tóxicos pela via da KYN.

De acordo com os resultados encontrados até o momento, foi possível verificar que a *Rev-erb- α* e a via da KYN sofreram forte influência do exercício físico exaustivo, tanto no músculo esquelético, quanto no hipocampo. Além disso, o conteúdo proteico de *Rev-erb- α* apresentou fortes correlações com moléculas importantes da via da KYN (a nível proteico e transcricional) em situações basais, sugerindo uma inédita relação entre essas duas vias moleculares. De fato, o tratamento com SR9009 (agonista da *Rev-erb- α*) foi capaz induzir o aumento de KYN tanto no músculo esquelético, quanto no soro. Além disso, o tratamento com SR9009 aumentou a expressão do gene que codifica a *Kat1* tanto no músculo esquelético, quanto no hipocampo. Especificamente no hipocampo, o grupo tratado reduziu o conteúdo da enzima *Kynurenine 3-monooxygenase*.

Parrott e colaboradores (PARROTT; REDUS; SANTANA-COELHO; MORALES *et al.*, 2016) demonstraram que *Kynurenine 3-monooxygenase* (KMO) é uma enzima central no metabolismo da KYN no hipocampo. De forma resumida, os autores utilizaram animais selvagens no tratamento com LPS para indução de inflamação e desenvolvimento de comportamento depressivo. A via da KYN foi particularmente ativada no hipocampo e, surpreendentemente, os animais KO para a enzima KMO apresentaram proteção contra o estímulo de LPS, prevenindo o desenvolvimento de comportamento depressivo. De fato, a via da KYN tem chamado cada vez mais a atenção da comunidade científica como possível mecanismo na etiologia/associado a distúrbios neurológicos como doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington (BRAIDY; GRANT, 2017). No presente estudo, o tratamento com SR9009 promoveu redução de uma importante enzima (KMO) do braço da via da KYN responsável por produzir moléculas neuro-tóxicas no hipocampo. Esse dado reforça a hipótese de interação da *Rev-erb- α* com a via da KYN e, sugere

essa relação como possível alvo terapêutico farmacológico/não-farmacológico de regulação dessa via no hipocampo. Surpreendentemente, o tratamento aumentou as concentrações de serotonina no hipocampo. Essa é a primeira vez que essa relação entre estímulo da Rev-erb- α e aumento de serotonina no hipocampo é apresentada.

Como citado anteriormente, o exercício físico exaustivo quando feito de forma crônica pode induzir ao estado de NFOR. Nesse caso, foi verificado no presente estudo que o protocolo de *overtraining* foi capaz de modular a Rev-erb- α a nível transcricional e também o seu conteúdo proteico durante o ciclo circadiano. O músculo esquelético e o hipocampo apresentaram respostas particulares. No músculo esquelético, o menor conteúdo de Rev-erb- α pode sugerir uma má-adaptação ao protocolo de *overtraining*. Woldt e colaboradores (WOLDT; SEBTI; SOLT; DUHEM *et al.*, 2013) mostraram que o treinamento moderado por quatro semanas foi capaz de aumentar o desempenho físico concomitantemente com o conteúdo de Rev-erb- α no gastrocnêmio, e a deleção genética da Rev-erb- α provocou efeito contrário. Já no hipocampo, a Rev-erb- α apresentou atenuação da magnitude da oscilação circadiana a nível transcricional e, a nível proteico, apresentou aumento no período de inatividade dos camundongos. Essa desregulação do ciclo circadiano da Rev-erb- α pode indicar uma possível perturbação dos ritmos circadianos fisiológicos, a qual pode estar associada ao desenvolvimento de doenças metabólicas (GABRIEL; ZIERATH, 2019) e prejuízo no desempenho físico.

Apesar de não apresentar alterações nas concentrações de triptofano, KYN e KYNA no soro, o protocolo de *overtraining* induziu alterações similares às encontradas nas enzimas da via da KYN após uma sessão de exercício físico exaustivo. No músculo gastrocnêmio, a supressão da *Kat1* tanto a nível transcricional, quanto no conteúdo proteico, representa uma redução na capacidade de proteção neural em situações onde a via da KYN possa ser ativada, como estresse e inflamação (GIBNEY; MCGUINNESS; PRENDERGAST; HARKIN *et al.*, 2013; LIU; SHENG; XU; LIU *et al.*, 2013). Essa adaptação caracteriza um perfil inverso aos benefícios almejados pelo exercício físico moderado e regular (AGUDELO; FEMENÍA; ORHAN; PORSMYR-PALMERTZ *et al.*, 2014). O aumento na expressão da *Kmo* reforça essa má-adaptação, tornando o músculo esquelético mais preparado para metabolizar a KYN pela ramificação da via com outros metabólitos neuro-tóxicos.

