

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Nayara Abreu Coelho Horta

**Sincronização pela alimentação em tempo restrito: papel
do TRPV1**

Belo Horizonte
2019

Nayara Abreu Coelho Horta

Sincronização pela alimentação em tempo restrito: papel do TRPV1

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Maristela de Oliveira Poletini

Belo Horizonte

2019

- 043 Horta, Nayara Abreu Coelho.
Sincronização pela alimentação em tempo restrito: papel do TRPV1
[manuscrito] / Nayara Abreu Coelho Horta. – 2019.
88 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Profª. Dra. Maristela de Oliveira Poletini.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.
1. Fisiologia. 2. Ritmo Circadiano. 3. Relógios Biológicos. 4. Fígado. 5.
Atividade Motora. I. Poletini, Maristela de Oliveira. II. Universidade Federal de
Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO Nº 314 DE NAYARA ABREU COELHO HORTA

Às 09:00 horas do dia 13 do mês de dezembro de 2019, na SALA PROF. WILSON BERALDO - BLOCO A4-175 - ICB, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de Nayara Abreu Coelho Horta, orientada pela Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini (afastado por Licença Médica). Inicialmente, o presidente da Banca Examinadora indicado pela Coordenação do Programa, **Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. John Fontenele Araujo**, DFS/UFRN, **Prof. Dr. Frederico Sander Mansur Machado**, UNIMONTES, **Profa. Dra. Danusa Dias Soares**, EEEFTO/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira**, ENFERMAGEM/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada: "SINCRONIZAÇÃO PELA ALIMENTAÇÃO EM TEMPO RESTRITO: PAPEL DO TRPV1". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar APROVADA a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 13 de dezembro de 2019.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

[Assinatura]
[Assinatura]
[Assinatura]
[Assinatura]

* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Doutor só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da tese, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de diploma, a secretaria emitirá certificado de conclusão do doutorado.

Departamento de Fisiologia e Biofísica. Av Antonio Carlos, 6627 - ICB - UFMG. 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil
- Fone: (55-31) 3409-2923. FAX: (55-31) 3409-2924. E-mail: pgfisfar@icb.ufmg.br

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades que foram colocadas em meu caminho.

Ao meu marido, Fernando, por ser este companheiro de todas as horas. Por incentivar todas as minhas escolhas, mesmo não compreendendo a dinâmica de uma vida acadêmica. Por ter me acompanhado em todos os finais de semana para pesar ração de ratos, por não ter ideia da diferença entre um tecido adiposo mesentérico e retroperitoneal e, ter que aprender em 2 minutos para ajudar nos experimentos. Sem você eu não teria conseguido entrar para o mestrado e muito menos estaria finalizando este doutorado.

À minha querida orientadora Prof^a Maristela, que reabriu as portas da pesquisa para mim com tamanho entusiasmo. Obrigada pela confiança, pelo estímulo constante para a minha formação e por acreditar em nossa capacidade. Sou extremamente grata por tudo que aprendi com você. Não tenho palavras para demonstrar a minha gratidão por todos estes anos de convivência, e por ter criado uma relação muito além do que apenas aluno-orientador.

À minha linda família, pela paciência, amor e incentivo. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos e por serem meu porto seguro.

As minhas manas, Paola e Thais, pela tamanha cumplicidade e pela incrível dedicação que tiveram com este trabalho. Obrigada pela ajuda, inclusive nas madrugadas e finais de semana, sem vocês, eu não conseguiria completar esta etapa. Vocês fazem os meus dias mais felizes.

À Flavia, nossa “benzinho”, pelas trocas de conhecimento, de alegrias e tristezas. Por ser nosso arco-íris inclusive em dias nublados.

Aos grandes colegas Helton e Lucas, pelo trabalho em conjunto, troca de conhecimento e pelo bom humor.

Ao colega Bruno Melo, por me ensinar o IPTTG e ajudar com as análises séricas, sempre um *gentleman* e com um sorriso no rosto.

Ao professor Cândico Coimbra por permitir o uso do aparelho de calorimetria indireta.

Ao professor Raphael Szawka pelos ensinamentos e por me auxiliar nos momentos que a minha orientadora esteve afastada.

Aos alunos de iniciação científica, Tito, Diego, Ingrid, Mariana, Thais, Vitória, que passaram pelo laboratório e tive o privilégio de aprender a ensinar e além disso, nos ajudaram tanto no cuidado dos animais e no protocolo de dieta em tempo restrito.

Aos amigos do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo: Ana Clara, Daniela Frederico, Kaoma, Nayara Aquino, Thatiane, Patrícia, Roberta, Quezia, Gleisy, Ayala, por todos os momentos de alegria, trabalho e desespero compartilhados.

À técnica do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, Simone Pio, pelo auxílio e disponibilidade

Aos professores do Laboratório de Endocrinologia e metabolismo Adelina dos Reis, Glauber da Silva, Paula de Souza por incentivarem o meu crescimento profissional.

Aos amigos Fernando Pedro, Bruna, Cristiane, Eric, Filipe, Sthéfanie pela alegria que trouxeram para a minha vida em um momento que não estava nada fácil.

A amiga Luciana, por termos divididos não apenas as marmitas, mas as aflições, as conquistas, as tristezas e os conhecimentos.

À secretaria do programa de pós-graduação.

À população brasileira, que através da CAPES, CNPq e FAPEMIG financiaram a realização do projeto e mais um período da minha formação profissional e científica.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Alimentação é uma potente pista de sincronização para o relógio biológico. O fígado é um órgão que prontamente responde a esta pista temporal, de tal maneira que, alimentação ofertada durante o período de repouso altera o padrão temporal dos genes de relógio. Esta alteração pode comprometer o metabolismo de glicose. O canal Receptor de Potencial Transiente Vanilóide 1 (TRPV1) regula o metabolismo de glicose, sendo que sua ativação leva a redução da hiperglicemia. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar o papel do canal TRPV1 na sincronização do relógio biológico e nas alterações metabólicas promovidas pela dieta em tempo restrito (TR). Para tanto, ratos *Wistar* adultos foram submetidos a dieta TR na fase de repouso do ciclo circadiano ou mantidos sob dieta *ad libitum* (AD) com ração padrão por 21 dias. Nos animais AD e dieta TR foi realizado registros da atividade locomotora espontânea (ALE) e da temperatura interna (T_{interna}) por telemetria, teste de tolerância à glicose i.p. (IPTTG) em dois horários do dia no *Zeitgeber time* (ZT) 12 e ZT 22 e registros do consumo de O_2 (VO_2) para o cálculo do gasto energético (EE) e quociente respiratório (QR) entre os ZT 4 e 5. E, um outro grupo de animais AD e dieta TR foram eutanasiados no ZT 1 e ZT 13 para obtenção do sangue para as análises de insulina e leptina por ELISA e do fígado para análise da expressão dos genes de relógio (*Per1*, *Cry1*, *Cry2*, *RevErba* e *Bmal1*) e dos genes relacionados com o metabolismo energético (*TRB-3* e *glicose-6-fosfatase*, *PEPCK* e *PPAR α*) por qPCR. Todos estes parâmetros (registro de ALE e T_{interna} , IPTTG, análise de VO_2 e expressão gênica) também foram avaliados em animais dieta TR sujeitos a dessensibilização do canal TRPV1 abdominal por uma injeção i.p. de resiniferatoxina (RTX) ou seu veículo. A dieta TR reduziu o EE e aumentou o QR resultando em um menor ganho de peso corporal. Além disso, a dieta TR promoveu um arrastamento do ritmo de T_{interna} e ALE, uma inversão de fase na expressão dos genes *Per1* e *Bmal1* e abolição da variação temporal dos genes *Cry1* e *RevErba*. Estas alterações foram acompanhadas por perda da variação temporal na expressão dos genes *Ppara* e *glicose-6-fosfatase*, um aumento da secreção de insulina no ZT 1 e inversão na fase na liberação de leptina, juntamente com uma melhora na tolerância à glicose. Os resultados mostraram que, embora a dessensibilização do TRPV1 tenha antecipado o *onset* e a acrofase dos ritmos de ALE e T_{interna} , não alterou o perfil circadiano de oscilação observado em resposta a dieta TR. Este tratamento prejudicou a resposta ao teste de tolerância à glicose induzidas pela dieta TR, sem interferir na secreção de insulina. Além disso, aboliu a variação temporal da expressão dos genes de relógio *Per1* e *RevErba* e dos genes relacionados ao metabolismo da glicose, a *glicose-6-fosfatase*, *PEPCK* e *TRB-3* e da secreção de leptina. Assim, podemos concluir que a plasticidade do relógio biológico em se ajustar a esta nova pista temporal mostrou-se ser benéfica para o metabolismo da glicose. Esta plasticidade do sistema circadiano parece depender do canal TRPV1 porque a falta deste canal interferiu na sinalização da pista temporal (dieta TR) para o relógio biológico.

Palavras chaves: ritmos circadianos, relógio biológico, dieta em tempo restrito, fígado, genes de relógio, temperatura interna, atividade locomotora, resiniferatoxina, dessensibilização.

ABSTRACT

Feeding is a strong entrainment cue for the biological clock. The liver is the first organ to respond to time restricted feeding to the resting phase of the circadian rhythm of activity with alteration in expression of clock genes. This can compromise the glucose metabolism, which may lead to metabolic diseases. Transient receptor potential vanilloid1 (TRPV1) channel regulates glucose metabolism and its activation prevents hyperglycemia. Therefore, the aim of this study was to investigate the role of TRPV1 channel in the entrainment and in the metabolic changes induced by time restricted feeding (TR). For this purpose, adult Wistar rats were fed with normal chow in the resting phase or *ad libitum* (AD) for 21 days. From AD and TR animals, telemetric records were obtained to evaluate spontaneous locomotor activity (ALE) and core body temperature (T_{interna}). Intraperitoneal glucose tolerance test (IPTTG) was performed at ZT 12 and ZT 22. And determination of oxygen consumption (VO_2) was done between ZT 4 and 5 for the calculation of the energy expenditure (EE) and respiratory quotient (QR). Another group of AD and TR animals was euthanized at ZT 1 and at ZT 13 to obtain the trunk blood for insulin and leptin measurements by ELISA and the liver to analyse clock gene (*Per1*, *Cry1*, *Cry2*, *RevErb α* e *Bmal1*) and the metabolic genes expression (*TRB-3* e *glucose-6-phosphatase*, *PEPCK* e *PPAR α*) by qPCR. All these parameters were also evaluated in a group of TR animals previously subjected to resiniferatoxin (RTX) i.p. injection or its vehicle to desensitize TRPV1 channel in the abdominal cavity. TR feeding reduced the EE and increased the QR which resulted in smaller body weight gain. In addition, TR feeding entrained T_{interna} and ALE rhythms, phase shifted *Per1* and *Bmal1* expression, and abolished the temporal variation of *Cry1* e *Reverba*. These changes were accompanied by abolishment of the temporal variation in the *Ppara* and *glucose-6-phosphatase* expression in the liver. Also, TR feeding increased insulin secretion at ZT 1 and phase-shifted the temporal variation of leptin serum levels, together with an improvement in the glucose tolerance. Although TRPV1 desensitization has anticipated the onset and acrophase of ALE and T_{interna} rhythms, it did not alter the pattern of ALE and T_{interna} induced by TR feeding. This treatment impaired the response in the IPTTG induced by TR feeding without affecting insulin secretion. Furthermore, it abolished the temporal variation in *Per1*, *RevErb α* , *glucose-6-phosphatase*, *PEPCK*, *TRB-3* liver expression, and leptin secretion. Therefore, the ability of the biological clock to entrain to the new schedule of feeding improves glucose metabolism. This feature of the circadian time system seems to depend on TRPV1 channel because the lack of this channel interferes in the signaling of the temporal cue (TR feeding) to the biological clock.

Key words: Circadian rhythms, time restricted feeding, liver, clock genes, core body temperature, spontaneous locomotor activity, resiniferatoxin, desensitization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração do protocolo utilizado para dieta.....	24
Figura 2: Linha do tempo referente aos experimentos do delineamento 1	26
Figura 3: Ilustração do protocolo de dieta utilizado após a divisão dos grupos em <i>Vehicle</i> e RTX	27
Figura 4: Linha do tempo referente aos experimentos do delineamento 2	30
Figura 5: Efeito da dieta TR sobre a massa corporal, o ganho de peso final, ingestão alimentar, eficiência alimentar, VO ₂ , QR e EE.	40
Figura 6: Efeito da dieta TR sobre a variação circadiana da T _{interna}	42
Figura 7: Efeito da dieta TR sobre a variação circadiana da ALE.....	44
Figura 8: Perfil temporal da expressão dos genes de relógio no fígado.	45
Figura 9: Perfil temporal da expressão de genes do metabolismo energético.	47
Figura 10: Efeito da dieta TR sobre as concentrações séricas de insulina, leptina e sobre a tolerância à glicose.....	48
Figura 11: Efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre a massa corporal, o ganho de peso final, ingestão alimentar, eficiência alimentar, VO ₂ , QR e EE.	50
Figura 12: Efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre a variação circadiana da T _{interna}	51
Figura 13: Efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre a variação circadiana da ALE.....	53
Figura 14: Efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre os genes de relógio.	55
Figura 15: Efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre os genes do metabolismo energético.	56
Figura 16: Efeito da dessensibilização abdominal do canal TRPV1 sobre os níveis séricos de insulina, leptina e sobre a tolerância à glicose.	57
Figura 17: Periodograma representativo de um animal do grupo AD e de um animal do grupo TR.	87
Figura 18: Periodograma representativo de um animal do grupo <i>Vehicle</i> e de um animal do grupo RTX.	88

LISTA DE SIGLAS

AD- *Ad libitum*

ALE- Atividade locomotora espontânea

AKT- proteína quinase

AUC -Área sob a curva

Bmal1- *Brain and muscle Arnt-like protein 1*

Clk ϵ i- Caseína quinase I ϵ

Clock- *Circadian locomotor Output Cycles Kaput*

CRTC2- *CREB-regulated transcriptional coactivator 2*

Cry- *Cryptochrome*

CT- Ciclo de temperatura

EE- Gasto energético

FAA- comportamento antecipatório à comida

H₂O DEPC- Água tratada com dietil-pirocarbonato

HSF- *Heat shock factor*

HSP- *Heat shock protein*

IPGTT- Teste de tolerância intraperitoneal à glicose

i.p: Intraperitoneal

NSQ- Núcleo supraquiasmático

Per- *Period*

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PEPCK- Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PGC-1 α - coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama

PPAR α - receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa

qPCR- PCR quantitativo em tempo real

QR- Quociente respiratório

RervErba- *Reverse-erythroblastosis virus alpha*

ROR α - *Retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha*

RTX- Resiniferatoxina

s.c- Subcutâneo

T_{interna}- Temperatura interna

TR- Tempo restrito

TRB-3- Pseudoquinase tribbles 3

TRP- Receptores de Potencial Transiente

TRPV1- Receptor de Potencial Transiente Vanilóide 1

VO₂- consumo de oxigênio

ZT- *Zeitgeber time*

SUMÁRIO

1	Introdução	13
2	Justificativa	21
3	objetivos.....	22
3.1	Objetivo geral	22
3.1	Objetivos específicos	22
4	Metodologia	23
4.1	Animais	23
4.2	Delineamentos experimentais	23
4.2.1	Etapa 1	23
4.2.2	Etapa 2	27
4.3	Registro de T_{interna} e a_{le}	31
4.4	Procedimento Cirúrgico.....	31
4.5	Calorimetria indireta	31
4.6	Teste de tolerância a glicose	32
4.7	Dessensibilização do canal TRPV1	32
4.8	Dosagens séricas.....	33
4.9	Extração de RNA, Reação de Transcriptase e PCR quantitativo em Tempo-Real (qPCR)	33
4.9.1	Extração de RNA.....	33
4.9.2	Transcrição reversa.....	34
4.9.3	qPCR.....	34
4.10	Análise Estatística	37
5	Resultados	39
6	Discussão	59
7	Conclusão	70
8	Referências Bibliográficas	71
9	Apêndices	87

1 INTRODUÇÃO

O canal TRPV1 pertence a uma das famílias de canais receptor de potencial transiente (TRP), os quais são formados por 6 segmentos transmembrânicos (S1-S6), um poro formado pelos segmentos S5 e S6 e um terminal NH₂ e COOH intracelular. A disposição destas subunidades na membrana plasmática leva a seletividade destes canais a cátion, principalmente íons cálcio (NILIUS et al., 2007). São considerados sensores biológicos capazes de detectar alterações do microambiente e do estado celular (SAKAGUCHI; MORI, 2019) respondendo desde a estímulos mecânicos, passando pelo calor até a variação do estado de oxidação e redução da célula (PATAPOUTIAN et al., 2003).

A família TRPV é formada por 6 membros, sendo o TRPV1 ativado por calor, por endovanilóides, por redução de pH extracelular (pH < 5,5) e aumento do pH intracelular (pH > 7,8) (CATERINA, 2000; DHAKA et al., 2009; VAN DER STELT; DI MARZO, 2004). A capsaicina, o agente pungente da pimenta, é uma importante substância capaz de ativar o canal TRPV1, assim um nome dado inicialmente a este canal foi de receptor de capsaicina (CATERINA et al., 1999; TOMINAGA et al., 1998).

A expressão do TRPV1 já foi identificada em fibras mielinizadas tipo A δ e não mielinizadas tipo C; nos terminais centrais dos gânglios da raiz dorsal e gânglios trigeminais (ROMANOVSKY et al., 2009); em diversas áreas cerebrais como hipocampo, hipotálamo, cerebelo e tálamo (VENNEKENS; OWSIANIK; NILIUS, 2008); e em tecidos não-neuronais como pâncreas, fígado, macrófago e queratinócitos (PEDERSEN; OWSIANIK; NILIUS, 2005; VENNEKENS; OWSIANIK; NILIUS, 2008).

Desde sua caracterização e clonagem, este canal tem sido amplamente estudado pelo seu envolvimento no mecanismo de ativação das vias nociceptivas pelo calor nocivo (CATERINA et al., 1997, 1999). Mais recentemente, no entanto, mostrou-se que o canal TRPV1 participa do mecanismo de regulação da temperatura interna (T_{interna}) e do metabolismo energético (CATERINA, 2006; ROMANOVSKY et al., 2009; ZSOMBOK, 2013).

Estudos mostram que o bloqueio do canal TRPV1 gera hipertermia (GAVVA et al., 2008). Animais submetidos a dessensibilização do canal, por sua vez, perdem a capacidade de regular a T_{interna} durante o aquecimento (MILLS et

al., 2008) e isto parece ser devido à perda da via sensorial térmica originada em neurônios positivo para TRPV1, uma vez que, o fenótipo de perda da habilidade em manter a T_{interna} durante desafios térmicos ocorre em animais com remoção destes neurônios por mutação gênica (MISHRA et al., 2011).

Por outro lado, a ativação do TRPV1 aumenta a oxidação lipídica, melhora a sensibilidade à insulina e reduz o ganho de peso corporal (PANCHAL; BLISS; BROWN, 2018). A administração de capsaicina ou vanilóides reduz a ingesta alimentar e aumenta o gasto energético (BELZA; FRANDSEN; KONDRUP, 2007; IWASAKI et al., 2011; KANG et al., 2007; MASUDA et al., 2003; WESTERTERP-PLANTENGA; SMEETS; LEJEUNE, 2005; YOSHIOKA et al., 1999). Animais nocautes para o TRPV1 submetidos a uma dieta rica em gordura ganham mais peso do que os selvagens em função de uma redução do gasto energético e da atividade locomotora espontânea (ALE) na fase de escuridão (Lee et al 2015). Estes animais também apresentam maior resistência à insulina e à leptina (LEE et al., 2015). Por outro lado, apresentam um menor acúmulo de gordura abdominal e maior capacidade de termogênese (MOTTER; AHERN, 2008).

O tratamento com capsaicina auxilia no controle da glicose por regular a expressão de glicoquinase, da proteína transportadora de glicose 2 (GLUT-2), da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e da glicose-6-fosfatase, gerando uma inibição na gliconeogênese e uma ativação da síntese de glicogênio hepática (ZHANG et al., 2017). Além disso, a ativação do canal TRPV1 induz ao aumento da expressão de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa ($\text{PPAR}\alpha$), do coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama ($\text{PGC-1}\alpha$) e da proteína quinase (AKT) fosforilada no fígado (KANG et al., 2010; PANCHAL; BLISS; BROWN, 2018).

Se por um lado o TRPV1 emerge como um componente da regulação da T_{interna} e de componentes do metabolismo da glicose, sabe-se que a T_{interna} apresenta um ritmo circadiano de variação com seu nadir durante a fase de repouso do animal (LIU et al., 2002; REFINETTI; MENAKER, 1992; SCHEER et al., 2005). Além disso, a T_{interna} funciona como um potente agente sincronizador de relógios periféricos (BROWN et al., 2002; BUHR; YOO; TAKAHASHI, 2010). A ingestão alimentar, por sua vez, acontece durante o período de atividade, fase onde se observa valores aumentados dos hormônios insulina, leptina e

diminuídos de glucagon e glicocorticoides (KALSBECK; FLIERS, 2013; OOSTERMAN et al., 2015). Dessa forma, hipotetizamos que o canal TRPV1 seja um componente do sistema circadiano temporal.

Todos os seres vivos contam com este sistema para a sincronização aos ciclos de luz e escuridão e para a geração de um padrão oscilatório circadiano das respostas comportamentais e autonômicas. Este padrão não ocorre devido a uma simples resposta às mudanças físicas do ambiente ao longo de 24 horas, mas se antecipa a elas de tal forma a garantir que o organismo esteja preparado para responder apropriadamente (LELIAVSKI et al., 2014; PITTENDRIGH, 1993; VITATERNA; TAKAHASHI; TUREK, 2001; WEHRENS et al., 2017). A quebra da sintonia de fase na secreção destes hormônios, da ingesta alimentar e do gasto energético pode desencadear alterações no metabolismo energético, levando a diabetes tipo II, a síndrome metabólica e a obesidade (BASS; TAKAHASHI, 2010).

Podemos dizer que o sistema circadiano é composto por: (1) elementos que detectam e respondem as variações do ambiente externo ou os sinais de entrada do sistema e (2) um oscilador endógeno (ou relógio biológico) capaz de gerar (3) ritmos circadianos ou sinais de saída, ou seja, as respostas geradas pelo relógio (AMARAL et al., 2014; GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010).

A exposição dos organismos às pistas ambientais (sinais de entrada) que apresentam uma frequência recorrente, ocasiona um arraste do relógio biológico, de tal forma que os ritmos circadianos gerados (ou sinais de saída) passam a apresentar um período igual ao período da pista ambiental (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010). As pistas ambientais são também denominadas de *Zeitgeber* (uma palavra alemã, cuja tradução pode ser doadores ou marcadores de tempo). Além do ciclo de luz e escuridão, existem *Zeitgeber* não fóticos capazes de promover o arrastamento do relógio biológico, dentre eles estão a alimentação e a interação social (AMARAL et al., 2014; BUTTGEREIT et al., 2015; HSIEH et al., 2014; SALGADO-DELGADO et al., 2011; WEBB et al., 2009). Ainda não está completamente elucidado na literatura como os osciladores são arrastados por *zeitgeber* não fóticos.

Pesquisas realizadas nas últimas décadas revelaram que o relógio biológico conta com um conjunto de proteínas nomeados proteínas de relógio para promover a coordenação das oscilações circadianas ao nível celular

(SCHIBLER et al., 2016). Estas proteínas operam por meio de alças transcricionais de retroalimentação autorreguladas, com capacidade de se acumularem na célula de acordo com um ritmo circadiano (TAKAHASHI, 2017).

Este mecanismo molecular presente ao nível celular do relógio biológico é bem conservado entre as espécies. Em mamíferos, as proteínas derivadas dos genes *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* (*Clock* ou parálogo NPAS2) e *Brain and muscle Arnt-like protein 1* (*Bmal1* ou ARNTL) formam um heterodímero, que se liga em elementos regulatórios contendo E-box, funcionando como fator de transcrição para a expressão dos genes *Period* (*Per*) 1, 2 e 3, *Cryptochrome* (*Cry*) 1 e 2 (TAKAHASHI, 2017; YAMAZAKI, 2000). PERs e CRYs formam oligômeros, que são fosforilados por uma caseína quinase e transportados do citoplasma para o núcleo (OKAMURA; YAMAGUCHI; YAGITA, 2002). Uma vez no núcleo celular, o dímero PER-CRY remove CLOCK/BMAL1 da sequência E-box, acarretando no bloqueio da transcrição de seus respectivos alvos, resultando, assim no fim da transcrição de *Per* e *Cry* (LEE et al., 2001; YE et al., 2014). A segunda alça é composta pelas proteínas *Reverse-erythroblastosis virus alpha* (REVERB α e β) e *Retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha* (ROR α), que tiveram seus respectivos genes transcritos pela ação do CLOCK/BMAL em suas regiões promotoras (TAKAHASHI, 2017). Uma vez no núcleo, as proteínas REVERB α e ROR α competem pela ligação no elemento RORE da região promotora de *Bmal1*, sendo que a proteína REVERB α reprime a transcrição e o ROR age de forma oposta, estimulando (ETCHEGARAY et al., 2003; SCHIBLER et al., 2016). Quando a proteína REVERB α está ausente, o gene *Bmal1* é liberado, podendo formar novamente o fator de transcrição CLOCK/BMAL1, reiniciando um novo ciclo circadiano (PREITNER et al., 2002).

CLOCK, BMAL1, PER1, PER2, CRY1 E CRY2 são fosforiladas temporalmente, sendo a fosforilação máxima correlacionada ao tempo de retroalimentação negativa sobre a transcrição de *Per* e *Cry*. A estabilidade de PER diminui após sofrer hiperfosforilação pela ação da caseína quinase I ϵ (Clk ϵ), a sua fosforilação permite uma rápida degradação destas proteínas por proteossomas, evitando sua acumulação no citoplasma. (ALBRECHT; EICHELE, 2003; OKAMURA; YAMAGUCHI; YAGITA, 2002). Enquanto a proteína CRY liga-se à PER no núcleo, impedindo sua saída. Quando a

concentração de PER no núcleo torna-se muito baixa para manter a retroalimentação negativa, ocorre o início de um novo ciclo. Assim, a periodicidade do relógio circadiano, ao nível celular, resulta da combinação entre retroalimentação transcricional positiva e negativa, o movimento constante de PER entre o núcleo e o citoplasma, e a fosforilação e degradação de PER (ALBRECHT; EICHELE, 2003).

Em mamíferos, o relógio biológico divide-se anatomicamente e funcionalmente entre um relógio central, localizado no núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo e vários relógios periféricos amplamente distribuídos, ou seja, presente em quase todas as células e tecidos (WELSH; TAKAHASHI; KAY, 2010). Uma questão que emerge do fato do relógio biológico contar com diversos osciladores endógenos (relógio central e os relógios periféricos) é como ocorre a sincronização entre eles gerando os ritmos biológicos. A ideia mais consolidada na literatura baseia-se na organização hierárquica do sistema temporal circadiano, no qual o relógio central é responsável por sincronizar por vias neurais e hormonais os relógios periféricos (KALSBECK; FLIER, 2013).

Husse e colaboradores (2015) coloca em questão esta organização propondo uma equivalência entre os osciladores (central e periféricos), de tal forma que cada oscilador pode responder independentemente a uma pista temporal (CHALLET; MALAN; PÉVET, 1996; HUSSE; EICHELE; OSTER, 2015; ISHIDA et al., 2005; STOKKAN et al., 2001; WAKAMATSU et al., 2001).

Independente da proposta de organização a se considerar, o objetivo central do sistema circadiano temporal é manter a sincronia de fase dos osciladores, ou seja, os ritmos circadianos endógenos sincronizados com pistas temporais externas. Já está bem estabelecido que a perda desta sintonia compromete a homeostase energética (BASS; TAKAHASHI, 2010; MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012).

O limiar de controle da T_{interna} é alterado ao longo do dia, gerando uma oscilação circadiana, o que resulta em um aumento um pouco antes de começar a fase de atividade e uma redução antes de iniciar a fase de repouso, independentemente da atividade locomotora (LIU et al., 2002; REFINETTI; MENAKER, 1992; SCHEER et al., 2005). O NSQ é o responsável pela regulação tanto dos ritmos circadianos de T_{interna} quanto de ALE (GUZMÁN-RUIZ et al., 2015).

O ritmo de ALE está intimamente relacionado aos hábitos alimentares do animal (PENDERGAST; YAMAZAKI, 2018). Roedores apresentam, na fase de escuridão do ciclo, o comportamento de ir em busca da comida, sendo um período ativo, já a fase de luz, encontram-se em repouso, com reduzida ALE, e consequentemente, é o período de jejum do animal ou de baixíssimo consumo alimentar (SANTOSO et al., 2018; TUREK, 2005). Surpreendentemente, animais mutantes para o gene *Clock* perdem esta variação circadiana do comportamento alimentar, ingerindo a mesma quantidade de comida tanto na fase de luz quanto na fase de escuridão, mas continuam apresentando um aumento da ALE na fase de escuridão. Independentemente do tipo de dieta ofertada, padrão ou rica em gordura, estes animais apresentam maior ganho de peso corporal quando comparados aos selvagens (TUREK, 2005). Estes resultados ressaltam a importância da sincronização dos ritmos circadianos de ingesta alimentar e de ALE para a manutenção do balanço energético do animal. Além disso, apontam para a participação do relógio molecular como um componente na sincronização dos ritmos circadianos.

A alimentação é uma importante pista ambiental para os relógios periféricos. Animais submetidos a alimentação apenas na fase de luz, apresentavam inversão de fase de genes do relógio em diversos tecidos, como fígado, coração, rim, sem alteração na expressão dos *Per1* e *Per2* no NSQ (DAMIOLA et al., 2000; SCHIBLER; RIPPERGER; BROWN, 2003; STOKKAN et al., 2001). O arraste promovido pela alimentação afeta de forma mais rápida o relógio hepático, assim o fígado demora menos dias para alterar a expressão dos genes de relógio comparado a outros órgãos (DAMIOLA et al., 2000).

Dessa forma, este órgão pode desempenhar um papel central nas respostas de arraste promovida pelo horário da alimentação, uma vez que possui um papel chave no metabolismo dos nutrientes (CHAIX et al., 2019). O fígado é fundamental na manutenção da glicemia pela produção de glicose durante o jejum (KALSBEEK; LA FLEUR; FLIERS, 2014), além de controlar o fluxo de lipídeos durante o estado alimentado e de jejum (DOI; OISHI; ISHIDA, 2010; HAN et al., 2016; JONES, 2016; KALSBEEK; LA FLEUR; FLIERS, 2014).

Um grande número de genes hepáticos apresenta oscilação circadiana em sua expressão, incluindo uma grande parte dos genes que estão envolvidos com os processos de utilização e estocagem de energia, como glicogênese,

glicogenólise, glicólise e gliconeogênese (OISHI et al., 2003). Por exemplo, os genes que codificam enzimas como a PEPCK, glicose-6-fosfatase, 7 α -hidroxilase, genes envolvidos com transporte de glicose e com a homeostase do colesterol variam sua expressão de forma circadiana no fígado (DUEZ; STAELS, 2008; LAMIA; STORCH; WEITZ, 2008), fortalecendo a ideia de que este órgão tenha um papel chave nas repostas de arraste promovida pela alimentação.

Animais com mutação específica para *Bmal1* no fígado apresentam um aumento da tolerância à glicose, com produção normal de insulina e conteúdo normal de gordura no fígado. Já a mutação do gene *Cry* no fígado, inibe a gliconeogênese induzida pelo glucagon (Zhang et 2010). Estes resultados indicam uma participação dos genes de relógio sobre a função do fígado na manutenção da glicemia. De fato, animais nocautes para os genes de relógio, apresentam alterações de enzimas importantes para as vias metabólicas. Camundongos nocautes para o gene *Bmal1* perdem a expressão rítmica da *PEPCK* e *glicose-6-fosfatase*, gerando um *clearance* de glicose exacerbado (LAMIA; STORCH; WEITZ, 2008). Animais nocaute para o gene *CLOCK* perdem a expressão circadiana da *glicogênio-sintase 2*, enzima limitante para o processo de glicogênese (DOI, OISHI E ISHIDA 2010). A proteína CLOCK estimula diretamente a transcrição da enzima glicogênio sintase 2, enquanto que a *RevErb α* estimula as enzimas glicose-6-fosfatase e PEPCK (DOI; OISHI; ISHIDA, 2010; YIN et al., 2007). Assim, o relógio hepático parece ser fundamental para a função metabólica do fígado.

Em animais submetidos a dieta rica em gordura com livre acesso apresentam uma redução na amplitude do ritmo de expressão dos genes *Per2*, *Bmal1* e *RevErb α* . Ao restringir o horário desta dieta para o período de atividade, os animais voltam a apresentar um perfil de expressão gênica semelhante aos animais submetidos a dieta padrão (HATORI et al., 2012). Por outro lado, Yasumoto e colaboradores (2016) observaram que animais com acesso a dieta na fase de luz tiveram um aumento do peso corporal, inversão do perfil de secreção temporal e aumento nos níveis de insulina e leptina, inversão do perfil temporal de grelina, acúmulo de gordura no fígado, alteração no perfil temporal dos genes de relógio e genes envolvidos no metabolismo. Estas alterações não foram observadas nos animais com acesso a dieta rica em gordura na fase de

escuridão. Desta forma, o horário da alimentação e não a qualidade da dieta parece contribuir de forma decisiva para o arraste do relógio hepático.

Sabe-se que os hormônios reguladores do metabolismo energético, tais como glucagon, a insulina, a leptina, o cortisol, os hormônios tireoidianos e a grelina são secretados de forma circadiana (LAERMANS; DEPOORTERE, 2016). O arraste do relógio hepático pela alimentação, dessa forma, pode ocorrer em resposta a sinalização hormonal no fígado. De fato, glucagon e insulina regulam a expressão de *Bmal1* no fígado. O glucagon gera ativação *CREB-regulated transcriptional coactivator 2* (CRTC2), que, por sua vez, estimula a transcrição de *Bmal1*, em contrapartida, a insulina inibe o CRTC2, inibindo a expressão de *Bmal1* (SUN et al., 2015).

Considerando que tanto a oferta da alimentação no período de repouso do animal quanto a falta do canal TRPV1 comprometem de forma similar a homeostase energética, este canal pode ser um sinalizador desta pista temporal para o relógio biológico. De fato, o canal TRPV1 parece ser um componente chave do sistema circadiano temporal. A dessensibilização do canal TRPV1 abole o ritmo de expressão do gene *Per1* e aumenta a expressão do gene *Bmal1* no ZT 0 no fígado de ratos adultos, já em ratos neonatos, este tratamento reduz a expressão de *Per2* no ZT 3 (HORTA, 2015; JEONG; SEONG, 2014). Estes resultados são acompanhados de uma inversão de fase no ritmo de $T_{interna}$, uma redução da amplitude e uma antecipação do *onset* do ritmo de ALE em roedores (HORTA, 2015; JEONG; SEONG, 2014; MORAES et al., 2017). Além disso, animais nocautes para o canal TRPV1 mostram uma alteração no padrão temporal de expressão de *Per1* e *Per2* no tecido adiposo marrom (MORAES et al., 2017). Desta forma, neste estudo, avaliamos se o TRPV1 está envolvido na sincronização do relógio biológico pela alimentação.

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o consumo excessivo de alimentos ricos em gordura ou carboidratos geram obesidade, diabetes, síndrome metabólica, dentre outros problemas metabólicos. Observa-se que a restrição do tempo de acesso ao alimento ao longo do dia, beneficia a perda de peso de pessoas obesas e acarreta em melhoras metabólicas, independente da restrição calórica (GILL; PANDA, 2015). Além disso, estudos em animais com dieta rica em gordura, observam que mais importante do que os aspectos nutricionais da dieta é o horário de sua oferta (YASUMOTO et al., 2016). Observa-se que a alimentação em horários errados contribui para diversas desordens metabólicas como esteatose hepática, obesidade, hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemia, síndrome metabólica (BASS; TAKAHASHI, 2010; HUANG et al., 2011; TUREK, 2005; VITATERNA; TAKAHASHI; TUREK, 2001).

O relógio biológico endógeno é responsável por sincronizar o indivíduo ao meio. A alimentação é uma importante pista para o relógio biológico, quando há alteração desta pista, ocorre uma perturbação no relógio biológico desencadeando problemas de saúde. A maneira como a alimentação sincroniza o relógio biológico ainda não está claro. Evidências apontam para a participação do canal receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1) na regulação da ingesta alimentar e do ganho de peso corporal (MOTTER; AHERN, 2008). Os canais TRPV1 estão associados com a homeostase energética (ZSOMBOK, 2013). Em trabalho anterior do nosso grupo, foi observado que os canais TRPV1 estão envolvidos com a oscilação dos genes do relógio hepático (HORTA, 2015). Desta forma, neste trabalho, iremos avaliar se o canal TRPV1 participa da sincronização do relógio biológico via alimentação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo investigar o papel do canal TRPV1 na sincronização do relógio biológico pela alimentação e seus desdobramentos sobre o metabolismo energético.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a dieta TR afeta o metabolismo energético.
- Avaliar se a dieta TR afeta o ritmo diário de T_{interna} e ALE.
- Avaliar se a dieta TR compromete (ou não) o relógio hepático, interferindo na expressão de genes envolvidos no metabolismo energético e nas concentrações plasmáticas de insulina e leptina.
- Avaliar se a dieta TR compromete a tolerância à glicose.
- Avaliar a participação do canal TRPV1 no efeito da dieta TR sobre o metabolismo energético.
- Avaliar a participação do canal TRPV1 na sincronização dos ritmos de T_{interna} e ALE pela alimentação.
- Avaliar se o canal TRPV1 participa da sincronização do relógio hepático induzida pela dieta TR e o impacto deste efeito sobre a expressão de genes envolvidos no metabolismo energético e nas concentrações plasmáticas de insulina e leptina.
- Avaliar a participação do canal do TRPV1 no efeito da dieta TR sobre a tolerância à glicose.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* adultos provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos sob ciclo de luz e escuridão de 12/12 horas e temperatura ambiente de 24 ± 2 °C. Assim, no ZT 0 as luzes foram acessas no biotério e no ZT 12 apagadas. Antes de serem divididos nos delineamentos que serão abordados a seguir, tiveram livre acesso à ração. Em todos os experimentos, os animais tiveram livre acesso à água. Um grupo de animais foi mantido no biotério sem manipulação e foi eutanasiado no ZT 0, 6, 12 e 18 (grupo *naive*). A separação dos animais por grupo foi feita de forma aleatória. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo n° 289/2016).

Os procedimentos realizados durante a fase de escuridão foram realizados sob luz vermelha (< 2 Lux).

4.2 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Etapa 1

Todos os animais foram habituados ao biotério na primeira semana, após a chegada ao local. Neste período, os animais ficaram em caixas coletivas (até 5 animais/caixa), com livre acesso a ração e água (habituação ao biotério) e, não houve manipulação. Neste delineamento os animais foram divididos em dois grupos experimentais, um com livre acesso a ração, *Ad libitum* (Grupo: AD), e outro com acesso a ração durante as 12 h de luz (ZT 0 a ZT 12, Grupo: tempo restrito, TR), este protocolo de dieta perdurou por 21 dias (Figura 1). Neste período, a ingesta alimentar foi avaliada diariamente e o ganho de peso corporal foi avaliado por 2 vezes na semana. Ambos os grupos, AD e TR passaram pelos protocolos experimentais descritos a seguir.

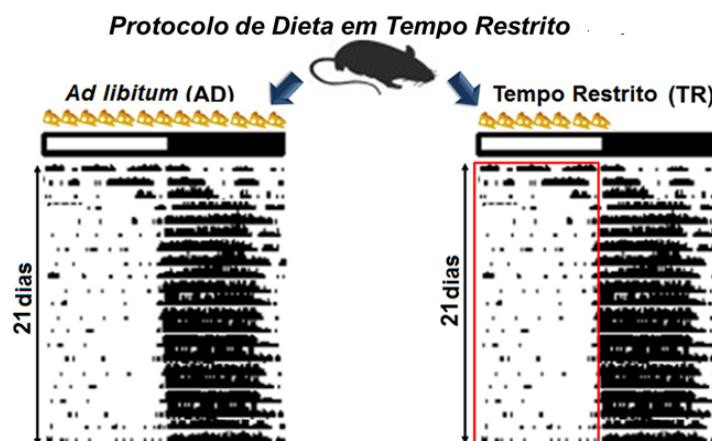


Figura 1: Ilustração do protocolo utilizado para dieta *Ad libitum* (AD) ou restrita a fase de luz, tempo restrito (TR)

Experimento 1: Avaliação do gasto energético (EE) e do quociente respiratório (QR) nos grupos AD e TR.

Após 1 semana da chegada dos animais no biotério experimental, iniciou-se a habituação à caixa de calorimetria indireta. Cada animal permanecia por 10 minutos na caixa, este processo foi repetido por 5 dias consecutivos, em horários aleatórios. Ao final da habituação foi realizado o registro do consumo de oxigênio (VO_2) durante 60 minutos no ZT 4 ou no ZT 5, com o objetivo de analisar o EE e QR (Dia 0). No dia seguinte (dia 1), os animais foram alocados em gaiolas individuais e divididos nos grupos AD e TR por 21 dias. Ao final do experimento (dia 21) os animais foram submetidos ao segundo registro de VO_2 , no mesmo horário do primeiro registro, e em seguida (Dia 22) eutanasiados por meio de sobredose anestésica de cetamina (240 mg/kg i.p.) e xilazina (31,5 mg/kg i.p.) (Figura 2 A).

Experimento 2: Avaliação do ritmo circadiano de T_{interna} e ALE nos grupos AD e TR.

Após a semana de habituação no biotério, os animais foram anestesiados e submetidos a uma cirurgia para implante do sensor de telemetria na cavidade abdominal (dia 0). No mesmo dia, os animais foram alocados em gaiolas individuais com livre acesso a ração e água. Um dia após a cirurgia (Dia 1), a T_{interna} e ALE começaram a ser registradas, o que perdurou até o último dia do experimento. No dia 4, após a recuperação da cirurgia, os animais foram

divididos nos grupos AD ou TR. Ao final do delineamento (dia 25) os registros de T_{interna} e ALE foram finalizados e os animais foram eutanasiados por meio de sobredose anestésica de cetamina (240 mg/kg i.p.) e xilazina (31,5 mg/kg i.p.) (Figura 2 B).

Experimento 3: Avaliação da secreção hormonal e expressão gênica nos grupos AD e TR

Após a semana de habituação no biotério, os animais foram colocados em gaiolas individuais e divididos nos grupos AD ou TR (dia 0). No dia 21, grupos de animais foram eutanasiados por decapitação no ZT 1 e no ZT 13. Foi coletado o sangue para dosagens séricas de insulina e leptina; e o fígado, para análise da expressão de RNAm dos genes de relógio (*Bmal1*, *Per1*, *RevErb α* , *Cry1* e *Cry2*) e genes do metabolismo (*Pseudoquinase tribbles 3 - TRB-3*, *glicose-6-fosfatase*, *PEPCK* e *PPAR α*) (Figura 2 C).