No hipocampo, a via da KYN apresentou uma supressão dos genes responsáveis por codificar as enzimas que participam na metabolização dessa substância. A desregulação dessa via,

ligada à inflamação, pode acarretar o desenvolvimento de má-adaptações no SNC, como o surgimento de depressão (DANTZER; O'CONNOR; LAWSON; KELLEY, 2011). Recentemente, a via da KYN tem sido evidenciada como alvo promissor no desenvolvimento e, conseqüentemente no tratamento, da fisiopatologia da depressão maior (BROWN; HUANG; NEWELL, 2021). Os sintomas relacionados ao desenvolvimento da síndrome do *overtraining* nos atletas apresentam grande variação (MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY *et al.*, 2013), porém algumas como sensações de apatia, cansaço e distúrbios no sono são similares ao da depressão (DANTZER; O'CONNOR; LAWSON; KELLEY, 2011). Vale salientar que a ocorrência desse distúrbio psicológico é maior na população de atletas. Por exemplo, Frank e colaboradores (FRANK; NIXDORF; BECKMANN; KRAMER *et al.*, 2013) verificaram que 68% dos atletas de elite (nível olímpico) já apresentaram um episódio de depressão. Dessa forma, a via da KYN se mostra como um alvo promissor para investigações mais profundas na elucidação dos malefícios induzidos no SNC por sessões crônicas de exercício exaustivo.

Interessantemente, o presente estudo evidenciou que o protocolo de *overtraining* foi capaz de aumentar o conteúdo de TH, principal enzima limitante na síntese de dopamina, no período de inatividade dos animais. Essa alteração foi encontrada no mesmo horário em que a dopamina apresentou tendência em estar elevada no hipocampo. A dopamina possui um papel importante no momento de vigília, estimulando a motivação, memória e atenção (MEEUSEN; WATSON; HASEGAWA; ROELANDS *et al.*, 2006). No entanto, os níveis mais elevados no período de inatividade podem sugerir uma desregulação no sono e repouso. De fato, Jager e colaboradores (JAGER; O'BRIEN; MANLOVE; KRIZMAN *et al.*, 2014) verificaram que os animais *knockout* para Rev-erb- α apresentaram altos níveis de TH no hipocampo e, como consequência, apresentaram hiperatividade e desregulação do ciclo circadiano entre os momentos de atividade e inatividade. Esses dados reforçam que as sessões crônicas de exercício exaustivo podem também induzir má-adaptações no SNC que provavelmente corroboraram para a instalação do estado de NFOR e/ou síndrome do *overtraining*.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou que a Rev-erb- α é uma molécula extremamente sensível ao estímulo de exercício físico, inclusive a diferentes modelos, intensidades e volumes, tanto no músculo esquelético, quanto no hipocampo. Essas respostas são similares em ambos os tecidos, mas sugerem diferentes mecanismos para tal. Além disso, essa molécula apresentou adaptações em respostas ao treinamento com sessões exaustivas, sugerindo que possa participar no desenvolvimento do estado de NFOR. No entanto, as respostas dos neurotransmissores no hipocampo não corroboraram com a teoria do aumento da razão serotonina/dopamina para explicar a fadiga cognitiva. A via da KYN também foi sensível à sessão de exercício físico exaustiva, apresentando alterações para um perfil de produção de metabólitos neuro-tóxicos no gastrocnêmio. Além disso, foi evidenciada uma relação inédita entre a Rev-erb- α e a via da KYN. De forma geral, a Rev-erb- α se apresenta como uma molécula importante e com várias atuações nas adaptações moleculares aos diferentes modelos de exercício físico.