Experimento 4: Avaliação da tolerância à glicose nos grupos AD e TR

Após a semana de habituação no biotério, os animais foram colocados em gaiolas individuais e divididos nos grupos AD ou TR (dia 0). A partir do dia 7, os animais foram manipulados 5 vezes por semana, para habituação do procedimento de coleta de sangue pela cauda. Nesta habituação, a manipulação da cauda do animal foi realizada com o dedo indicador e polegar, no sentindo corpo-cauda, de 3 a 5 vezes por animal. No ZT 12 do dia 20, a ração dos grupos AD e TR foram removidas para que os animais permanecem em jejum por 10h. Este horário foi escolhido para coincidir com o horário de retirada da ração dos animais do grupo TR. O teste de tolerância à glicose foi realizado no ZT 22 do dia 21. No dia 23 os animais foram submetidos novamente ao jejum, iniciado no ZT 2, este horário foi escolhido para permitir que os animais do grupo TR pudessem se alimentar após o período de restrição alimentar do protocolo de dieta TR. O teste de tolerância à glicose foi realizado no ZT 12. Para o teste, coletou-se sangue da veia da cauda antes (tempo 0) e, após a aplicação intraperitoneal de glicose, a coleta foi realizada nos tempos 5, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. No dia 24 os animais foram eutanasiados por meio de sobredose anestésica de cetamina (240 mg/kg i.p.) e xilazina (31,5 mg/kg i.p.) (Figura 2 D).

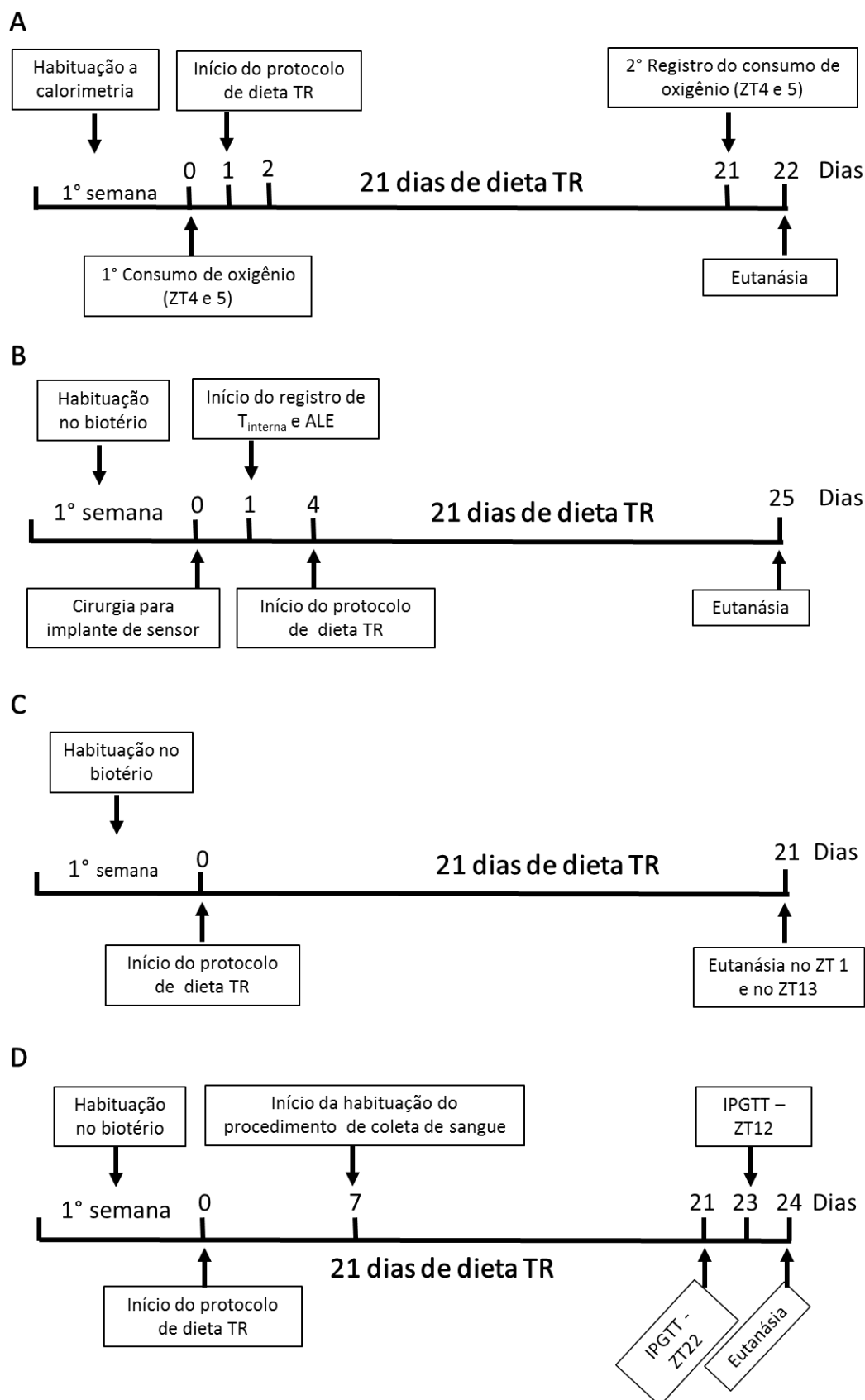


Figura 2: Linha do tempo referente aos experimentos do delineamento 1. Experimento 1 (A), experimento 2 (B), experimento 3 (C), experimento 4 (D). AD, *ad libitum*; IPGTT, teste de tolerância intraperitoneal à glicose. ZT, *Zeitgeber time*; T_{interna} , Temperatura interna; ALE, atividade locomotora espontânea; TR, tempo restrito.

4.2.2 Etapa 2

Na primeira semana do delineamento, os animais foram alocados em caixas coletivas (até 5 animais/caixa), com livre acesso a ração e água para a habituação no biotério experimental. Na segunda semana os animais do grupo TR foram subdivididos em dois grupos, Veículo (*Vehicle*) ou Resiniferatoxina (RTX) (Figura 3). Os animais foram pesados todos os dias, na primeira semana após a injeção da droga, depois disso, foi aferido o peso 2 vezes por semana. A ingesta alimentar foi aferida diariamente. Diferentes grupos de animais passaram pelos protocolos experimentais descritos a seguir.

Protocolo de Dieta em Tempo Restrito

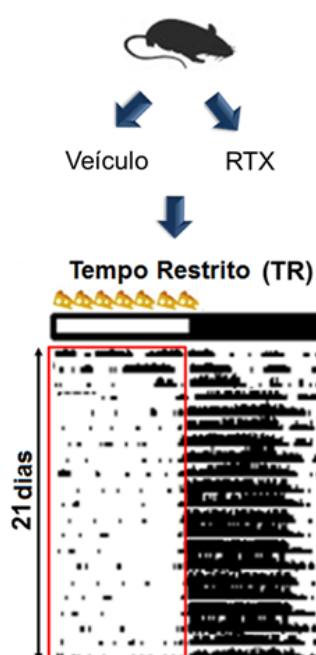


Figura 3: Ilustração do protocolo utilizado após a divisão dos grupos em *Vehicle* e RTX. Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de dieta restrita a fase de luz. RTX, resiniferatoxina.

Experimento 1: Participação do canal TRPV1 no efeito da dieta TR sobre o EE e QR.

Durante a primeira semana os animais foram habituados a caixa de calorimetria indireta, no qual permaneciam por 10 minutos, este processo foi repetido por 5 dias consecutivos. No dia 0, no ZT 4 ou no ZT 5, foi realizado o registro do VO_2 durante 60 minutos. No dia seguinte (dia 1) os animais foram anestesiados e injetados i.p com RTX (20 μ g/kg) ou com o veículo da droga e divididos nos grupos *Vehicle* ou RTX. Neste mesmo dia, foram colocados em gaiolas individuais. Após 24 h de repouso, no dia 2, iniciou-se o protocolo de

dieta TR, o que perdurou por 21 dias. Ao final do experimento (dia 23) os animais foram submetidos ao segundo registro de VO_2 , no mesmo horário do primeiro registro, e em seguida foram eutanasiados por meio de sobredose anestésica com cetamina (240 mg/kg i.p.) e xilazina (31,5 mg/kg i.p.) (Figura 4 A).

Experimento 2: Participação do canal TRPV1 no efeito da dieta TR sobre o ritmo circadiano de $T_{interna}$ e ALE.

Após a semana de habituação no biotério, os animais foram anestesiados e submetidos a uma cirurgia para implante do sensor de telemetria na cavidade abdominal (dia 0). No mesmo dia, os animais foram alocados em gaiolas individuais com livre acesso a ração e água. Um dia após a cirurgia (Dia 1), a $T_{interna}$ e ALE começaram a ser registradas, o que perdurou até o último dia do experimento. No dia 4, foram anestesiados e injetados i.p com RTX (20 μ g/kg) ou veículo da droga e divididos nos grupos *Vehicle* ou RTX. No dia seguinte (dia 5) iniciou-se o protocolo de dieta TR que perdurou por 21 dias. Ao final do delineamento (dia 26) os registros de $T_{interna}$ e ALE foram finalizados e os animais foram eutanasiados por meio de sobredose anestésica de cetamina (240 mg/kg i.p.) e xilazina (31,5 mg/kg i.p.) (Figura 4 B).

Experimento 3: Participação do canal TRPV1 no efeito da dieta TR sobre a secreção hormonal e expressão gênica.

No início da segunda semana (dia 0), os animais foram anestesiados e injetados i.p com RTX (20 μ g/kg) ou veículo da droga e divididos nos grupos *Vehicle* ou RTX, neste mesmo dia, foram colocados em gaiolas individuais. A partir do dia 1, teve início o protocolo de dieta TR em ambos os grupos *Vehicle* e RTX. No vigésimo segundo dia, grupos de animais foram eutanasiados por decapitação no ZT 1 e no ZT 13. Foi coletado o sangue para dosagens séricas de insulina e leptina; e o fígado, para análise da expressão de RNAm para os genes de relógio (*Bmal1*, *Per1*, *RevErb α* , *Cry1*, *Cry2*) e dos genes metabólicos (*TRB-3*, *glicose-6-fosfatase*, *PEPCK*, *PPAR α*) (Figura 4 C).

Experimento 4: Participação do canal TRPV1 no efeito da dieta TR sobre a tolerância à glicose.

No início da segunda semana (dia 0), os animais foram anestesiados e injetados i.p com RTX (20 µg/kg) ou com o veículo da droga e divididos nos grupos *Vehicle* ou RTX, neste mesmo dia, foram colocados em gaiolas individuais. No dia 1 todos os animais iniciaram o protocolo de dieta TR que perdurou por 21 dias. A partir do dia 8, os animais eram manipulados 5 vezes por semana, para habituação do procedimento de coleta de sangue da cauda, conforme descrito no experimento 5. No dia 22, todos os animais foram submetidos ao jejum no ZT 2. O teste de tolerância a glicose foi realizado após 10 h de jejum, no ZT 12. No dia 23, no ZT 12, os animais foram submetidos novamente ao jejum. O teste de tolerância a glicose foi realizado no ZT 22. Para o teste, coletou-se sangue da veia da cauda antes (tempo 0) e, após a aplicação intraperitoneal de glicose, o sangue foi coletado nos tempos 5, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. No dia 24, os animais foram eutanasiados por meio de sobredose anestésica de cetamina (240 mg/kg i.p.) e xilazina (31,5 mg/kg i.p.) (Figura 4 D).

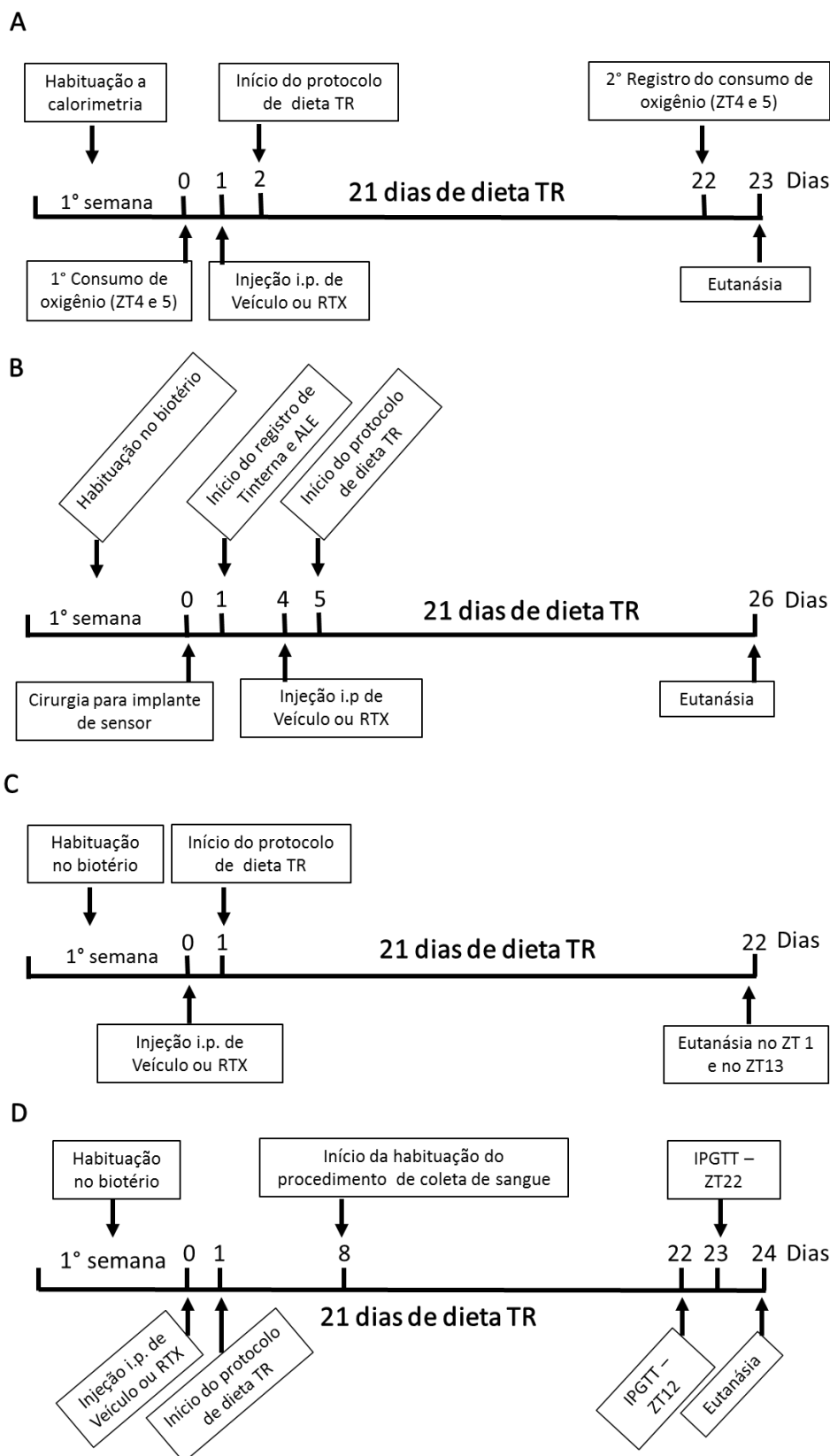


Figura 4: Linha do tempo referente aos experimentos do delineamento 2. Experimento 1 (A), experimento 2 (B), experimento 3 (C), experimento 4 (D). IPGTT, teste de tolerância intraperitoneal à glicose. ZT, *Zeitgeber time*; T_{interna}: Temperatura interna; ALE, atividade locomotora espontânea; RTX, resiniferatoxina; TR, tempo restrito.

4.3 REGISTRO DE T_{INTERNA} E ALE

A T_{interna} e a ALE dos animais foram monitoradas e registradas continuamente após a implantação do sensor de telemetria, utilizando o programa de processamento e armazenamento de dados, Vital View Software (VitalView® Data Acquisition System, Software version 4.0).

4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Para implante do sensor de telemetria, os animais foram anestesiados com cetamina (cloridrato de cetamina, Cetamin, 80 mg/kg i.p.) e xilazina (cloridrato de xilazina, Anasedan, 10,5 mg/kg i.p.). Os reflexos palpebral e interdigital dos membros pélvicos e da cauda foram verificados para avaliar a anestesia. Após a indução anestésica, o rato foi imobilizado em decúbito dorsal sobre uma plataforma, realizou-se a tricotomia da região abdominal, seguida da aplicação tópica de iodopovidona (10%) para assepsia. Cada animal recebeu um sensor de telemetria (modelo G2 E-Mitter, Mini-MitterCompany, Sun River, OR, USA) na cavidade peritoneal, por meio de uma incisão feita na região ventral, de aproximadamente 2 cm, posteriormente, foi feita uma incisão na linha Alba do músculo reto abdominal, o sensor foi introduzido e fixado junto a parede interna do músculo. Foram realizadas suturas de padrão interrompido simples para síntese do músculo abdominal e da pele e, novamente foi aplicado no local da incisão, a solução de iodopovidona (10%). Após a cirurgia, os animais receberam uma injeção de 0,2 mL de antibiótico i.m., 0,1 mL em cada pata traseira (Pentabiótico Veterinário®, FortDodge Saúde Animal Ltda; 48000 UI – Pentabiótico veterinário) e um injeção s.c. na região torácica dorsal, na dose de 1,1 mg/ Kg de peso corporal do analgésico e anti-inflamatório (Banamine®, 50 mg/ml, Schering-Plough). Cada caixa com um animal foi posicionada sobre uma placa receptora (ER-4000 Energizer/Receiver, Mini-MitterCompany, Sun River, OR, USA) conectada em série a um computador pessoal contendo o software de aquisição de dados. Os registros da T_{interna} e da ALE iniciaram assim que os animais foram colocados sobre os receptores.

4.5 CALORIMETRIA INDIRETA

A habituação à caixa metabólica ocorreu durante 5 dias consecutivos, e cada animal foi acondicionado à caixa por 10 minutos. No dia do teste, o animal

foi colocado dentro da caixa, onde permaneceu em repouso por 60 minutos. O VO_2 foi avaliado utilizando um calorímetro de fluxo aberto indireto (Panlab, Harvard Apparatus, Spain) e continuamente registrado por uma hora através de um sistema informatizado (Metabolism, Panlab, Harvard Apparatus, Espanha). A partir do VO_2 e VCO_2 registrado foram calculados o EE e o QR. O EE é a Kcal consumida por unidade de tempo, neste estudo expressa em Kcal/Kg/dia^{0.75}. O QR é a razão entre o volume de CO_2 e o de O_2 .

4.6 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE

O teste de tolerância intraperitoneal à glicose (IPGTT) foi realizado nos animais em jejum de 10 horas sem uso de anestesia. Foi aplicado uma solução tópica de iodopovidona (10%) para antisepsia na ponta da cauda dos animais, posteriormente houve a secção da cauda para a coleta de 2 gotas de sangue. A primeira gota foi descartada e a segunda utilizada para determinação da glicemia no tempo 0. Imediatamente após a retirada do sangue, foi injetada, i.p., a solução de D-glicose 40% (1,5 g/ kg de peso corpóreo) e amostras de sangue foram posteriormente coletadas aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, seguindo o mesmo procedimento de coleta do tempo 0. Para aferição da glicemia utilizou-se o glicosímetro (Accu-Chek Perfoma®, Roche). Cada animal foi submetido a dois IPGTT, em dois horários diferentes, no ZT 12 e no ZT 22, estes horários foram escolhidos para garantir um jejum máximo de 10 h e permitir que os animais submetidos ao protocolo de dieta TR pudessem se alimentar antes do período de jejum.

4.7 DESSENSIBILIZAÇÃO DO CANAL TRPV1

A dessensibilização do canal TRPV1 foi realizada com uma injeção i.p de RTX (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Sigma-Aldrich, E.U.A.) sob anestesia. O anestésico utilizado foi uma mistura de cetamina (80 mg/ kg i.p.) e xilazina (10 mg/ kg i.p.). Dogan e colaboradores (2004) demonstraram que o RTX, extraído da *Euphorbia poissonii*, nesta concentração, dessensibilizam os nervos intra-abdominais.

Para preparação da droga, foi feito uma da solução de estoque (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e para isso, foi diluído 1mg do RTX em 10 mL de álcool etílico absoluto, esta solução foi armazenada a -80°C . No dia do experimento, a solução de

estoque foi diluída em salina estéril, a fim de obter a concentração desejada, sendo mantida em gelo e ao abrigo de luz durante todo o procedimento. O grupo que recebeu o veículo da droga, que corresponde a 20 % de álcool etílico dissolvido em salina estéril, foi considerado como controle. O volume injetado em cada animal foi de 1 mL/ kg.

4.8 DOSAGENS SÉRICAS

As concentrações séricas foram mensuradas por ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), utilizando kit comercial para insulina (EMD Millipore Corporation® – EZRMI-13K, USA) e para leptina (kits R&D Systems - DY498, USA), seguindo as informações do fabricante.

4.9 EXTRAÇÃO DE RNA, REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE E PCR QUANTITATIVO EM TEMPO-REAL (qPCR)

4.9.1 Extração de RNA

O RNA total do fígado foi extraído seguindo as instruções do TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, E.U.A.). Foi utilizado 70 a 80 µg do fígado que havia sido congelado e armazenado a -80 °C, após pesagem o tecido foi homogeneizado com 1 mL de TRI Reagent® em tubo livre de DNase/RNase de 2 mL, previamente autoclavados. Após 5 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 200 µL de 1-Bromo-3-cloropropano (Aldrich, Japão), esta solução foi agitada em vortex por 15 segundos e mantida por 10 minutos em temperatura ambiente. Realizou-se uma centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm à 4 °C, e o sobrenadante contendo o RNA, foi transferido para um tubo de 1,5 mL livre de DNase/RNase autoclavado, no qual adicionou-se 650 µL de isopropanol, com uma suave mistura do conteúdo. Após 10 minutos em temperatura ambiente, seguiu-se outra centrifugação de 12.000 rpm à 4 °C por 35 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 1,3 mL de etanol 75% ao precipitado seguido de vortexização por 15 segundos e centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm à 4 °C, este procedimento foi realizado 2 vezes. Colocou-se as amostras *overnight* a -20 °C seguindo de centrifugação a 12.000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi descartado e, para secar o *pellet*, os tubos foram deixados por 5 a 10 minutos abertos e invertidos. O RNA foi ressuspendido em

80 µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (H₂O DEPC, Life Technologies, E.U.A.) e tratado com DNase (kit turbo-DNA-free™, Life Technologies, E.U.A.).