REFERÊNCIAS

- AGUDELO, L. Z.; FEMENÍA, T.; ORHAN, F.; PORSMYR-PALMERTZ, M. *et al.* Skeletal muscle PGC-1 α 1 modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. **Cell**, 159, n. 1, p. 33-45, 2014.
- ARMSTRONG, L. E.; VANHEEST, J. L. The unknown mechanism of the overtraining syndrome - Clues from depression and psychoneuroimmunology. **Sports Medicine**, 32, n. 3, p. 185-209, 2002 2002.
- BADAWY, A. A. Tryptophan availability for kynurenine pathway metabolism across the life span: control mechanisms and focus on aging, exercise, diet and nutritional supplements. **Neuropharmacology**, 112, p. 248-263, 2017.
- BRAIDY, N.; GRANT, R. Kynurenine pathway metabolism and neuroinflammatory disease. **Neural regeneration research**, 12, n. 1, p. 39, 2017.
- BROWN, S. J.; HUANG, X.-F.; NEWELL, K. A. The kynurenine pathway in major depression: what we know and where to next. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 127, p. 917-927, 2021.
- BURGOMASTER, K. Howarth KR, Phillips SM, Rakobowchuk M, Macdonald MJ, McGee SL, Gibala MJ. **Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. J Physiol**, 586, p. 151-160, 2008.
- CHO, H.; ZHAO, X.; HATORI, M.; RUTH, T. Y. *et al.* Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB-[agr] and REV-ERB-[bgr]. **Nature**, 485, n. 7396, p. 123-127, 2012.
- CHRISTIAN, F.; SMITH, E. L.; CARMODY, R. J. The regulation of NF- κ B subunits by phosphorylation. **Cells**, 5, n. 1, p. 12, 2016.
- DA ROCHA, A. L.; PEREIRA, B. C.; PAULI, J. R.; DE SOUZA, C. T. *et al.* Downhill Running Excessive Training Inhibits Hypertrophy in Mice Skeletal Muscles with Different Fiber Type Composition. **Journal of cellular physiology**, 231, n. 5, p. 1045-1056, 2016.
- DA ROCHA, A. L.; PINTO, A. P.; KOHAMA, E. B.; PAULI, J. R. *et al.* The proinflammatory effects of chronic excessive exercise. **Cytokine**, 119, p. 57-61, 2019.
- DA ROCHA, A. L.; PINTO, A. P.; TEIXEIRA, G. R.; PEREIRA, B. C. *et al.* Exhaustive training leads to hepatic fat accumulation. **Journal of Cellular Physiology**, 2017.
- DA ROCHA, A. L.; TEIXEIRA, G. R.; PINTO, A. P.; DE MORAIS, G. P. *et al.* Excessive training induces molecular signs of pathologic cardiac hypertrophy. 2018.

- DANTZER, R.; O'CONNOR, J. C.; LAWSON, M. A.; KELLEY, K. W. Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine. **Psychoneuroendocrinology**, 36, n. 3, p. 426-436, 2011.
- DAVIS, J. M.; BAILEY, S. P. Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. **Medicine and science in sports and exercise**, 29, n. 1, p. 45-57, 1997.
- DIMAURO, I.; PEARSON, T.; CAPOROSSI, D.; JACKSON, M. J. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. **BMC research notes**, 5, n. 1, p. 1-5, 2012.
- DUEZ, H.; STAELS, B. Rev-erb- α : an integrator of circadian rhythms and metabolism. **Journal of applied physiology**, 107, n. 6, p. 1972-1980, 2009.
- EGAN, B.; HAWLEY, J. A.; ZIERATH, J. R. SnapShot: exercise metabolism. **Cell metabolism**, 24, n. 2, p. 342-342. e341, 2016.
- EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell metabolism**, 17, n. 2, p. 162-184, 2013.
- EVERETT, L. J.; LAZAR, M. A. Nuclear receptor Rev-erba: up, down, and all around. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 25, n. 11, p. 586-592, 2014.
- FRANK, R.; NIXDORF, I.; BECKMANN, J.; KRAMER, U. *et al.* Depression among elite athletes: prevalence and psychological factors. **Deut Z Sportmed**, 64, p. 320-326, 2013.
- FUKUI, S.; SCHWARCZ, R.; RAPOPORT, S. I.; TAKADA, Y. *et al.* Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. **Journal of neurochemistry**, 56, n. 6, p. 2007-2017, 1991.
- GABRIEL, B. M.; ZIERATH, J. R. Circadian rhythms and exercise—re-setting the clock in metabolic disease. **Nature Reviews Endocrinology**, p. 1, 2019.
- GIBNEY, S. M.; MCGUINNESS, B.; PRENDERGAST, C.; HARKIN, A. *et al.* Poly I: C-induced activation of the immune response is accompanied by depression and anxiety-like behaviours, kynurenine pathway activation and reduced BDNF expression. **Brain, behavior, and immunity**, 28, p. 170-181, 2013.
- HAN, Q.; CAI, T.; TAGLE, D. A.; LI, J. Thermal stability, pH dependence and inhibition of four murine kynurenine aminotransferases. **BMC biochemistry**, 11, n. 1, p. 19, 2010.
- HAWLEY, J. A.; KROOK, A. Metabolism: One step forward for exercise. **Nature Reviews Endocrinology**, 2015.
- HE, C.; BASSIK, M. C.; MORESI, V.; SUN, K. *et al.* Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. **Nature**, 481, n. 7382, p. 511-515, 2012.