Para o tratamento com DNase, as amostras foram diluídas para ter um volume final de 20 µL, numa concentração média de 0,5 µg/µL de RNA. Foi adicionado 10% desse volume de tampão para DNase I e 1 µL de DNase I (Ambion). A seguir, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e foi acrescentado 10% do volume de reagente de inativação, seguido de vortexização por 10 segundos, com incubação de 2 minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente, houve centrifugação a 12.000 rpm à 4 °C por 2 minutos, o sobrenadante foi retirado e armazenado à -80 °C em tubos de 500 µL.

As concentrações de RNA foram determinadas por leitura da absorbância a 260 nm em nano-espectrofotômetro (Nanodrop, E.U.A.).

4.9.2 Transcrição reversa

A reação de transcriptase reversa foi realizada em microtubos livres de DNase/RNase de 300 µL previamente autoclavados. A reação foi realizada utilizando-se 1 µg de RNA total. Utilizou-se 1 µL de *random primers* (100 ng/µL, Life Technologies), 1 µL de dNTP (10 mM, Life Technologies) e H₂O DEPC para um volume final de 13,75 µL. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65 °C e à 4 °C por 1 minuto. Após incubação foi adicionada, à solução 4 µL de tampão de PCR 5X, 1 µL de DTT (0,1M), 1 µL de inibidor de ribonuclease (40 U/µL, Life Technologies) e 0,25 µL da enzima Superscript III RT (200 U/ µL, SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Life Technologies), finalizando um volume de 20 µL por reação. Posteriormente as amostras foram incubadas à 25 °C por 5 minutos; 50 °C por 50 minutos e 70 °C por 15 minutos. O cDNA resultante do processo foi armazenado à -20 °C e foi utilizado nas reações subsequentes de qPCR.

4.9.3 qPCR

O qPCR foi realizado em placas de 96 poços, utilizando iTaq™ universal SYBR® Green supermix (BioRad, E.U.A). Os ensaios foram realizados em um termociclador Abi-Prism (Life technologies, E.U.A) ou CFX96 (Bio-rad Laboratories Hercules – Califórnia - E.U.A.), para selecionar o ciclo de

temperatura, seguiu-se as instruções do fabricante do Supermix: 1 ciclo a 95 °C por 30 segundos seguido por 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C e, 30 segundos a 60 °C, com posterior análise da curva de *Melting*.

Foi utilizado par de *primers* específicos para a espécie, que foram feitos com base nas sequências obtidas a partir do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>), desenhados e sintetizados pela empresa IDT (Coralville, IA, EUA) (Tabela 1). O RNA ribossômico 18S foi usado como normalizador dos ensaios, com *primers* desenhados em região altamente conservada. As soluções para cada gene continham: os *primers* antisense e senso (300nM para os genes de interesse e 50nM para o 18S), o iTaq™ universal SYBR® Green supermix e água livre de nuclease (Nuclease-Free Water, Ambion, E.U.A.).

O número de ciclos equivalente à interseção da curva com o limiar, sendo denominado de ciclos de temperatura (CT) foi utilizado para a análise do RNAm relativo. Os dados foram analisados pelo método $\Delta\Delta CT$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O ΔCT foi encontrado pela diferença do valor médio das duplicatas do gene de interesse e do normalizador (18S). A maior média de ΔCT do grupo AD ou *Vehicle* foi utilizada como calibrador. O $\Delta\Delta CT$ foi obtido a partir da subtração de cada valor de ΔCT pela média escolhida do ΔCT . Este valor foi utilizado como uma exponencial negativa na base 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados no qPCR e os números de acesso da sequência gênica para obtenção dos *primers*.

18s	Forward: 5' - CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA - 3'	
	Reverse: 5' - GCT GGA ATT ACC GCG GCT - 3'	
Per1	Forward: 5'- ATG CAG AAA CAA CAG CCA CGG TTC - 3'	NM_001034125.1
	Reverse: 5' - TGG CCA GGA TCT TGA ACA CTG CTA - 3'	
RevErba	Forward: 5' - ACA GCT GAC ACC ACC CAG ATC - 3'	NM_001113422
	Reverse: 5 - 'CAT GGG CAT AGG TGA AGA TTT CT - 3'	
Bmal1	Forward: 5' - AGG CCT TCA CTG GAA TGG TGC TAT - 3'	NM_024362.2
	Reverse: 5'- TGA CTG GCC TGG AAC TTG CTA CAT - 3'	
Cry1	Forward: 5' - CCT TCT AAT CCT AAT GGG AAC G - 3'	NM_198750.2
	Reverse: 5' - ACC ACT TCC TTG AGA GCA GTT T - 3'	
Cry2	Forward: 5'-TTC CCA AGG CTT TTC AAG GAA T -3'	NM_133405.2
	Reverse: 5'- GCC ATC TTC ATA ATG GCT GCA T - 3'	
PPARα	Forward: 5'- TAC CAC TAT GGAGTC CAC GCA GCA TGT - 3'	NM_013196.1
	Reverse: 5' - TTG CAG CTT CGA TCA CAC TTG TCG - 3'	
TRB-3	Forward: 5'-TGC GTC GCT TTG TCT TCA GCA ACT-3'	NM_144755.2
	Reverse: 5'- ATC CAG TCA TCA CGC AGG CAT CTT-3'	
Glicose- 6- fosfatase	Forward:5' - CGA CTC GCT ACC TCC AAG TG - 3'	L37333.1
	Reverse:5' - TCC CTG GTC CAG TCT CAC AG - 3'	
PEPCK	Forward:5' - CAT CCG CAA GCT GAA GAA ATA TG - 3'	NM_198780.3
	Reverse:5'- GTC TCT CTG CTC TTG GGT AAT - 3'	

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro-padrão da média. O intervalo de confiança foi de 0,05. O teste de normalidade utilizado foi Shapiro-Wilk. O programa GraphPadPrism versão 6.0 (San Diego, CA, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas e confecção dos gráficos. O Sigma Plot versão 11.0 (San Jose, CA, EUA) foi utilizado para análises estatísticas dos dados de periodograma, massa corporal, ingesta alimentar, T_{interna} e ALE.

A comparação dos resultados de massa corporal e ingesta alimentar entre os diferentes grupos e tempos estudados foi realizada por ANOVA *two-way* de medidas repetidas, seguida do teste de Tukey. A eficiência alimentar foi calculada através da razão do delta de peso e ingesta alimentar. O delta de peso foi calculado pela diferença entre massa corpórea final e inicial. Os dados de eficiência alimentar, delta de peso corporal, VO_2 , EE e QR foram analisados por teste *t de Student*.

Para a comparação entre os diferentes grupos e tempos referentes aos valores de T_{interna} e ALE foi utilizada ANOVA *two-way* de medidas repetidas, seguida do teste de Tukey. Os gráficos de T_{interna} e ALE foram feitos com a média por hora ao longo das 24 horas de todos os dias de registro.

Para a construção dos actogramas e análise do *onset* e da acrofase utilizou-se o programa *ClockLab* (Actimetrics, IL, USA) a partir dos registros obtidos da telemetria. Os períodos dos ritmos de T_{interna} e ALE foram calculados pelo teste estatístico Periodograma Qui-quadrado de Solokove e Bushell (1978), utilizando o *ClockLab*. A análise dos valores de amplitude de cada ritmo, representado no periodograma, foi feita utilizando ANOVA *two-way* de medidas repetidas, seguidas do teste de Tukey.

Para cada dia de registro de telemetria foram obtidos os valores em horas de *onset* e acrofase de cada animal. Estes valores foram convertidos em minutos, e em seguida em ângulo através do programa MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA), a partir deles, obteve-se a média angular calculada no MATLAB, as quais foram expressas em um gráfico polar. Este gráfico mostra a uniformidade destes resultados (*onset* e acrofase). Esta uniformidade foi testada pela análise de Rayleigh de estatísticas circulares, que se baseiam no cálculo do valor de z ($z = n \cdot r^2$, onde n representa o número de dados e r representa a raiz

do somatório da média de seno e cosseno dos ângulos). O valor de z foi representado no gráfico polar pelo comprimento do vetor. Valores de z calculados maiores que valores mostrados na tabela z indicam uma tendência ao agrupamento da variável em uma faixa de horário (REFINETTI; CORNÉLISSEN; HALBERG, 2007). Para a comparação do *onset* ou da acrofase entre os grupos experimentais, realizou-se a média aritmética da média angular obtidas em cada dia de registro, estes valores foram analisados pelo *t Student*.

As análises dos dados de insulina, leptina e da área sobre a curva do IPTTG foram feitas utilizando teste *t de Student*.

5 RESULTADOS

A dieta TR não interferiu com o peso corporal dos animais ao longo do protocolo, exceto no dia 13, quando os animais TR apresentaram uma menor massa corporal (Figura 5 A). Por outro lado, o cálculo da variação de peso (peso final – peso inicial) mostrou que os animais do grupo TR tiveram um menor ganho de peso corporal total (Figura 5 B). O grupo TR também apresentou uma menor ingesta alimentar quando comparado ao grupo AD na maioria dos dias analisados (Figura 5 C), porém a eficiência alimentar não diferiu entre os grupos (Figura 5 D). Neste estudo avaliou-se o metabolismo energético através da medida do VO_2 , os animais do grupo TR tiveram uma redução no VO_2 e no EE (Figura 5 E e G). Já com relação ao QR, o grupo TR apresentou um maior índice (Figura 5 F).

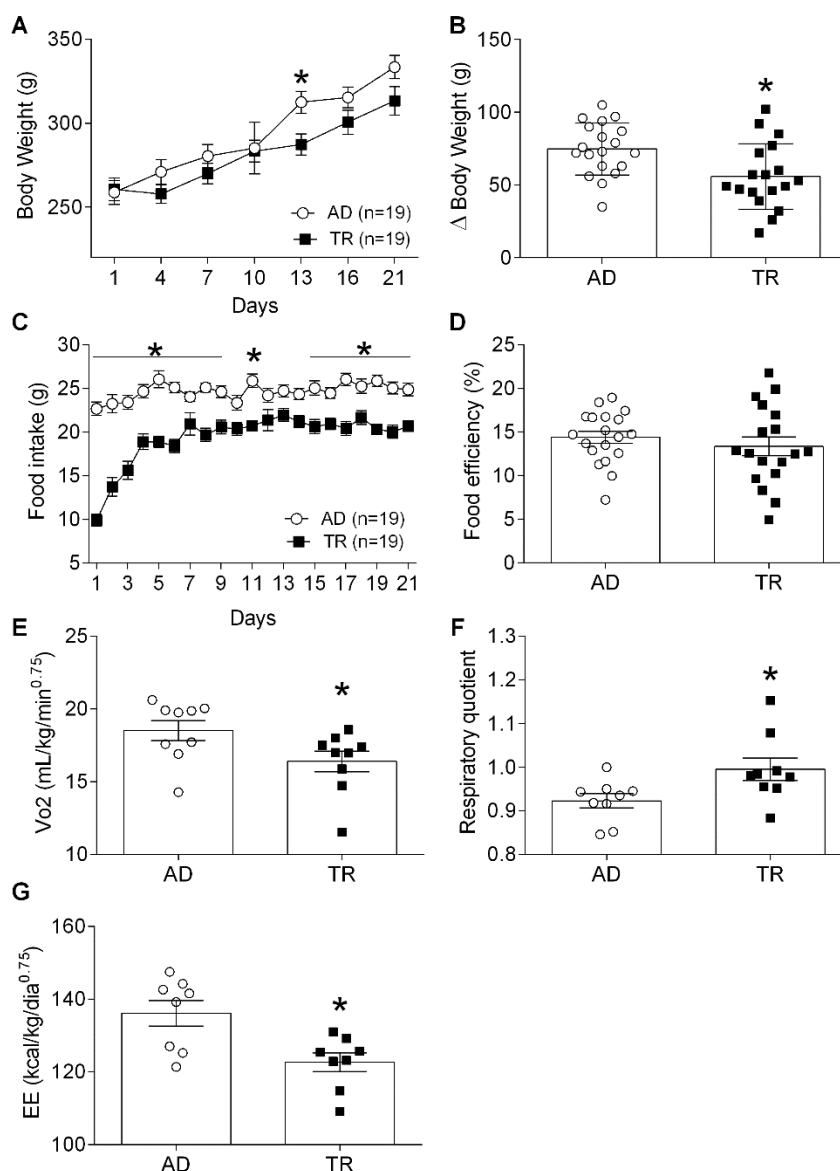


Figura 5: Efeito da dieta TR sobre a massa corporal ao longo dos 21 dias de protocolo (A), o ganho de peso corporal (B), a ingestão alimentar (C), a eficiência alimentar (D), o volume de oxigênio consumido (VO_2 , E), o quociente respiratório (F) e gasto energético (EE, G) dos animais do grupo AD (círculo branco) e TR (quadrado preto). Dados expressos como média $\pm$ EPM. Painel A e C, * $p < 0,05$ versus AD por ANOVA *two-way* seguido do teste de Tukey. No painel B, E- G, * $p < 0,05$ versus AD por teste *t Student*. *Ad libitum*; TR, dieta em tempo restrito.

Os valores máximos e mínimos de $T_{interna}$ dos animais do grupo AD foram durante a fase de escuridão e de luz, respectivamente (Figura 6 A). A dieta TR aumentou a $T_{interna}$ no início da fase de luz e reduziu a partir do ZT 17 na fase de escuridão (Figura 6 A). Todavia, animais de ambos os grupos, AD e TR, continuaram apresentando um perfil circadiano de $T_{interna}$ (Figura 6 B). Já os

animais do grupo TR mostraram também oscilações com períodos de 12 e 36 h (Figura 6 B). Estes valores coincidem com o tempo de exposição a pista da dieta TR. Além disso, é interessante notar que a oscilação circadiana da T_{interna} tem uma amplitude reduzida, no grupo TR, em relação ao grupo AD (Figura 6 B).

A acrofase da T_{interna} dos animais AD acontece próximo ao ZT 17. A dieta TR adiantou o horário de acrofase de T_{interna} para aproximadamente o ZT 13, ou seja, promoveu uma antecipação de aproximadamente 4 h (Figura 6 C e E). O horário de *onset* do ritmo de T_{interna} dos animais foi por volta do ZT 12, e a dieta TR adiantou esta variável em torno de 1 h, sendo assim, o *onset* do ritmo da T_{interna} , no grupo TR, ocorreu entre ZT 10 e ZT 11, ainda na fase de luz do ciclo (Figura 6 D e F). O teste de uniformidade (Rayleigh) apontou que ambos os grupos, AD e TR, apresentaram horários de acrofase e *onset* do ritmo de T_{interna} dentro de uma faixa estreita de variação (6 C e D).

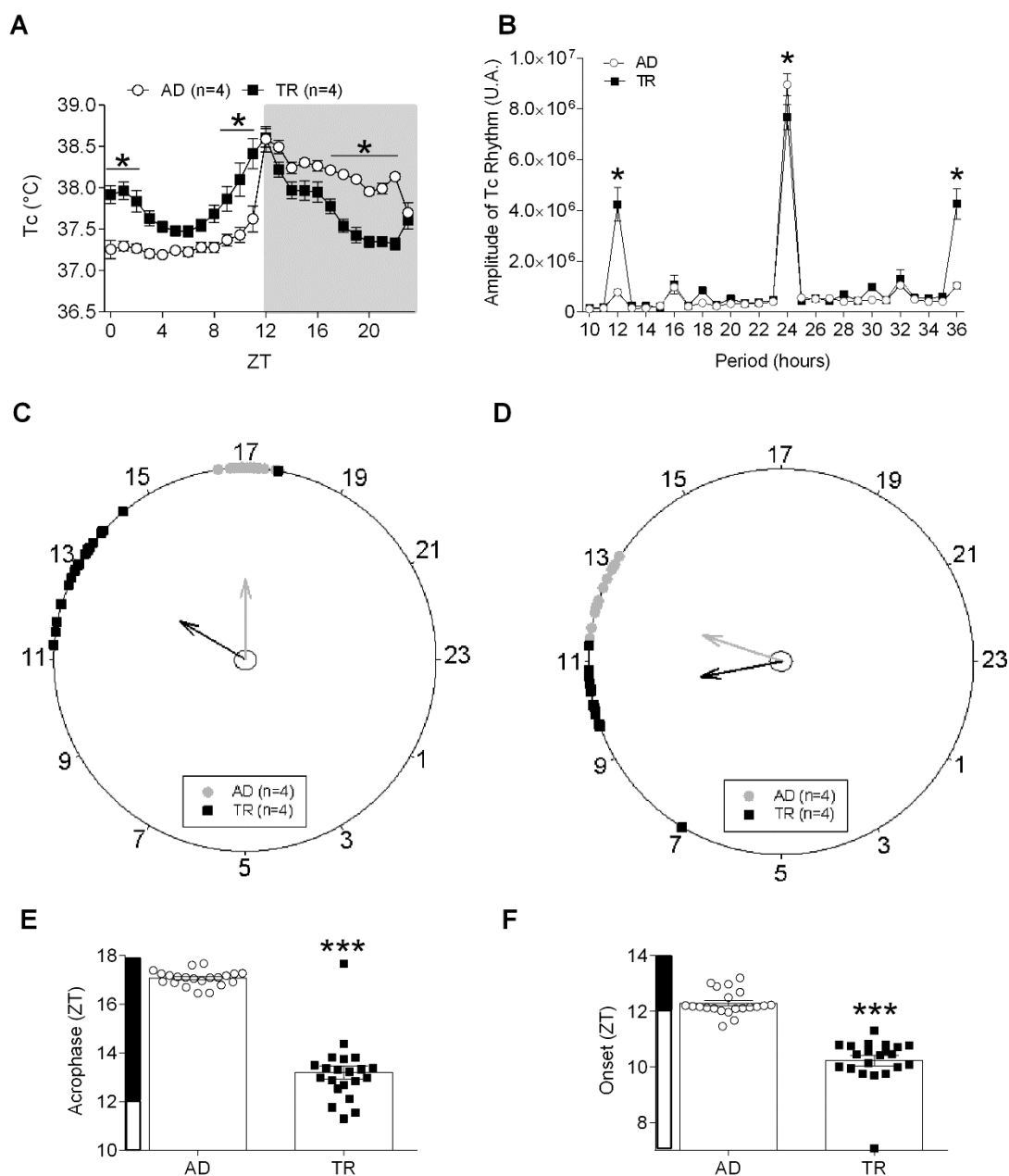


Figura 6: Efeito da dieta TR sobre a variação circadiana da T_{interna} (A), dados mostrados como a média por ZT de todos os 21 dias de protocolo. Amplitude da T_{interna} (B) durante o protocolo de dieta TR. Análise de distribuição do registro da acrofase (C) e *onset* (D), as setas apontam para a média angular da distribuição, e o seu tamanho representa o valor de z calculado (teste de Rayleigh). O círculo localizado dentro dos gráficos polares indica o valor tabelado de z . O horário em ZT da acrofase (E) e *onset* (F) durante o protocolo de dieta TR. Dados estão expressos nos painéis A, B, E e F como média $\pm$ EPM. Painel A e B, * $p < 0,05$ versus AD por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de Tukey. Painel E e F, *** $p < 0,0001$ versus AD por teste *t* de *Student*. AD, *Ad libitum*; TR, dieta em tempo restrito; ZT, *Zeitgeber time*. Retângulo branco representa a fase de luz e retângulo preto representa a fase de escuridão no biotério. AD está representado com círculos brancos nos painéis A, B, E, F; e com círculo cinza no painel C e D. TR está representado com quadrado preto.

Os animais AD apresentaram baixa atividade locomotora durante a fase de luz e alta durante a fase de escuridão (Figura 7 A). Semelhante ao resultado encontrado para T_{interna} , os animais submetidos ao protocolo de dieta TR alteraram este perfil de ALE, apresentando um ritmo bimodal. Os animais TR apresentaram um aumento de ALE no início e ao final da fase de luz e uma redução significativa da atividade após a metade da fase de escuridão (Figura 7 A). Este perfil rítmico de ALE está representado pelos actogramas da figura 7 C e D.

Nos animais AD, a análise de Qui-quadrado, mostrado no periodograma, apontou uma oscilação de ALE com um período de 24 h (Figura 7 B). De forma interessante, os animais TR apresentaram também oscilações de ALE com períodos de 12 e 36 h, o que coincide com o tempo de exposição à pista da dieta TR (Figura 7 B). A amplitude da oscilação de ALE com período de 24 h mostrou-se reduzida nos animais TR quando comparada aos animais AD (Figura 7 B). Nos animais AD, a acrofase do ritmo de ALE está próxima do ZT 18, entretanto, no grupo TR, a acrofase avançou 2 h, passando a ocorrer aproximadamente no ZT 16 (Figura 7 E e G). O *onset* do ritmo de ALE também foi alterado pela dieta TR; os animais TR anteciparam o início do ritmo de ALE para aproximadamente o ZT 10, enquanto nos animais AD, este início aconteceu em torno do ZT 12 (Figura 7 F e H). Semelhante ao observado para a T_{interna} , o teste de uniformidade (Rayleigh) apontou que ambos os grupos, AD e TR, apresentaram uma faixa estreita de variação para os horários de acrofase e *onset* do ritmo de ALE (7 E e F).

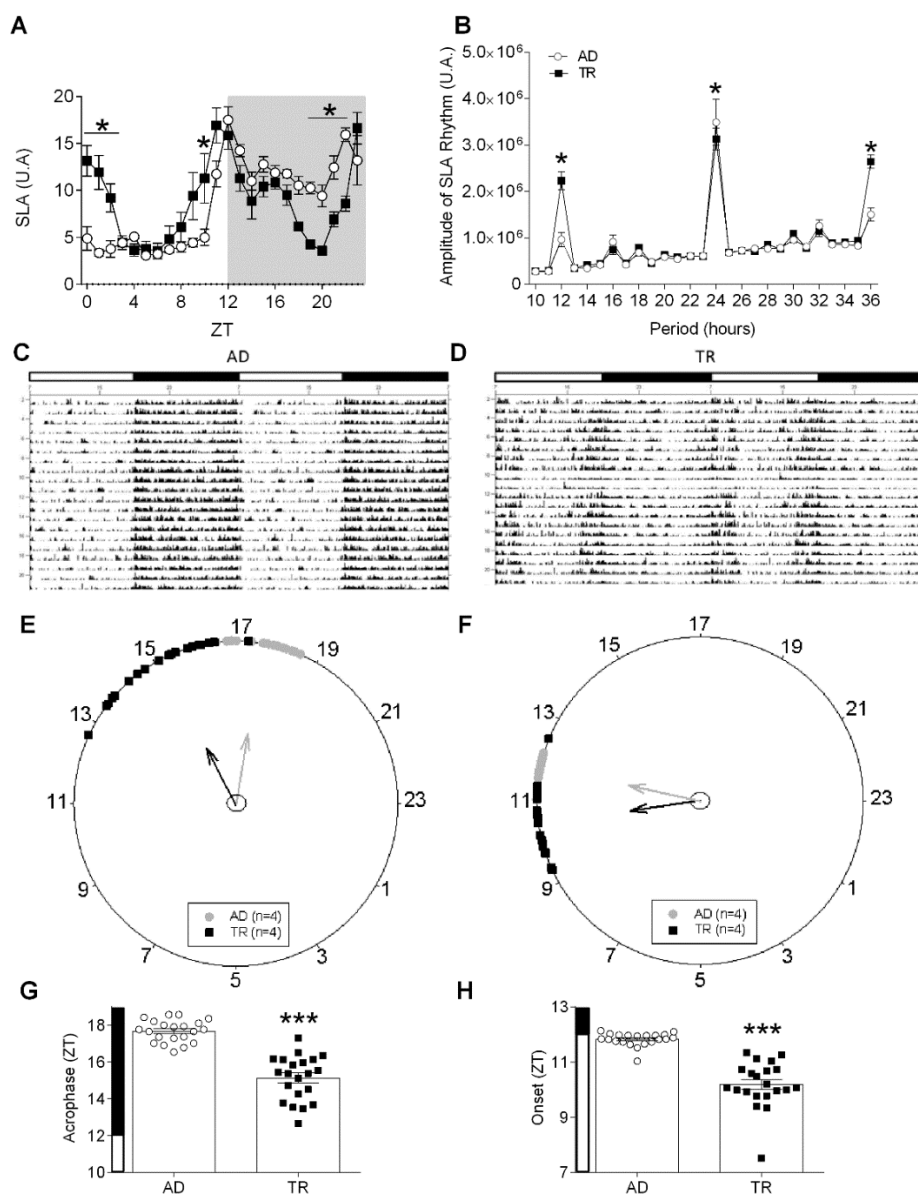


Figura 7: Efeito da dieta TR sobre a variação circadiana da ALE (SLA, A), dados mostrados como a média por ZT dos 21 dias de protocolo. Amplitude da ALE (B) durante o protocolo de dieta TR. Actograma representativo de um animal do grupo AD (C) e de um animal do grupo TR (D). Análise de distribuição do registro da acrofase (E) e onset (F), as setas apontam para a média angular da distribuição, e o seu tamanho representa o valor de z calculado (teste de Rayleigh). O círculo localizado dentro dos gráficos polares indica o valor tabelado de z . O horário em ZT da acrofase (G) e onset (H) durante o protocolo de dieta TR. Dados estão expressos nos painéis A, B, G e G como média $\pm$ EPM. Painel A e B, * $p < 0,05$ versus AD por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de Tukey. Painel G e H, *** $p < 0,0001$ versus AD por teste *t* de Student. AD, *Ad libitum*; ALE, atividade locomotora espontânea; TR, dieta em tempo restrito; ZT, *Zeitgeber time*. Retângulo branco representa a fase clara e retângulo preto representa a fase escura do ciclo de luz do biotério. AD está representado com círculos brancos nos painéis A, B, G e H; e com círculo cinza no painel E e F. TR está representado com quadrado preto.

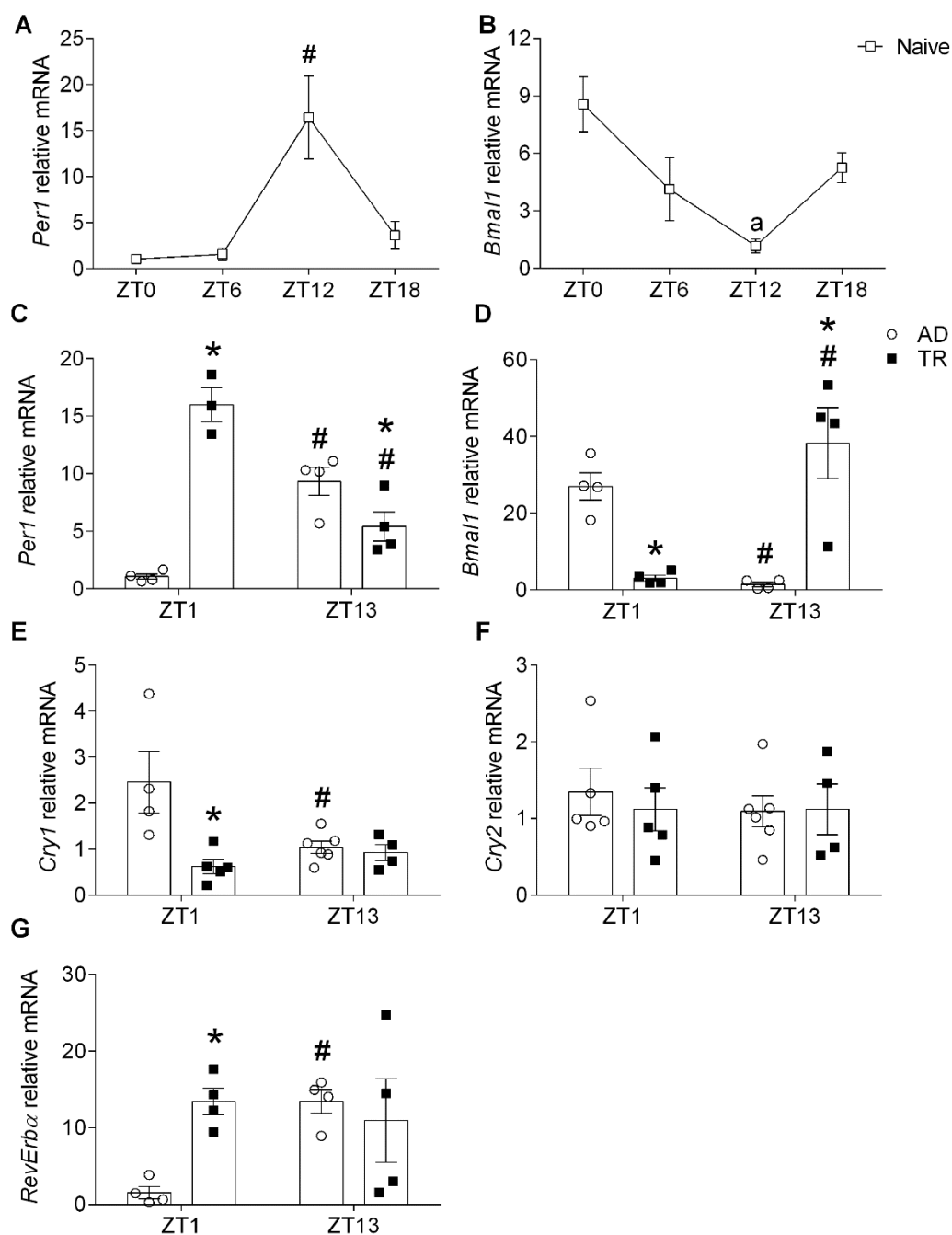


Figura 8: Perfil temporal da expressão dos genes *Per1* (A) e *Bmal1* (B) no fígado de animais *naive*. Efeito da dieta TR sobre a expressão dos genes de relógio, *Per 1* (C) *Bmal1* (D), *Cry1* (E), *Cry2* (F), *RevErbα* (G) no fígado dos animais do grupo AD (círculo branco) e TR (quadrado preto). Dados estão expressos como média $\pm$ EPM. Painel A, #, $p < 0,05$ versus todos os outros ZT. Painel B, a, $p < 0,05$, versus ZT0 por ANOVA one-way seguido de teste Tukey. Painéis C - G * $p < 0,05$ no mesmo ZT; #, $p < 0,05$ versus ZT1 para o mesmo grupo, por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de Tukey. AD, *Ad libitum*; TR, dieta em tempo restrito; ZT, *Zeitgeber time*.

Os animais do grupo *Naive*, ou seja, que não foram submetidos a nenhuma manipulação até o momento da eutanásia, apresentaram uma variação temporal na expressão dos genes de relógio *Per1* e *Bmal1* no fígado, com perfis opostos. Estes animais tiveram um aumento da expressão do gene *Per1* no ZT12, enquanto, neste mesmo horário, mostraram uma redução da expressão de *Bmal1* (Figura 8 A e B). Estes resultados orientaram a escolha do horário da coleta do fígado nos protocolos experimentais utilizados neste estudo. Dessa forma, os genes de relógio e do metabolismo foram analisados em dois horários, no início da fase de luz e no início da fase de escuridão. A dieta TR afetou a expressão do gene *Per1*, de tal maneira que os animais AD mostraram um valor aumentado no ZT 13 em relação ao ZT 1, enquanto, este aumento foi observado no ZT 1 nos animais TR (Figura 8 C). De forma similar, a dieta TR alterou o perfil da expressão de *Bmal1*; um aumento da expressão no ZT1 foi observado no grupo AD e, quando os animais foram submetido à dieta TR, este aumento aconteceu no ZT 13 (Figura 8 D). Os animais AD mostraram variações temporais na expressão do gene *Cry1*, com valores aumentados de RNAm no ZT 1 quando comparados aos valores encontrados no ZT 13. A dieta TR reduziu a expressão do gene *Cry1* no ZT 1, de tal maneira que foram abolidas as variações temporais na expressão deste gene (Figura 8 E). Por outro lado, não houve variação temporal na expressão do gene *Cry2* em nenhum dos grupos analisados (Figura 8 F). E em relação ao gene *RevErb α* , o grupo AD apresentou valores aumentados no ZT 13 comparado ao ZT 1 e a dieta TR aboliu esta variação temporal (Figura 8 G).

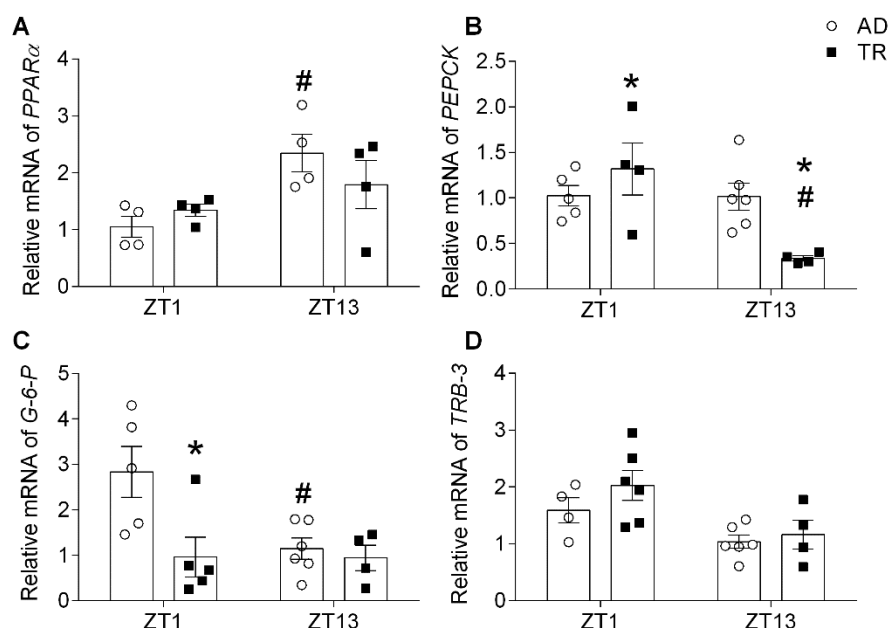


Figura 9: Efeito da dieta TR sobre a expressão de genes relacionados a regulação do metabolismo energético: *PPAR α* (A), *PEPCK* (B), *Glicose-6-fosfatase* (G-6-P; C), *TRB-3* (D) no fígado dos animais do grupo AD (círculo branco) e TR (quadrado preto). Dados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ no mesmo ZT; #, $p < 0,05$ versus ZT1 para o mesmo grupo, por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de Tukey. AD, *Ad libitum*; TR, dieta em tempo restrito; ZT, *Zeitgeber time*.

Os genes metabólicos também alteraram seu perfil de expressão temporal após o protocolo de dieta TR. A expressão do gene *PPAR α* foi maior no ZT 13 comparada ao ZT 1 no grupo AD (Figura 9 A). A dieta TR reduziu os níveis de RNAm do *PPAR α* no ZT 13 para valores similares aos encontrados no ZT 1, abolindo, dessa forma, a variação temporal da expressão deste gene (Figura 9 A). Não houve variação temporal na expressão do gene *PEPCK* no fígado dos animais AD (Figura 9 B). Por outro lado, a expressão deste gene foi maior no ZT 1 no fígado dos animais do grupo TR quando comparado ao ZT 13 (Figura 9 B). Além disso, ao comparar a expressão do gene *PEPCK* entre os grupos por horário, os animais TR mostraram um aumento na expressão no ZT 1 e uma redução no ZT 13 quando comparado com o grupo AD (Figura 9 B).

A expressão do gene *glicose-6-fosfatase* mostrou-se aumentada no ZT 1 quando comparada ao ZT13 no fígado de animais AD. A dieta TR reduziu os níveis de RNAm para valores similares aos encontrados no ZT 13, abolindo, dessa forma a variação temporal deste gene no grupo TR (Figura 9 C). Não houve variação na expressão do gene *TRB-3* entre os ZTs estudados, e, a dieta

TR não afetou os níveis de RNAm observados em ambos os horários (Figura 9 D).

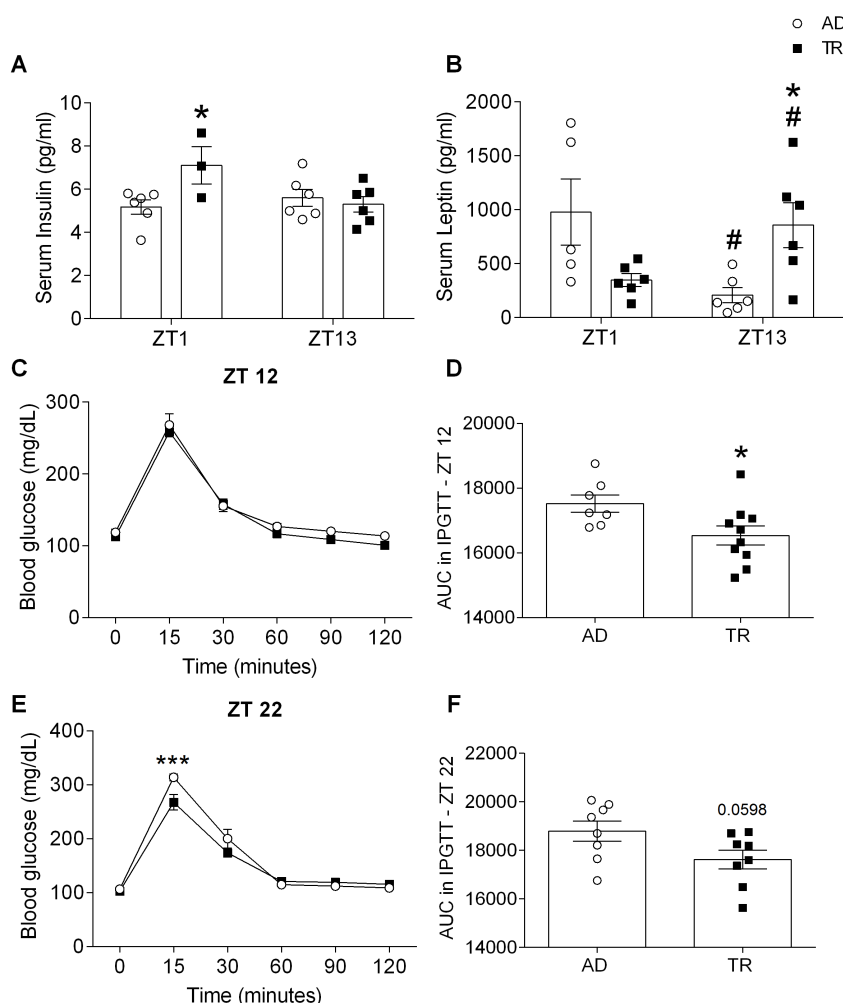


Figura 10: Efeito da dieta TR sobre as concentrações séricas de insulina (A) e leptina (B) e sobre a tolerância à glicose (C-F). Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (IPGTT) foi realizado no ZT 12 (C) e no ZT 22 (E). Área sobre a curva calculada (AUC) a partir do teste no ZT12 (D) e no ZT 22 (F). Dados estão expressos como média $\pm$ EPM. Painel A e B, * $p < 0,05$ no mesmo ZT; #, $p < 0,05$ versus ZT1 para o mesmo grupo por teste *t Student*. Painel D, * $p < 0,05$ por teste *t Student*. Painel E, *** $p < 0,001$ versus AD por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de Tukey. Painel F, o valor de *p* calculado pelo teste *t Student* é apresentado sobre a barra do grupo TR. AD, *Ad libitum*; TR, dieta em tempo restrito; ZT, *Zeitgeber time*.

Os níveis séricos de insulina foram similares entre os ZT 1 e ZT 13 no grupo AD (Figura 10 A). A dieta TR aumentou os níveis de insulina no ZT 1 (Figura 10 A). Por outro lado, os níveis séricos de leptina mostraram-se aumentados no ZT 1 quando comparado ao ZT 13 no grupo AD (Figura 10 B). A dieta TR reduziu

os valores de leptina no ZT 1 e aumentou no ZT 13, gerando um perfil temporal inverso àquele observado nos animais AD (Figura 10 B).

Os testes de tolerância à glicose revelaram que os animais TR tiveram uma menor AUC no ZT 12 e uma tendência a redução no ZT 22 ($p = 0,0598$, Figura 10 D e F). Nos dois testes, os animais de ambos os grupos, AD e TR, responderam com um aumento da glicemia após 15 minutos de injeção, atingindo valores iguais 60 minutos depois do início do teste (Figura 10 C e E).

A dessensibilização abdominal do canal TRPV1 não foi capaz de afetar a massa e o ganho de peso corporal, a ingesta alimentar, a eficiência alimentar e nem tão pouco os parâmetros relacionados ao metabolismo energético (Figura 11).

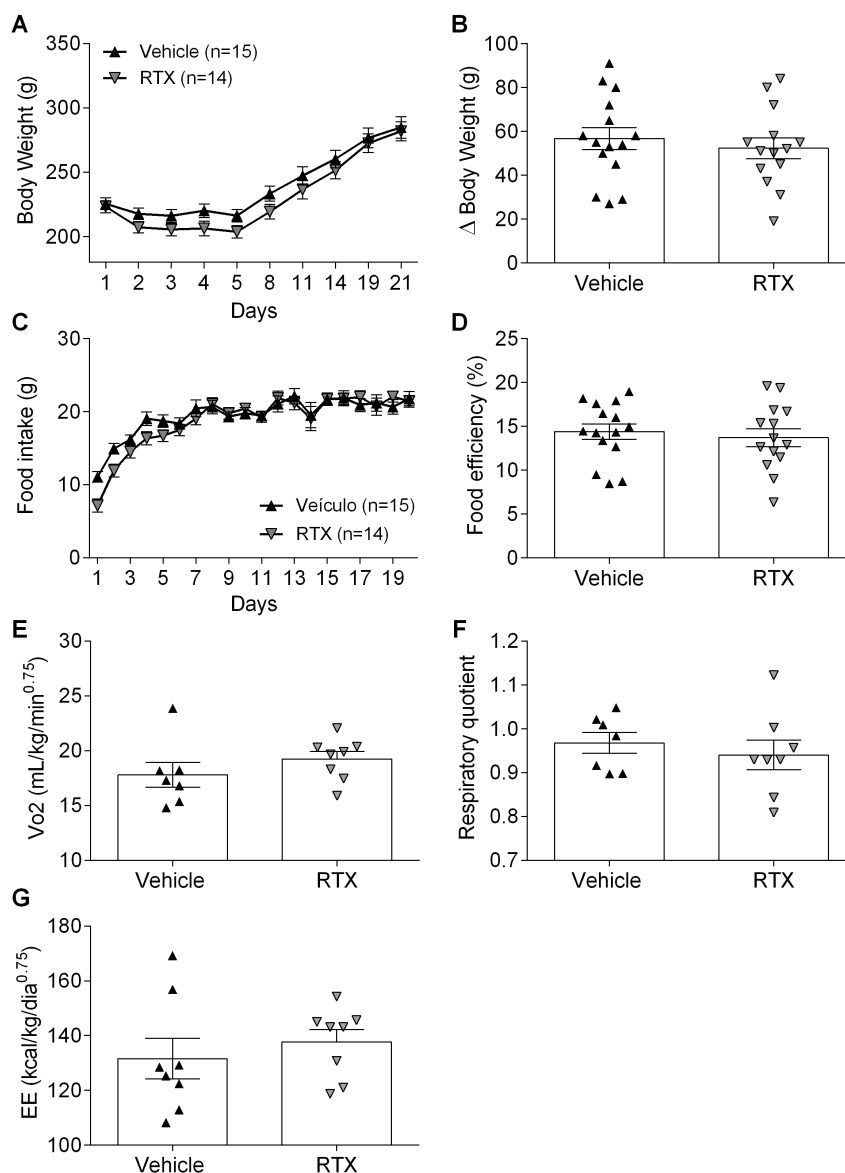


Figura 11: Efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre a massa corporal ao longo dos 21 dias de protocolo (A), o ganho de peso final (B), ingestão alimentar (C), eficiência alimentar (D), consumo de oxigênio (VO_2 , E), quociente respiratório (F) e gasto energético (EE, G) dos animais do grupo veículo (*Vehicle*, triângulo preto) e dessensibilizado com resiniferatoxina (RTX, triângulo invertido cinza). Dados expressos como média $\pm$ EPM.