HE, C.; SUMPTER, J., RHEA; LEVINE, B. Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. **Autophagy**, 8, n. 10, p. 1548-1551, 2012.

JAGER, J.; O'BRIEN, W. T.; MANLOVE, J.; KRIZMAN, E. N. *et al.* Behavioral changes and dopaminergic dysregulation in mice lacking the nuclear receptor Rev-erba. **Molecular endocrinology**, 28, n. 4, p. 490-498, 2014.

JØRGENSEN, S. B.; RICHTER, E. A.; WOJTASZEWSKI, J. F. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. **The Journal of physiology**, 574, n. 1, p. 17-31, 2006.

KAHNT, T.; TOBLER, P. N. Dopamine modulates the functional organization of the orbitofrontal cortex. **Journal of Neuroscience**, 37, n. 6, p. 1493-1504, 2017.

KEMPADOO, K. A.; MOSHAROV, E. V.; CHOI, S. J.; SULZER, D. *et al.* Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 113, n. 51, p. 14835-14840, 2016.

KEYSER, R. E. Peripheral fatigue: high-energy phosphates and hydrogen ions. **Pm&r**, 2, n. 5, p. 347-358, 2010.

LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L.; MITCH, W. E. Protein degradation by the ubiquitin–proteasome pathway in normal and disease states. **Journal of the American society of nephrology**, 17, n. 7, p. 1807-1819, 2006.

LIU, W.; SHENG, H.; XU, Y.; LIU, Y. *et al.* Swimming exercise ameliorates depression-like behavior in chronically stressed rats: relevant to proinflammatory cytokines and IDO activation. **Behavioural brain research**, 242, p. 110-116, 2013.

LUM, J. J.; BAUER, D. E.; KONG, M.; HARRIS, M. H. *et al.* Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. **Cell**, 120, n. 2, p. 237-248, 2005.

MAYEUF-LOUCHART, A.; THOREL, Q.; DELHAYE, S.; BEAUCHAMP, J. *et al.* Rev-erb- α regulates atrophy-related genes to control skeletal muscle mass. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 14383, 2017.

MAŁKIEWICZ, M. A.; SZARMACH, A.; SABISZ, A.; CUBAŁA, W. J. *et al.* Blood-brain barrier permeability and physical exercise. **Journal of neuroinflammation**, 16, n. 1, p. 1-16, 2019.

MEEUSEN, R.; DUCLOS, M.; FOSTER, C.; FRY, A. *et al.* Prevention, diagnosis and treatment of the overtraining syndrome: Joint consensus statement of the European College of Sport Science (ECSS) and the American College of Sports Medicine (ACSM). **European Journal of Sport Science**, 13, n. 1, p. 1-24, Jan 1 2013.