Os animais do grupo RTX apresentaram uma variação temporal de $T_{interna}$ semelhante ao grupo *Vehicle*, entretanto, a dessensibilização do canal TRPV1 causou um aumento da $T_{interna}$ ao longo da fase de luz. (Figura 12 A). Os animais do grupo *Vehicle* e RTX apresentaram valores de amplitude do ritmo de $T_{interna}$ semelhantes, exceto no período 36 h, que ocorreu uma redução da amplitude no

grupo RTX. Ambos os grupos apresentaram oscilações com um período próximo de 12, 24 e 36 h (Figura 12 B).

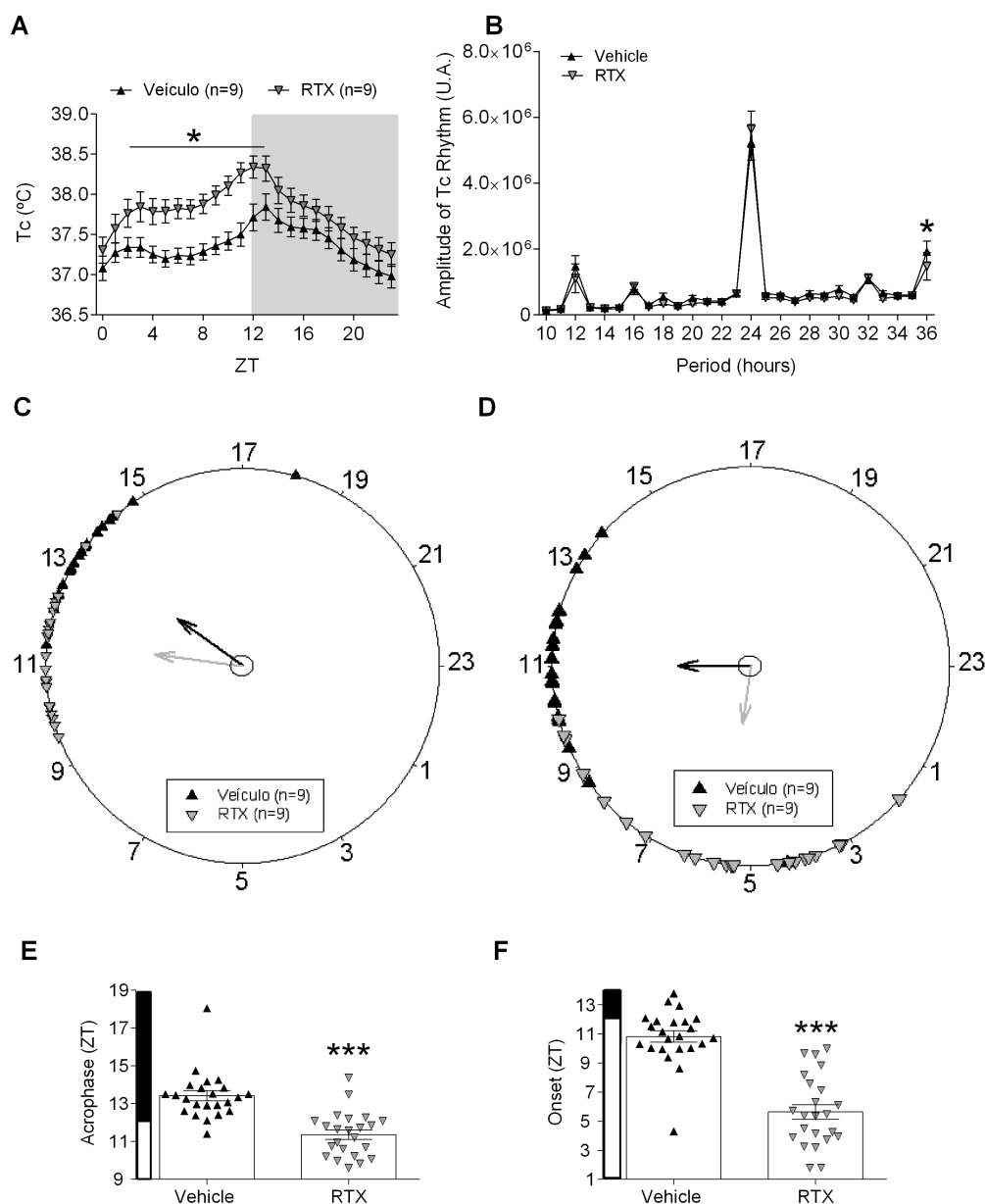


Figura 12: Efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre a variação circadiana da T_{interna} (A), dados mostrados como a média por ZT de todos os 21 dias de protocolo nos animais grupo *Vehicle* (triângulo preto) e RTX (triângulo invertido cinza). Amplitude da T_{interna} (B) durante o protocolo de dieta TR. Análise de distribuição do registro da acrofase (C) e onset (D), as setas apontam para a média angular da distribuição, e o seu tamanho representa o valor de z calculado (teste de Rayleigh). O círculo localizado dentro dos gráficos polares indica o valor tabelado de z . O horário em ZT da acrofase (E) e onset (F) durante o protocolo de dieta TR nos animais do grupo *Vehicle* e RTX. Dados estão expressos nos painéis A, B, E e F como média $\pm$ EPM. Painel A e B, * $p < 0,05$ versus *Vehicle* por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de Tukey. Painel E e F, *** $p < 0,0001$ versus *Vehicle* por teste t de *Student*. *Vehicle*, veículo; RTX,

resiniferatoxina; ZT, *Zeitgeber time*. Retângulo branco representa a fase clara e retângulo preto representa a fase escura do ciclo de luz do biotério.

O tratamento com RTX gerou uma antecipação nos horários de acrofase e *onset* de T_{interna} (Figura 12 C-F). A acrofase no grupo *Vehicle* ocorreu próxima do ZT 13, enquanto, no grupo RTX, ocorreu próximo do ZT 11, uma antecipação de aproximadamente 2 h (Figura 12 C e E). O RTX adiantou de forma pronunciada o horário de *onset* do ritmo de T_{interna} , em média de 5 horas, o *onset* destes animais ocorreu entre o ZT 5 e ZT 6, sendo que no grupo *Vehicle* aconteceu próximo do ZT 11 (Figura 12 D e F). O valor de z calculado foi maior que o z tabelado, demonstrando que os animais apresentaram uma direção uniforme de acrofase e *onset* (Figura 12 C e D).

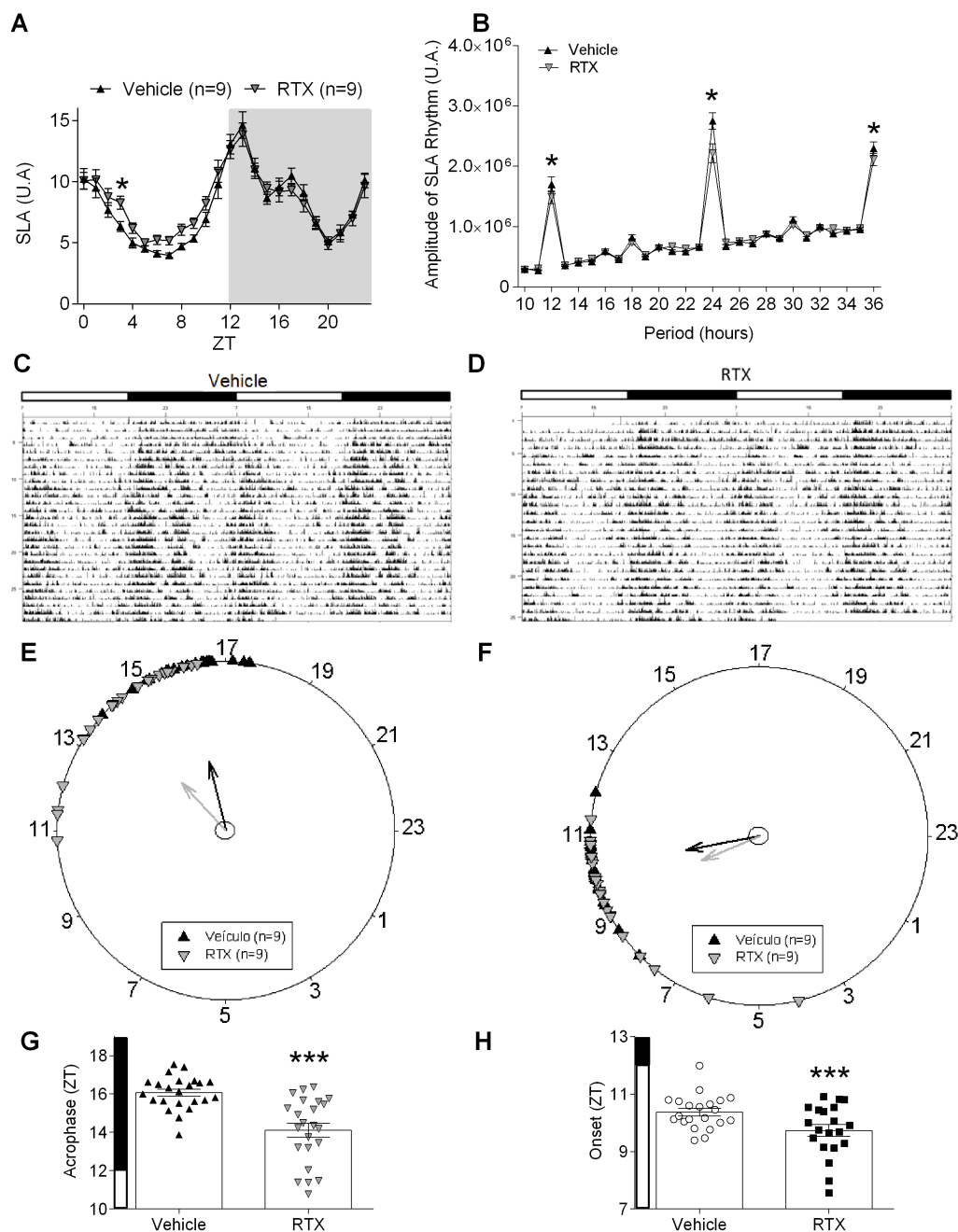


Figura 13: Efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre a variação circadiana da ALE (SLA; A), dados mostrados como a média por ZT de todos os 21 dias de protocolo. Amplitude da ALE (B) durante o protocolo de dieta TR. Actograma representativo de um animal do grupo *Vehicle* (C) e de um animal do grupo RTX (D). Análise de distribuição do registro da acrofase (E) e *onset* (F), as setas apontam para a média angular da distribuição, e o seu tamanho representa o valor de *z* calculado (teste de Rayleigh). O círculo localizado dentro dos gráficos polares indica o valor tabelado de *z*. O horário em ZT da acrofase (G) e *onset* (H) durante o protocolo de dieta TR nos animais do grupo *Vehicle* (triângulo preto) e RTX (triângulo invertido cinza). Dados estão expressos nos painéis A, b, G e H como média $\pm$ EPM. Painel A e B, * $p < 0,05$ versus *Vehicle* por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de Tukey. Painel G e H, *** $p < 0,0001$ versus *Vehicle* por teste *t* de *Student*. ALE, atividade locomotora espontânea; *Vehicle*, veículo; RTX, resiniferatoxina; ZT, *Zeitgeber time*. Retângulo branco representa a fase clara e retângulo preto representa a fase escura do ciclo de luz do biotério.

O aumento da T_{interna} não foi acompanhado por uma alteração na ALE nos animais RTX. Ambos os grupos, *Vehicle* e RTX apresentaram uma redução da ALE na fase da escuridão (Figura 13 A). A dessensibilização do canal TRPV1 não alterou o padrão de oscilação da ALE induzido pela dieta TR, dessa forma, tanto os animais do grupo *Vehicle* e RTX apresentaram oscilações com períodos de aproximadamente 12, 24 e 36 h (Figura 13 B). Por outro lado, o tratamento com RTX reduziu a amplitude da oscilação nestes períodos (Figura 13 B).

O tratamento com RTX antecipou o horário da acrofase e do *onset*, assim como ocorreu com a T_{interna} , houve um avanço médio de 2 h no horário da acrofase, e de 1 h no horário do *onset* do ritmo de ALE (Figura 13 G-H). O valor de z calculado foi maior que o z tabelado, demonstrando que os animais apresentaram uma direção uniforme de acrofase e *onset* (Figura 13 E e F).

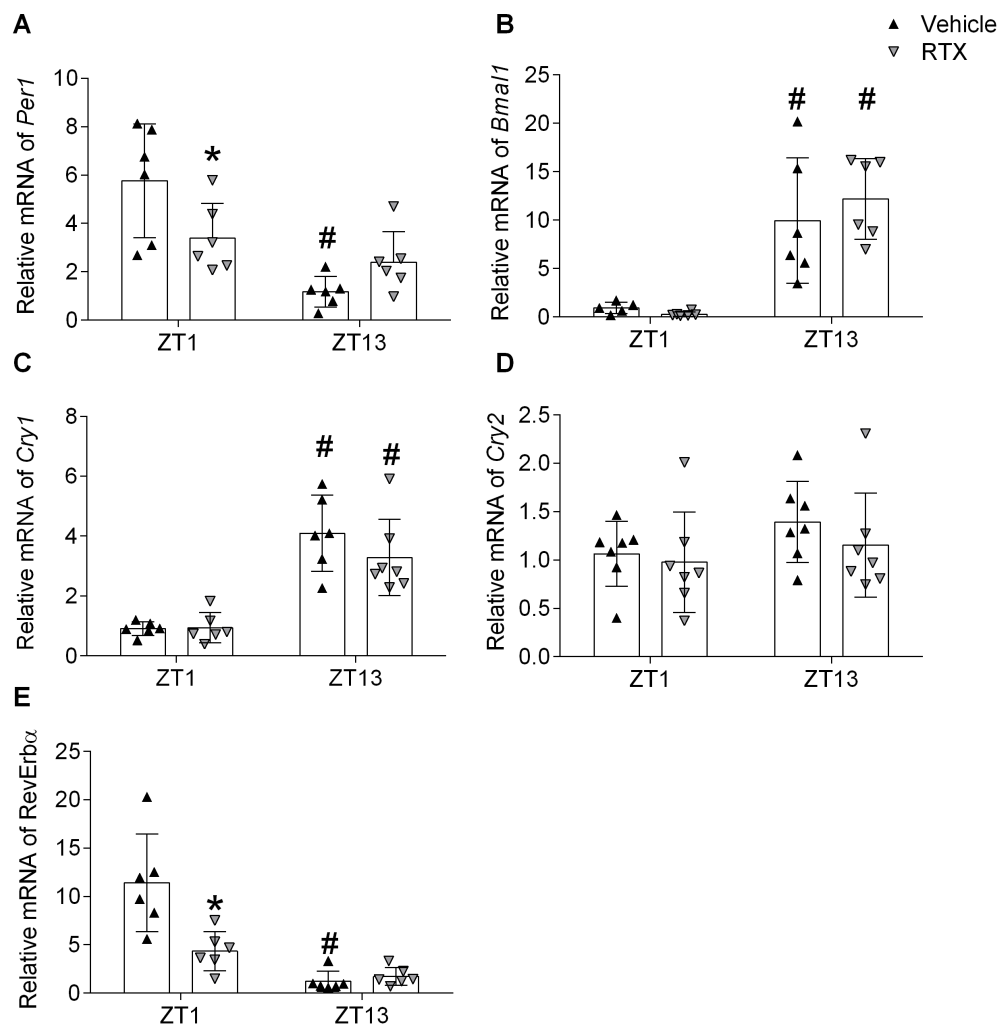


Figura 14: Efeito da dessensibilização abdominal do canal TRPV1 sobre os genes de relógio, *Per 1* (A) *Bmal1* (B), *Cry1* (C), *Cry2* (D) e *RevErba* (E) no fígado dos animais do grupo *Vehicle* (triângulo preto) e RTX (triângulo invertido cinza). Dados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ no mesmo ZT; #, $p < 0,05$ versus ZT1 para o mesmo grupo, por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de Tukey. RTX, resiniferatoxina; *Vehicle*, veículo; ZT, *zeitgeber time*.

O tratamento com RTX não afetou a expressão dos genes *Bmal1* e *Cry1*, os quais nos dois grupos, *Vehicle* e RTX, apresentaram variação temporal com maiores níveis de RNAm no ZT 13 (Figura 14 B e C). Entretanto, o tratamento com RTX aboliu a variação temporal dos genes *Per1* e *RevErba*. Para ambos os genes, observou-se valores aumentados de RNAm no ZT 1 nos animais *Vehicle* e o tratamento com RTX ocasionou uma redução nos níveis de RNAm neste horário, sem afetar a expressão no ZT 13. (Figura 14 A e E). Em relação ao *Cry2*, não houve variação temporal nos grupos analisados (Figura 14 D).

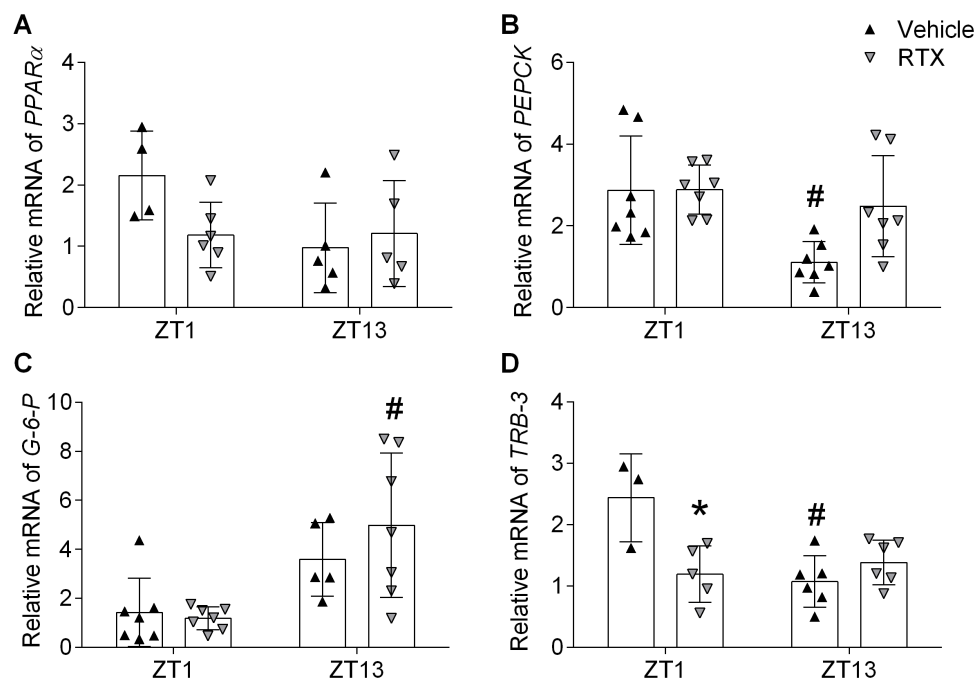


Figura 15: Efeito da dessensibilização abdominal do canal TRPV1 sobre os genes do metabolismo *PPARα* (A), *PEPCK*(B), *Glicose-6-fosfatase* (G-6-P; C), *TRB-3* (D) no fígado de animais do grupo *Vehicle* (triângulo preto) e RTX (triângulo invertido cinza). Dados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ no mesmo ZT; #, $p < 0,05$ versus ZT1 para o mesmo grupo, por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de Tukey. RTX, resiniferatoxina; *Vehicle*, veículo; ZT, *zeitgeber time*.

A expressão de *PPARα* não variou entre os grupos nem tão pouco entre os horários (Figura 15 A). Após a dessensibilização abdominal do canal TRPV1, a expressão do gene *PEPCK* foi alterada (Figura 15 B). Os animais *Vehicle* apresentaram altos níveis de RNAm deste gene no ZT 1 e baixos no ZT 13 (Figura 15 B). Ao analisarmos o *TRB-3*, o grupo *Vehicle* apresentou um aumento na expressão no ZT 1 (Figura 15 D). O tratamento com RTX acarretou numa redução desta expressão, desta forma, levando a perda da variação temporal da expressão deste gene (Figura 15 D). A expressão do gene *glicose-6-fosfatase* não alterou entre os ZTs estudados no grupo *Vehicle*, entretanto, no grupo RTX, foi maior no ZT 13 quando comparado ao ZT 1 (Figura 15 C).

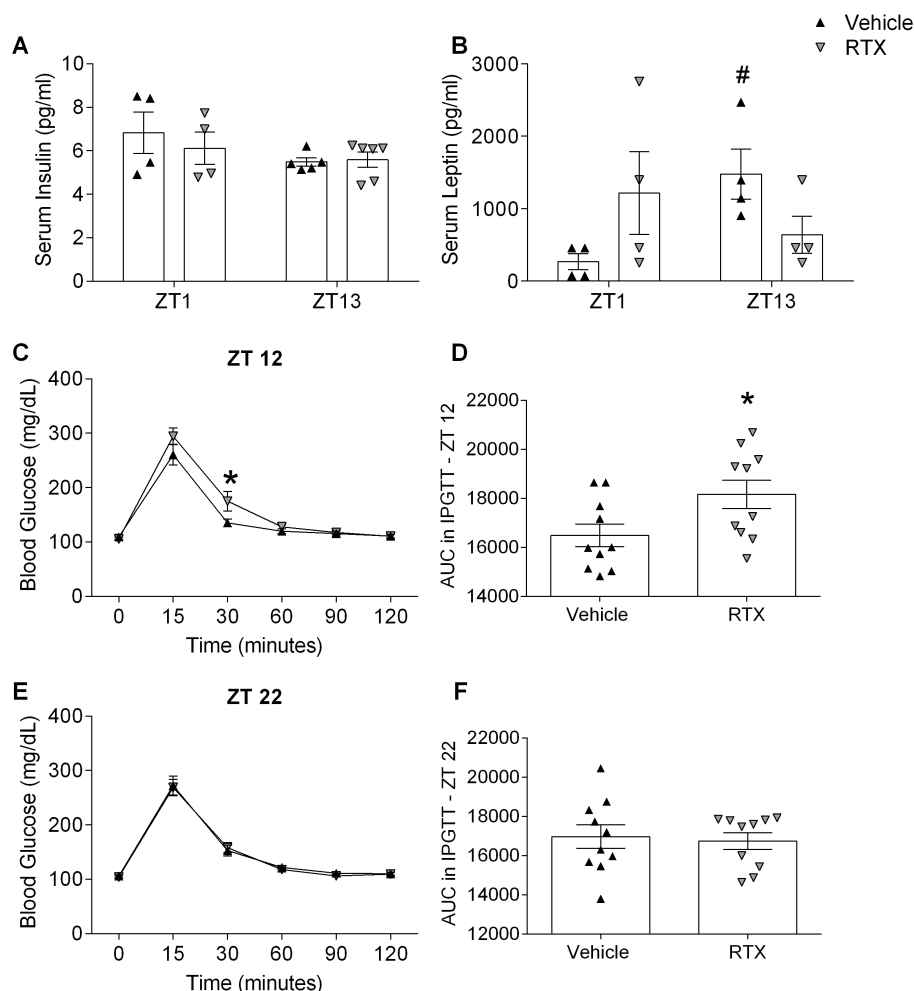


Figura 16: Efeito da dessensibilização abdominal do canal TRPV1 sobre os níveis séricos de insulina (A) e de Leptina (B) e sobre a tolerância à glicose (C-F) de animais submetidos ao protocolo de dieta TR. Animais *Vehicle* (triângulo preto) e RTX (triângulo invertido cinza). Teste de tolerância a glicose intraperitoneal (IPGTT) realizado no ZT 12 (C) e no ZT 22 (E). Área sobre a curva calculada (AUC) a partir do teste no ZT12 (D) e no ZT 22 (F). Dados estão expressos como média $\pm$ EPM. Painel B, #, $p < 0,05$ versus ZT1 para o mesmo grupo por teste *t Student*. Painel C, * $p < 0,05$ versus *Vehicle* por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de Tukey. Painel D, * $p < 0,05$ por teste *t Student*. RTX, Resiniferatoxina; *Vehicle*, Veículo; ZT, *zeitgeber time*.

Em ambos os grupos, *Vehicle* e RTX, os níveis séricos de insulina não variaram entre os ZT 1 e ZT 13 (Figura 16 A). Enquanto que, para os níveis séricos de leptina, observamos níveis aumentados no ZT 13 comparado com o ZT 1 no grupo *Vehicle*. O tratamento com RTX não foi capaz de alterar os níveis de leptina (Figura 16 B).

O teste de tolerância a glicose no ZT 12 revelou que os animais RTX despenderam maior tempo para conseguir retornar aos valores próximos do basal, resultando em uma maior AUC (Figura 16 C e D). E não houve diferença

na resposta ao IPGTT realizado no ZT 22 entre os grupos *Vehicle* e RTX (Figura 16 E e F).

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo observamos que a dieta TR foi capaz de gerar alterações fisiológicas e comportamentais semelhante a estudos anteriores da literatura e, de forma inédita, mostramos que o canal TRPV1 modifica estas alterações. Os ritmos de T_{interna} e ALE ajustaram-se a pista ambiental imposta em novo horário (dieta TR), e isso ocorreu acompanhado de alterações no metabolismo energético, da expressão dos genes de relógio hepático, dos genes relacionados ao metabolismo e na liberação de insulina e leptina. A dessensibilização abdominal do canal TRPV1 exacerbou os efeitos da dieta TR sobre o ritmo de T_{interna} e ALE. Por outro lado, este tratamento aboliu os efeitos de dieta TR sobre a expressão de *Per1* e *RevErba*, gerando uma perturbação nos genes do metabolismo energético e perda da variação temporal de leptina.

Dieta TR é uma importante pista temporal para o relógio biológico, capaz de alterar a ALE; esta alteração pode coincidir ou não com o período de atividade e repouso, dependendo da fase em que a dieta é ofertada (KESSLER; PIVOVAROVA-RAMICH, 2019; POTTER et al., 2016). Dieta padrão ou dieta rica em gordura ofertada por 8 h na fase de escuridão, para um animal noturno, não altera o ritmo de ALE, embora os animais mostrem um aumento da ALE ao final do período de disponibilidade da dieta rica em gordura (HATORI et al., 2012). Já a oferta da dieta rica em gordura ou padrão na fase de luz leva a uma redução da ALE ao final da fase escura (REZNICK et al., 2013; YASUMOTO et al., 2016). Nestes protocolos, as alterações de ALE acontecem próximos do momento de retirada do alimento. O protocolo da dieta TR utilizado neste trabalho, gerou um ritmo bimodal, no qual observa-se dois picos de ALE em momentos antes da exposição e da retirada da alimentação. Este aumento prévio a oferta da alimentação é típico de protocolos com dieta TR com restrição calórica ou sem restrição calórica, mas ofertada por um período curto de tempo, os quais descrevem um aumento da ALE prévio a oferta da alimentação (MISTLBERGER, 1994; STEPHAN, 2002). Este aumento de ALE é conhecido como comportamento antecipatório a alimentação (*food anticipatory activity*, FAA) e pode ser observado em animais que tiveram a oferta de ração por um período de aproximadamente 4 horas (CARNEIRO et al., 2012; CARNEIRO; ARAUJO, 2012; WEBB et al., 2009). Por exemplo, camundongos submetidos a dieta rica em gordura durante 4 horas na fase de luz, sem restrição calórica, apresentam

um aumento da ALE momentos antes da dieta ser ofertada e no início da fase escura (SHERMAN et al., 2012). O FAA também foi observado em animais submetidos a apenas uma refeição diária por um curto período de tempo (CARNEIRO et al., 2012; MISTLBERGER, 2011). Não encontramos registros na literatura que descrevem o FAA em animais submetidos a dieta TR sem restrição calórica por um período de 12 h, dessa forma, nosso trabalho, parece ser o único a mostrar que o FAA ocorre em animais submetidos a um protocolo de dieta sem restrição alimentar por 12 h. Assim, o FAA não está relacionado somente com períodos curtos de exposição ao alimento ou a restrição calórica.

Em nosso trabalho concomitante ao FAA, observamos que a dieta TR levou a uma diminuição da ingesta alimentar, uma redução do ganho de peso. Estas alterações foram acompanhadas de uma redução do EE e um aumento do QR, indicando que a dessincronização entre a oferta do alimento com o período de atividade do animal pode levar a alterações metabólicas relevantes.

O comportamento de FAA não está relacionado ao relógio central, uma vez que animais com lesão do NSQ apresentam FAA de maneira similar aos animais intactos (MISTLBERGER, 2011). Este comportamento parece também não estar relacionado com a maquinaria molecular do relógio. Animais com restrição alimentar por 4 h com dieta padrão levou ao comportamento de FAA tanto em animais com o relógio biológico intacto (CARNEIRO et al., 2012) quanto em animais nocautes para o gene *Bmal1* (PENDERGAST et al., 2009). Nossos resultados confirmaram que roedores submetidos a um horário fixo de alimentação apresentam um aumento da ALE, ou seja, atividade direcionada a um comedouro e demonstram que este aumento está acompanhado de um aumento da $T_{interna}$. Simultaneamente a estas alterações de ALE e $T_{interna}$, observamos nos animais TR, além de um ritmo circadiano, ritmos infradianos e ultradianos, sugerindo que o protocolo deste estudo pode ter afetado o relógio central.

Sabemos que as variações circadianas na $T_{interna}$ acontecem devido aos *inputs* rítmicos do NSQ para os centros termorregulatórios do hipotálamo, ocorrendo assim uma alteração nos limiares de vasodilatação e sudorese (REFINETTI; MENAKER, 2010; WEINERT; WATERHOUSE, 2007). Durante o repouso, em ambiente termoneutro, os mecanismos para a perda de calor estão ativados. Já no início da fase de atividade do ciclo ocorre uma ativação do ganho

de calor, gerando um aumento da T_{interna} e, ao final da fase de atividade, ocorre uma ativação para a perda de calor, acarretando em uma redução da T_{interna} (KRAUCHI; WIRZ-JUSTICE, 1994; SMOLANDER et al., 1993). Em animais noturnos, tanto os valores máximos de T_{interna} quanto de ALE acontecem na fase de escuridão enquanto valores mínimos (ou de nadir) são observados na fase de luz (LIU et al., 2002; SALGADO-DELGADO et al., 2010; YASUMOTO et al., 2016). Este perfil foi observado nos animais do grupo AD deste trabalho. Já os animais do grupo TR apresentam uma redução T_{interna} e da ALE na fase de escuridão, seguida de uma elevação no início e no final da fase de luz, de forma similar ao que foi visto em outros trabalhos na literatura (SALGADO-DELGADO et al., 2010; YASUMOTO et al., 2016). Porém, ainda assim, os valores mais altos de T_{interna} e ALE aconteceram no período noturno, demonstrando que apesar da dieta TR, os ritmos de ALE e T_{interna} continuaram sincronizados ao ciclo de luz. Assim, a dieta TR parece, de fato, contribuir para o perfil do ritmo de T_{interna} e ALE, provavelmente devido a capacidade da alimentação em sincronizar o relógio biológico.

As alterações no perfil de T_{interna} e ALE induzida pela dieta TR podem ser decorrentes do fenômeno de mascaramento, ou seja, quando uma pista ambiental altera uma reposta fisiológica ou comportamental ditada pelo oscilador circadiano endógeno (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010). Por exemplo, o efeito que a luz causa, quando aplicada no período noturno, de supressão da ALE e da liberação de melatonina, em roedores noturnos (MROSOVSKY, 1999); neste caso, um efeito de mascaramento negativo. Já o mascaramento positivo acontece quando uma pista ambiental é estimulatória para a variável circadiana, por exemplo, o efeito da escuridão em aumentar a ALE (MROSOVSKY, 1999). É possível que a dieta TR esteja gerando um mascaramento positivo sobre os ritmos de T_{interna} e ALE, com um aumento destas variáveis na fase clara do ciclo de luz. A outra possibilidade seria que a dieta TR tenha promovido um arrastamento dos ritmos de ALE e T_{interna} , uma vez que a análise de periodograma Qui-quadrado revelou um período de 12 h para ambas variáveis, ou seja, elas assumiram o período da pista ambiental (a dieta TR). Neste caso, a luz poderia exercer um efeito de mascaramento negativo nos ritmos de T_{interna} e ALE, inibindo-os no período de luz. Para confirmação desta hipótese, no

entanto, seria necessário repetir este experimento em condições de escuridão constante, assim como realizado por Abe e colaboradores (2007).

O impacto da alimentação sobre os horários de *onset* e de acrofase confirma o seu papel como uma importante pista ambiental e aponta para a hipótese de que, neste estudo, a dieta TR acarretou um arraste do relógio biológico. De forma similar a outros estudos da literatura (CHALLET et al., 1997; STEPHAN, 1986), demonstramos que, ainda que esteja sobre presença do ciclo de luz, o protocolo de dieta TR pode afetar a expressão dos ritmos de T_{interna} , ALE. Os animais TR apresentaram uma mudança de fase no *onset*, passando a ocorrer ainda na fase de luz, próximo do ZT 11 para T_{interna} e ALE, a mudança de fase ou período é um indicador de arraste do relógio (MROSOVSKY, 1999). Não observamos uma mudança de fase para acrofase, porém a mesma ocorre logo no início da fase de escuridão e os animais mostram uma ALE reduzida na fase de escuridão, como é possível observar nos actogramas.

Os efeitos da dieta TR em alguns fatores metabólicos como massa corporal, EE e ingesta alimentar parece ser dependente do horário em que for ofertada (ARBLE et al., 2009). Quando animais são submetidos a dieta em horário “errado”, ou seja, no período de repouso, ocorre um aumento do ganho de peso, da ingesta alimentar e redução do gasto calórico (SALGADO-DELGADO et al., 2010; YASUMOTO et al., 2016). Os efeitos metabólicos causados pela dieta em horário “errado” também irão depender do tipo de dieta ofertada, sendo que dietas ricas em gorduras ou rica em frutose impactam, de forma mais proeminente, o metabolismo energético. Neste trabalho, de forma semelhante ao estudo de Reznick e colaboradores (2013), observamos uma redução da ingesta alimentar no grupo TR, porém, contrário ao estudo citado, observamos uma redução de cerca de 25 % no ganho de peso. Nossos resultados vão na mesma direção dos resultados obtidos em camundongos submetidos a dieta padrão na fase de luz, os quais tiveram uma menor ingesta alimentar e um menor ganho de peso (JANG et al., 2012).

Quando comparamos a massa corporal entre os grupos AD e TR ao longo do protocolo, não observamos diferenças nos resultados, exceto para o dia 13. A manutenção da massa corporal dos animais TR pode ser justificada, devido à redução do EE e da redução da ingesta alimentar. A análise do VO_2 foi realizada no ZT 4 ou no ZT 5, de tal maneira que os animais AD estão em um estado

metabólico mais próximo do jejum, enquanto, os animais TR estão no estado alimentado. De fato, os animais TR apresentaram um aumento do QR comparado aos animais AD, confirmando seu estado alimentado. O QR pode ser um indicador de qual tipo de substrato energético é preferencialmente oxidado (STEINER et al., 2017). Este quociente é definido como o volume de dióxido de carbono liberado sobre o volume de oxigênio absorvido (PATEL; BHARDWAJ, 2019). Os valores de QR próximos de 1 encontrados nos animais TR indicam um predomínio da utilização de carboidrato como substrato energético. Estes resultados corroboram os dados relatados anteriormente sobre o efeito da dieta TR em roedores (REZNICK et al., 2013).

Observamos uma variação temporal na expressão dos genes de relógio no fígado dos animais *Naive*. O perfil de expressão dos dois genes analisados estão em antifase, confirmando a relação de retroalimentação dos genes da maquinaria molecular do relógio biológico, ou seja, quando há um aumento da expressão de *Per1* ocorre uma redução da expressão de *Bmal1* (HASTINGS et al., 1999; ZYLKA et al., 1998). Nossos dados confirmam outros resultados da literatura, no qual, observa-se um aumento da expressão de *Per1* no ZT 12 e uma redução no ZT 0 e, um aumento da expressão de *Bmal1* no ZT 0 e uma redução no ZT 12 no fígado (SOTÁK et al., 2016; SUJINO et al., 2012). Este experimento com o grupo *Naive* orientou a escolha dos horários de eutanásia dos delineamentos 1 e 2. Desta forma, foi escolhido o ZT 1 e ZT 13 para análise da expressão gênica, uma vez que nestes horários teríamos a acrofase e o nadir de ambos os genes.

A oferta da dieta padrão por 12 h ou dieta rica em gordura por 8 h na fase de luz é capaz de gerar uma alteração na fase de expressão dos genes *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2* e *RevErba* no fígado (REZNICK et al., 2013; YASUMOTO et al., 2016). Corroborando estes dados, observamos que a dieta TR alterou o horário de maior expressão dos genes *Per1* e *Bmal1*, além de abolir a variação temporal dos genes *RevErba* e *Cry1*. Animais submetidos a dieta rica em gordura AD mostram uma redução da oscilação na expressão dos genes *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Bmal1*, *Clock*, *Rora* e *RevErba* no fígado; a oferta desta mesma dieta, restrita ao período noturno leva ao reestabelecimento da expressão destes genes a níveis similares aos observados nos animais submetidos à dieta padrão

(HATORI et al., 2012). Dessa forma, o horário da alimentação possui maior impacto sobre os genes de relógio no fígado do que o conteúdo da dieta em si.

Sabe-se que a dieta TR além de regular o relógio hepático, pode afetar o metabolismo de lipídios e de glicose, por alterar a expressão de genes metabólicos (KOHSAKA et al., 2007; LAMIA; STORCH; WEITZ, 2008). Em nosso estudo, os animais do grupo TR perderam a variação temporal da expressão da *glicose-6-fosfatase*, observada no grupo AD. O perfil de expressão deste gene nos animais AD e TR foram semelhantes ao encontrado no trabalho de Jang e colaboradores (2012), que utilizaram o mesmo protocolo de dieta TR. Diferente destes autores, nossos resultados mostraram que a dieta TR leva a uma variação temporal na expressão do gene *PEPCK* (JANG et al., 2012). O gene *PEPCK* está envolvido com a gliconeogênese, via que é inibida pela insulina (HATTING et al., 2018). Observamos que os animais TR tiveram um aumento na liberação de insulina neste mesmo horário, sendo assim, esperava-se uma inibição da transcrição deste gene. Isto pode ser um indicativo de resistência à insulina neste horário. Porém, confrontando estes dados, não foi observado uma diferença na expressão do *TRB-3* entre os animais AD e TR. Este gene está associado a uma sinalização da insulina prejudicada, por ser um modulador negativo da AKT (DU, 2003).

No fígado todas as isoformas de *PPAR* oscilam com um padrão circadiano e o *PPAR α* é a isoforma mais abundante (YANG et al., 2006). Há uma interação direta entre o *PPAR α* e os genes de relógio (CANAPLE et al., 2006; INOUE et al., 2005; OISHI; SHIRAI; ISHIDA, 2005), de tal maneira que o *PPAR α* é capaz de estimular diretamente a transcrição de *Bmal1* e de *RevErb α* (CANAPLE et al., 2006; GERVOIS et al., 1999). A dieta TR aboliu a variação temporal de *PPAR α* na janela de tempo avaliada neste estudo. Por outro lado, foi possível evidenciar um efeito proeminente da dieta em inverter o horário de valores máximos e mínimos para o gene *Bmal1*, alvo direto do *PPAR α* . Estes resultados sugerem que, ou perdemos o efeito da dieta TR sobre o *PPAR α* , ou os efeitos da dieta TR sobre o *Bmal1* não são via *PPAR α* . Corroboram este último argumento, o fato de termos confirmado dados descritos na literatura sobre o efeito da dieta TR na expressão de *PPAR α* e de *Bmal1* embora numa janela de estudo limitada (JANG et al., 2012; SLÁDEK; HOUDEK; SUMOVÁ, 2019).

Animais nocautes para o gene *Clock* ou *Bmal1* tem um comprometimento do relógio biológico e da regulação circadiana da sensibilidade do fígado à insulina (ZHOU et al., 2014). Este efeito parece ser em função da falta do relógio hepático, uma vez que animais nocautes para os genes de relógio, *Bmal1*, no fígado, apresentam uma maior AUC no teste de tolerância à insulina, realizado no ZT 1 quando comparado ou ZT 13, ou seja, menor sensibilidade à insulina na fase de luz do que na fase de escuridão (ZHOU et al., 2014). No presente trabalho, não foi realizado o teste de tolerância à insulina, mas realizou-se o IPTTG. Os dois grupos analisados apresentaram uma variação temporal com maior AUC no ZT22 (análise não apresentada). No entanto, os animais TR apresentaram uma redução na AUC no teste de tolerância à glicose no ZT 12 e uma tendência à redução no ZT 22, indicando uma maior tolerância à glicose. Desta forma, conclui-se que a dieta TR é capaz de afetar a expressão dos genes de relógio, desencadeando alterações nos genes metabólicos, sendo suficiente para gerar alterações na homeostase da glicose.

Os maiores níveis séricos de leptina são encontrados durante o estado absorptivo (ARBLE; VITATERNA; TUREK, 2011), o que em roedores noturnos, correspondem a fase de escuridão (BODOSI et al., 2004; KALSBECK et al., 2001), onde acontece a maior ingesta alimentar mesmo nos animais AD. No entanto, neste estudo os animais AD mostraram níveis de leptina que não correspondem a este perfil ditado pelo estado absorptivo. Por outro lado, os níveis de leptina obtidos são similares aos de camundongos alimentados com dieta rica em gordura no período noturno (YASUMOTO et al., 2016). Observa-se que a alimentação também gera alterações no perfil circadiano de liberação de leptina, resultando em um arraste do ritmo. Em humanos um avanço de 6,5 h no horário de cada refeição arrasta os níveis de leptina em torno de 5 a 7 h na mesma direção da alimentação (SCHOELLER et al., 1997). Animais com dieta rica em gordura na fase de luz apresentaram um arraste dos níveis de leptina, com altos níveis na fase escura e baixos na fase clara do ciclo de luz (YASUMOTO et al., 2016). Em nosso estudo, confirmamos o efeito de arraste da alimentação sobre a liberação de leptina, os animais TR mostraram maiores níveis séricos de leptina no ZT 13 e menores no ZT 1, o que foi o oposto ao observado nos animais AD.