- MEEUSEN, R.; PIACENTINI, M. F. Exercise, fatigue, neurotransmission and the influence of the neuroendocrine axis. *In: Developments in Tryptophan and Serotonin Metabolism*: Springer, 2003. p. 521-525.
- MEEUSEN, R.; WATSON, P.; HASEGAWA, H.; ROELANDS, B. *et al.* Central fatigue. **Sports Medicine**, 36, n. 10, p. 881-909, 2006.
- MELIA, K. R.; TREMBLEAU, A.; ODDI, R.; SANNA, P. P. *et al.* Detection and regulation of tyrosine hydroxylase mRNA in catecholaminergic terminal fields: possible axonal compartmentalization. **Experimental neurology**, 130, n. 2, p. 394-406, 1994.
- MORSELLI, E.; MAIURI, M.; MARKAKI, M.; MEGALOU, E. *et al.* Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. **Cell death & disease**, 1, n. 1, p. e10, 2010.
- MORTON, J. P.; KAYANI, A. C.; MCARDLE, A.; DRUST, B. The exercise-induced stress response of skeletal muscle, with specific emphasis on humans. **Sports medicine**, 39, n. 8, p. 643-662, 2009.
- MURTON, A.; CONSTANTIN, D.; GREENHAFF, P. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, 1782, n. 12, p. 730-743, 2008.
- MYINT, A.-M.; KIM, Y.-K. Network beyond IDO in psychiatric disorders: revisiting neurodegeneration hypothesis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 48, p. 304-313, 2014.
- MÜLLER, N.; SCHWARZ, M. The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. Nature Publishing Group 2007.
- NEWSHOLME, E.; ACWORTH, I.; BLOMSTRAND, E. Amino acids, brain neurotransmitters and a functional link between muscle and brain that is important in sustained exercise. **Advances in myochemistry**, 1, p. 127-133, 1987.
- NYBO, L.; SECHER, N. H. Cerebral perturbations provoked by prolonged exercise. **Progress in neurobiology**, 72, n. 4, p. 223-261, 2004.
- PARIOLLAUD, M.; GIBBS, J. E.; HOPWOOD, T. W.; BROWN, S. *et al.* Circadian clock component REV-ERB α controls homeostatic regulation of pulmonary inflammation. **The Journal of clinical investigation**, 128, n. 6, p. 2281-2296, 2018.
- PARROTT, J.; REDUS, L.; SANTANA-COELHO, D.; MORALES, J. *et al.* Neurotoxic kynurenine metabolism is increased in the dorsal hippocampus and drives distinct depressive behaviors during inflammation. **Translational psychiatry**, 6, n. 10, p. e918-e918, 2016.

PEDERSEN, B. K. Exercise and cytokines. **Immunology and cell biology**, 78, n. 5, p. 532-535, 2000.

PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Exercise as medicine—evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, 25, n. S3, p. 1-72, 2015.

PEREIRA, B.; LUCAS, G.; DA ROCHA, A.; PAULI, J. *et al.* Eccentric exercise leads to glial activation but not apoptosis in mice spinal cords. **International journal of sports medicine**, 36, n. 05, p. 378-385, 2015.

PEREIRA, B. C.; DA ROCHA, A. L.; PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R. *et al.* Excessive eccentric exercise leads to transitory hypothalamic inflammation, which may contribute to the low body weight gain and food intake in overtrained mice. **Neuroscience**, 311, p. 231-242, Dec 2015.

PEREIRA, B. C.; DA ROCHA, A. L.; PINTO, A. P.; PAULI, J. R. *et al.* Excessive eccentric exercise-induced overtraining model leads to endoplasmic reticulum stress in mice skeletal muscles. **Life sciences**, 145, p. 144-151, 2016.

PEREIRA, B. C.; DA ROCHA, A. L.; PINTO, A. P.; PAULI, J. R. *et al.* Excessive training impairs the insulin signal transduction in mice skeletal muscles. **Journal of Endocrinology**, p. JOE-16-0063, 2016.

PINTO, A. P.; DA ROCHA, A. L.; PEREIRA, B. C.; OLIVEIRA, L. D. C. *et al.* Excessive training is associated with endoplasmic reticulum stress but not apoptosis in the hypothalamus of mice. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, 42, n. 4, p. 354-360, APR 2017 2017.

RADAK, Z.; ISHIHARA, K.; TEKUS, E.; VARGA, C. *et al.* Exercise, oxidants, and antioxidants change the shape of the bell-shaped hormesis curve. **Redox biology**, 12, p. 285-290, 2017.

REID, M. B. Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 288, n. 6, p. R1423-R1431, 2005.

REYNOLDS, N.; O'SHAUGHNESSY, A.; HENDRICH, B. Transcriptional repressors: multifaceted regulators of gene expression. **Development**, 140, n. 3, p. 505-512, 2013.

ROSA, E. F.; TAKAHASHI, S.; ABOULAFIA, J.; NOUAILHETAS, V. L. *et al.* Oxidative stress induced by intense and exhaustive exercise impairs murine cognitive function. **Journal of neurophysiology**, 98, n. 3, p. 1820-1826, 2007.

RUBINSZTEIN, D. C.; MARIÑO, G.; KROEMER, G. Autophagy and aging. **Cell**, 146, n. 5, p. 682-695, 2011.

SANER, N. J.; BISHOP, D. J.; BARTLETT, J. D. Is exercise a viable therapeutic intervention to mitigate mitochondrial dysfunction and insulin resistance induced by sleep loss? **Sleep medicine reviews**, 37, p. 60-68, 2018.

SCARPULLA, R. C.; VEGA, R. B.; KELLY, D. P. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 23, n. 9, p. 459-466, 2012.

SCHNELL, A.; CHAPPUIS, S.; SCHMUTZ, I.; BRAI, E. *et al.* The nuclear receptor REV-ERB α regulates Fabp7 and modulates adult hippocampal neurogenesis. **PloS one**, 9, n. 6, p. e99883, 2014.

SCHWALM, C.; JAMART, C.; BENOIT, N.; NASLAIN, D. *et al.* Activation of autophagy in human skeletal muscle is dependent on exercise intensity and AMPK activation. **The FASEB Journal**, 29, n. 8, p. 3515-3526, 2015.

SCHWARCZ, R.; BRUNO, J. P.; MUCHOWSKI, P. J.; WU, H.-Q. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. **Nature Reviews Neuroscience**, 13, n. 7, p. 465-477, 2012.

SOLT, L. A.; KOJETIN, D. J.; BURRIS, T. P. The REV-ERBs and RORs: molecular links between circadian rhythms and lipid homeostasis. **Future medicinal chemistry**, 3, n. 5, p. 623-638, 2011.

STRASSER, B.; GEIGER, D.; SCHAUER, M.; GATTERER, H. *et al.* Effects of exhaustive aerobic exercise on tryptophan-kynurenine metabolism in trained athletes. **PloS one**, 11, n. 4, p. e0153617, 2016.

TORMA, F.; GOMBOS, Z.; JOKAI, M.; TAKEDA, M. *et al.* High intensity interval training and molecular adaptive response of skeletal muscle. **Sports Medicine and Health Science**, 1, n. 1, p. 24-32, 2019.

VAINSHTEIN, A.; HOOD, D. A. The regulation of autophagy during exercise in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, 120, n. 6, p. 664-673, 2016.

VALLONE, D.; PICETTI, R.; BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. **Neuroscience & biobehavioral reviews**, 24, n. 1, p. 125-132, 2000.

VAN DER HEIDE, L. P.; HOEKMAN, M. F.; SMIDT, M. P. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. **Biochemical Journal**, 380, n. 2, p. 297-309, 2004.

WANG, W.; CHOI, R. H.; SOLARES, G. J.; TSENG, H.-M. *et al.* L-Alanylglutamine inhibits signaling proteins that activate protein degradation, but does not affect proteins that activate protein synthesis after an acute resistance exercise. **Amino acids**, 47, n. 7, p. 1389-1398, 2015.

WESTON, K. S.; WISLØFF, U.; COOMBES, J. S. High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis. **British journal of sports medicine**, 48, n. 16, p. 1227-1234, 2014.

WIDNER, B.; LAICH, A.; SPERNER-UNTERWEGER, B.; LEDOCHOWSKI, M. *et al.* Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression—what is the link? **Brain, behavior, and immunity**, 16, n. 5, p. 590-595, 2002.

WOLDT, E.; SEBTI, Y.; SOLT, L. A.; DUHEM, C. *et al.* Rev-erb-[alpha] modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. **Nature medicine**, 19, n. 8, p. 1039-1046, 2013.

YANG, X.; DOWNES, M.; RUTH, T. Y.; BOOKOUT, A. L. *et al.* Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. **Cell**, 126, n. 4, p. 801-810, 2006.

YIN, L. Is a Critical Lithium-Sensitive Component α Nuclear Receptor Rev-erb. **Oikos**, 105, p. 141, 2004.

ZACHARI, M.; GANLEY, I. G. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. **Essays in biochemistry**, 61, n. 6, p. 585-596, 2017.

ÅKESSON, K.; PETTERSSON, S.; STÅHL, S.; SUROWIEC, I. *et al.* Kynurenine pathway is altered in patients with SLE and associated with severe fatigue. **Lupus Science & Medicine**, 5, n. 1, p. e000254, 2018.