A T_{interna} é um importante *zeitgeber* para o relógio hepático (BROWN et al., 2002), desta forma deve ser necessário a participação de algum termosensor responsável pela sinalização térmica a este órgão. De fato, demonstramos que a presença do canal TRPV1 é fundamental para manter a oscilação dos genes de relógio no fígado. Após a dessensibilização deste canal, a oscilação do gene *Per1* no fígado foi abolida e os valores de RNAm do gene *Bmal1* mostrou-se aumentado na ZT 0 (HORTA, 2015). Assim, aventamos a possibilidade que o canal TRPV1 possa ser este termosensor. Esta possibilidade é suportada principalmente pelo fato de já ter sido estabelecido uma relação entre o TRPV1 e os fatores de *heat shock*, os quais, sabidamente estão envolvidos com a sinalização intracelular, desencadeada pela temperatura, e responsável por alterar a expressão dos genes de relógio hepático (BUHR; YOO; TAKAHASHI, 2010; TAMARU et al., 2011). Sabe-se que o *heat shock transcription factor 1* (HSF-1) regula diretamente a transcrição do gene TRPV1 (FAN-XIN et al., 2012). Além disso, o tratamento com um antagonista de TRPV1, a capsazepina, inibe o HSF-1 (BROMBERG et al., 2013) e tanto a expressão do HSF1 e do gene *Per2* encontram-se reduzidas em animais dessensibilizados (JEONG; SEONG, 2014).

Reinke e colaboradores (2008) demonstraram que os níveis de HSF-1 estão relacionadas ao horário da dieta padrão, de tal forma que animais submetidos a dieta apenas durante a fase de luz mostram maiores valores de expressão proteína de HSF-1 nesta fase. Estes resultados somados aos descritos anteriormente indicam que o HSF-1 pode ser regulado tanto pela T_{interna} quanto pela alimentação. Além disso, mostramos que a dieta TR leva a um aumento da T_{interna} no início da fase de luz, este aumento pode ser necessário para a sincronização do relógio hepático pela alimentação.

O aumento na T_{interna} induzido pela dieta TR é exacerbado pela dessensibilização do canal TRPV1, assim como os efeitos da alimentação sobre o arraste e/ou mascaramento da T_{interna} e ALE. Os animais com o canal dessensibilizado mostraram a acrofase do ritmo de T_{interna} um pouco antes de iniciar a fase de escuridão e o *onset* na metade da fase de luz. A acrofase e *onset* do ritmo de ALE também foram alterados pela dessensibilização do canal, contudo, o efeito foi menor do que o observado na T_{interna} . O bloqueio do TRPV1 e a dessensibilização do canal TRPV1 gera uma hipertermia, que no caso da dessensibilização pode perdurar por alguns dias (HORTA, 2015; STEINER et al.,

2007; WOODS et al., 1994). Este efeito foi observado nos animais RTX, os quais apresentaram uma média de T_{interna} ao longo dos 21 dias maior que o *Vehicle* durante a fase clara do ciclo de luz.

Observamos que a dessensibilização do canal TRPV1 interferiu na sincronização do relógio hepático pela alimentação, sem afetar os efeitos da dieta sobre o EE, QR e VO_2 . A partir destes resultados surgem duas hipóteses que convergem para a participação do canal TRPV1 na transmissão deste *zeitgeber*. A primeira hipótese seria que a dieta TR altera o ritmo de T_{interna} , sendo a T_{interna} a responsável pela sincronização do relógio hepático. Propomos que o sinalizador destas oscilações de T_{interna} para a maquinaria molecular seria o TRPV1. E a segunda hipótese seria que este canal participe do arraste do relógio hepático pela alimentação diretamente, ou seja, as alterações observadas na T_{interna} durante a dieta TR (que foram exacerbadas pela falta do canal TRPV1) não estão envolvidas com o arraste do relógio hepático pela alimentação. A participação do TRPV1 é reforçada pelo fato da dieta TR levar a uma variação circadiana na expressão de RNAm do *TRPV1* no fígado de animais submetidos a dieta apenas no período de luz, o que não foi observado em animais com livre acesso a ração (SLÁDEK; HOUDEK; SUMOVÁ, 2019).

No grupo RTX observou-se perda da variação temporal de *Per1* e *RevErb α* . Por outro lado, não foi observado diferenças em relação a expressão de *Bmal1* e de *Cry1* e *Cry2* entre os grupos *Vehicle* e RTX. Estes resultados mostram que o canal TRPV1 participa da sincronização do relógio hepático. Além disso, corroboram o fato de que a perturbação na maquinaria molecular, não precisa necessariamente perturbar todos os genes envolvidos, por exemplo, observa-se que camundongos submetidos a dieta TR apresentaram, nos primeiros dias de protocolo, um avanço na expressão de *Per1*, *Per2* e *RevErb α* , sem alterar a expressão de *Bmal1* e *Cry1* (MUKHERJI; KOBIITA; CHAMBON, 2015).

Animais submetidos a dieta suplementadas com capsaicina, um agonista do canal TRPV1, apresentam um aumento na expressão de RNAm de *PGC-1 α* e *PPAR α* no fígado (KANG et al., 2010). E observa-se que agonistas de *PPAR α* ativam o canal TRPV1 (AMBROSINO et al., 2014). Juntos estes resultados apontam para uma regulação do *PPAR α* pelo canal TRPV1 e vice-versa. O *PPAR α* está envolvido com a disponibilidade de energia durante o jejum,

participando da regulação da oxidação de gordura e de aminoácidos e é ativado por ligantes naturais como ácidos graxos poli-insaturados e eicosanóides e, ligantes sintéticos (CONTRERAS; TORRES; TOVAR, 2013). Nossos resultados não apontam para um efeito da dieta TR nem tão pouco do TRPV1 sobre a expressão de *PPARα*. Já foi demonstrado que o *PPARα* pode induzir a expressão de *RevErbα* (DUEZ; STAELS, 2008). Os animais RTX mostram perda da variação temporal de *RevErbα*, sem alteração dos níveis de RNAm de *PPARα*. Estes resultados indicam que a participação do TRPV1 sobre o relógio hepático não é mediada pelo *PPARα*.

Os níveis de insulina não se alteraram nos animais com dessensibilização do canal TRPV1, porém houve um aumento na AUC apenas no ZT12, indicando uma intolerância à glicose tempo-dependente. De forma similar a estes resultados, animais nocautes para o canal TRPV1 apresentam uma maior AUC quando comparado a animais intactos, esta maior intolerância à glicose acontece quando os animais estão submetidos à dieta padrão ou à dieta rica em gordura (PAGE et al., 2019). O canal TRPV1 não interferiu com o efeito da dieta TR em aumentar os níveis de insulina no ZT1. Entretanto, este canal reverteu o efeito da dieta de reduzir a AUC no IPTTG no ZT 12. Assim a falta do canal prejudicou o efeito benéfico da dieta TR sobre o metabolismo da glicose. Estes resultados corroboram os efeitos da suplementação do agonista de TRPV1, capsaicina, na dieta de animais de promover uma redução da insulina, da intolerância à glicose e dos níveis de glicose basal (KWON et al., 2013).

O efeito do canal TRPV1 sobre o metabolismo da glicose pode ser explicado pela importância deste canal em manter o perfil de variação temporal dos genes *glicose-6-fosfatase*, *PEPCK* e *TRB-3* induzido pela TR. Já foi descrito que tratamento com agonista de TRPV1, a capsaicina, reduz a expressão de *PEPCK* e *glicose-6-fosfatase* (ZHANG et al., 2017). Confrontando este efeito, a dessensibilização do canal TRPV1 não alterou a expressão de *PEPCK* nos horários estudados.

Os resultados séricos de leptina foram similares nos animais *Vehicle* e RTX. Animais nocautes para TRPV1 mostram níveis normais de leptina (LEE et al., 2015), indicando que o TRPV1 parece não participar na manutenção da liberação de leptina. Por outro lado, em nosso experimento, a variação temporal

induzida pela dieta TR foi abolida nos animais com a dessensibilização do canal TRPV1 quando comparado aos animais *Vehicle*. Desta forma, o efeito da dieta TR sobre a secreção de leptina parece ser mediado pelo canal TRPV1.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, os animais sob dieta padrão ofertada por 12 h na fase clara mostraram um padrão bimodal nos ritmos de ALE e T_{interna} , característico de comportamento antecipatório à alimentação, uma vez que os períodos destes ritmos coincidiram com a oferta do alimento. Esta dieta também diminuiu o gasto energético, reduziu a ingesta alimentar e, conseqüentemente, o ganho de peso corporal ao final dos 21 dias. Estas alterações no metabolismo energético foram acompanhadas por uma melhora dependente do tempo em como o organismo lida com a glicose. Aventamos que esta melhora possa ser decorrente das respostas induzidas pelo horário da alimentação sobre o relógio hepático, uma vez que, a dieta alterou a variação temporal dos genes *Per1*, *Bmal1* e aboliu a dos genes *Reverba* e *Cry1* no fígado. Isto foi acompanhado de perda da variação temporal na expressão dos genes *PPAR α* e *glicose-6-fosfatase* neste órgão. Estes resultados quebram o paradigma de que comer em horário “errado” é sempre prejudicial à saúde e reforçam a capacidade plástica do relógio biológico em promover alterações do organismo na tentativa de melhor adequação às mudanças ambientais, neste caso, do horário da alimentação.

O canal TRPV1 participa da sincronização do relógio biológico pela alimentação, sendo que a falta deste canal interferiu com a plasticidade do sistema circadiano temporal. A perda funcional do TRPV1 da cavidade abdominal, induzida por dessensibilização do canal, exacerbou o comportamento FFA, antecipando o horário de onset e acrofase. A falta do canal também bloqueou a sincronização à alimentação dos genes do relógio hepático, *Per1* e *Reverba* e, aboliu a variação temporal dos genes *PPAR α* , *PEPCK*, *TRB-3*. Estas alterações foram acompanhadas pela perda da melhora de como o organismo lida com a glicose sem alterações significativas no metabolismo energético. Nosso trabalho amplia o entendimento de como o TRPV1 participa da homeostase energética. Assim, concluímos que o TRPV1 é um componente chave nas respostas de sincronização do relógio biológico. A ativação deste canal, por exemplo, pela capsaicina, presente na pimenta, pode favorecer o metabolismo da glicose, podendo ser considerado um importante adjuvante no tratamento de doenças relacionadas com prejuízo do metabolismo da glicose, tal como ocorre no diabetes mellitus tipo II.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; HONMA, S.; HONMA, K. I. Daily restricted feeding resets the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus of CS mice. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 1, p. 607–615, 2007.

ALBRECHT, U.; EICHELE, G. The mammalian circadian clock. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 13, n. 3, p. 271–277, jun. 2003.

AMARAL, F. G. et al. Environmental control of biological rhythms: Effects on development, fertility and metabolism. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 26, n. 9, p. 603–612, 2014.

AMBROSINO, P. et al. Functional and biochemical interaction between PPAR α receptors and TRPV1 channels: Potential role in PPAR α agonists-mediated analgesia. **Pharmacological Research**, v. 87, p. 113–122, 2014.

ARBLE, D. M. et al. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. **Obesity**, v. 17, n. 11, p. 2100–2102, 2009.

ARBLE, D. M.; VITATERNA, M. H.; TUREK, F. W. Rhythmic leptin is required for weight gain from circadian desynchronized feeding in the mouse. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

BASS, J.; TAKAHASHI, J. S. Circadian integration of metabolism and energetics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 330, n. 6009, p. 1349–54, 2010.

BELZA, A.; FRANDSEN, E.; KONDRUP, J. Body fat loss achieved by stimulation of thermogenesis by a combination of bioactive food ingredients: A placebo-controlled, double-blind 8-week intervention in obese subjects. **International Journal of Obesity**, 2007.

BODOSI, B. et al. Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: Effects of the

normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 5 56-5, p. 1071–1079, 2004.

BROMBERG, Z. et al. The Membrane-Associated Transient Receptor Potential Vanilloid Channel Is the Central Heat Shock Receptor Controlling the Cellular Heat Shock Response in Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–12, 2013.

BROWN, S. A. et al. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. **Current Biology**, v. 12, n. 18, p. 1574–1583, 2002.

BUHR, E. D.; YOO, S.-H.; TAKAHASHI, J. S. Temperature as a Universal Resetting Cue for Mammalian Circadian Oscillators. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 379–385, 2010.

BUTTGEREIT, F. et al. Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 6, p. 349–356, 24 jun. 2015.

CANAPLE, L. et al. Reciprocal Regulation of Brain and Muscle Arnt-Like Protein 1 and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Defines a Novel Positive Feedback Loop in the Rodent Liver Circadian Clock. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 8, p. 1715–1727, ago. 2006.

CARNEIRO, B. T. S. et al. Daily anticipatory rhythms of behavior and body temperature in response to glucose availability in rats. **Psychology and Neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 191–197, 2012.

CARNEIRO, B. T. S.; ARAUJO, J. F. Food entrainment: Major and recent findings. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, n. NOVEMBER 2012, p. 1–6, 2012.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816–824, 1997.

CATERINA, M. J. et al. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for

noxious heat. **Nature**, v. 398, n. 6726, p. 436–441, 1 abr. 1999.

CATERINA, M. J. Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. **Science**, v. 288, n. 5464, p. 306–313, 2000.

CATERINA, M. J. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 1, p. R64–R76, 2006.

CHAIX, A. et al. Time-Restricted Feeding Prevents Obesity and Metabolic Syndrome in Mice Lacking a Circadian Clock. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 2, p. 303–319.e4, 2019.

CHALLET, E. et al. Phase-Advanced Daily Rhythms of Melatonin, Body Temperature, and Locomotor Activity in Food-Restricted Rats Fed during Daytime. **Journal of Biological Rhythms**, v. 12, n. 1, p. 65–79, 1997.

CHALLET, E.; MALAN, A.; PÉVET, P. Daily hypocaloric feeding entrains circadian rhythms of wheel-running and body temperature in rats kept in constant darkness. **Neuroscience Letters**, v. 211, n. 1, p. 1–4, jun. 1996.

CONTRERAS, A. V.; TORRES, N.; TOVAR, A. R. PPAR- α as a Key Nutritional and Environmental Sensor for Metabolic Adaptation. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 439–452, 1 jul. 2013.

DAMIOLA, F. et al. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. **Genes and Development**, v. 14, n. 23, p. 2950–2961, 2000.

DHAKA, A. et al. TRPV1 Is Activated by Both Acidic and Basic pH. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 1, p. 153–158, 2009.

DOGAN, M. D. et al. Lipopolysaccharide fever is initiated *via* a capsaicin-sensitive mechanism independent of the subtype-1 vanilloid receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 8, p. 1023–1032, 2004.

DOI, R.; OISHI, K.; ISHIDA, N. CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of Glycogen synthase 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 2, n. 15, p. 1–9, 2010.

DU, K. TRB3: A tribbles Homolog That Inhibits Akt/PKB Activation by Insulin in Liver. **Science**, v. 300, n. 5625, p. 1574–1577, 6 jun. 2003.

DUEZ, H.; STAELS, B. Rev-erba gives a time cue to metabolism. **FEBS Letters**, v. 582, n. 1, p. 19–25, 9 jan. 2008.

ETCHEGARAY, J.-P. et al. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. **Nature**, v. 421, n. 6919, p. 177–182, 11 jan. 2003.

FAN-XIN, M. et al. Heat shock factor 1 regulates the expression of the *TRPV1* gene in the rat preoptic-anterior hypothalamus area during lipopolysaccharide-induced fever. **Experimental Physiology**, v. 97, n. 6, p. 730–740, 1 jun. 2012.

GAVVA, N. R. et al. Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. **Pain**, v. 136, n. 1–2, p. 202–210, 2008.

GERVOIS, P. et al. Fibrates Increase Human REV-ERBa Expression in Liver via a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Response Element. **Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 3, p. 400–409, mar. 1999.

GILL, S.; PANDA, S. A Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 5, p. 789–798, 2015.

GOLOMBEK, D. A; ROSENSTEIN, R. E. Physiology of Circadian Entrainment. **Physiology Rev**, v. 90, n. 3, p. 1063–1102, 2010.

GUZMÁN-RUIZ, M. A. et al. Role of the suprachiasmatic and arcuate nuclei in diurnal temperature regulation in the rat. **Journal of Neuroscience**, 2015.

HAN, H. S. et al. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 48, n. 3, p. e218-10, 2016.

HASTINGS, M. H. et al. Differential Regulation of mPER1 and mTIM Proteins in the Mouse Suprachiasmatic Nuclei: New Insights into a Core Clock Mechanism. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 12, p. RC11–RC11, 15 jun. 1999.

HATORI, M. et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 6, p. 848–860, 2012.

HATTING, M. et al. Insulin regulation of gluconeogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1411, n. 1, p. 21–35, jan. 2018.

HORTA, N. A. C. **Sinalização da variação de temperatura corporal interna para o relógio biológico via canais TRPV1**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

HSIEH, W.-H. et al. Simulated shift work in rats perturbs multiscale regulation of locomotor activity. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 11, n. 96, p. 20140318–20140318, 2014.

HUANG, W. et al. Review series Circadian rhythms , sleep , and metabolism. v. 121, n. 6, p. 2133–2141, 2011.

HUSSE, J.; EICHELE, G.; OSTER, H. Synchronization of the mammalian circadian timing system: Light can control peripheral clocks independently of the SCN clock: Alternate routes of entrainment optimize the alignment of the body's circadian clock network with external time. **BioEssays**, v. 37, n. 10, p. 1119–1128, 2015.

INOUE, I. et al. CLOCK/BMAL1 is Involved in Lipid Metabolism via Transactivation of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Response Element. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 12, n. 3,

p. 169–174, 2005.

ISHIDA, A. et al. Light activates the adrenal gland: Timing of gene expression and glucocorticoid release. **Cell Metabolism**, v. 2, n. 5, p. 297–307, 2005.

IWASAKI, Y. et al. TRPV1 Agonist Monoacylglycerol Increases UCP1 Content in Brown Adipose Tissue and Suppresses Accumulation of Visceral Fat in Mice Fed a High-Fat and High-Sucrose Diet. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 5, p. 904–909, 23 maio 2011.

JANG, H. et al. Feeding Period Restriction Alters the Expression of Peripheral Circadian Rhythm Genes without Changing Body Weight in Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–7, 2012.

JEONG, K. Y.; SEONG, J. Neonatal capsaicin treatment in rats affects TRPV1-related noxious heat sensation and circadian body temperature rhythm. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 341, n. 1–2, p. 58–63, 2014.

JONES, J. G. Hepatic glucose and lipid metabolism. **Diabetologia**, v. 59, n. 6, p. 1098–1103, 2016.

KALSBEEK, A. et al. The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. **Endocrinology**, v. 142, n. 6, p. 2677–2685, 2001.

KALSBEEK, A.; FLIERS, E. Daily regulation of hormone profiles. **Handbook of Experimental Pharmacology**, 2013.

KALSBEEK, A.; LA FLEUR, S.; FLIERS, E. Circadian control of glucose metabolism. **Molecular Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 372–383, 2014.

KANG, J.-H. et al. Capsaicin, a spicy component of hot peppers, modulates adipokine gene expression and protein release from obese-mouse adipose tissues and isolated adipocytes, and suppresses the inflammatory responses of adipose tissue macrophages. **FEBS Letters**, v. 581, n. 23, p. 4389–4396, 18 set.

2007.

KANG, J.-H. et al. Dietary Capsaicin Reduces Obesity-induced Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in Obese Mice Fed a High-fat Diet. **Obesity**, v. 18, n. 4, p. 780–787, 1 abr. 2010.

KESSLER, K.; PIVOVAROVA-RAMICH, O. Meal Timing, Aging, and Metabolic Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1911, 18 abr. 2019.

KOHSAKA, A. et al. High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 5, p. 414–421, nov. 2007.

KRAUCHI, K.; WIRZ-JUSTICE, A. Circadian rhythm of heat production, heart rate, and skin and core temperature under unmasking conditions in men. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 267, n. 3, p. R819–R829, 1 set. 1994.

KWON, D. Y. et al. Capsiate improves glucose metabolism by improving insulin sensitivity better than capsaicin in diabetic rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1078–1085, jun. 2013.

LAERMANS, J.; DEPOORTERE, I. Chronobesity: Role of the circadian system in the obesity epidemic. **Obesity Reviews**, v. 17, n. 2, p. 108–125, 2016.

LAMIA, K. A.; STORCH, K.-F.; WEITZ, C. J. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 39, p. 15172–15177, 30 set. 2008.

LEE, C. et al. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. **Cell**, 2001.

LEE, E. et al. Transient receptor potential vanilloid type-1 channel regulates diet-induced obesity, insulin resistance, and leptin resistance. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 8, p. 3182–3192, 2015.

LELIAVSKI, A. et al. Impaired glucocorticoid production and response to stress in arntl-deficient male mice. **Endocrinology**, v. 155, n. 1, p. 133–142, 2014.

LIU, S. et al. Involvement of the suprachiasmatic nucleus in body temperature modulation by food deprivation in rats. **Brain Research**, v. 929, n. 1, p. 26–36, mar. 2002.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

MASUDA, Y. et al. Upregulation of uncoupling proteins by oral administration of capsiate, a nonpungent capsaicin analog. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 6, p. 2408–2415, dez. 2003.

MILLS, C. et al. Effects of the transient receptor potential vanilloid 1 antagonist A-425619 on body temperature and thermoregulation in the rat. **Neuroscience**, v. 156, n. 1, p. 165–174, 2008.

MISHRA, S. K. et al. TRPV1-lineage neurons are required for thermal sensation. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 3, p. 582–593, 2 fev. 2011.

MISTLBERGER, R. E. Circadian food-anticipatory activity: Formal models and physiological mechanisms. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 18, n. 2, p. 171–195, jun. 1994.

MISTLBERGER, R. E. Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 4, p. 535–545, set. 2011.

MOHAWK, J. A.; GREEN, C. B.; TAKAHASHI, J. S. Central and peripheral circadian clocks in mammals. **Annual review of neuroscience**, v. 35, p. 445–62, 2012.

MORAES, M. N. et al. TRPV1 participates in the activation of clock molecular machinery in the brown adipose tissue in response to light-dark cycle.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, v. 1864, n. 2, p. 324–335, 2017.

MOTTER, A. L.; AHERN, G. P. TRPV1-null mice are protected from diet-induced obesity. **FEBS Letters**, v. 582, n. 15, p. 2257–2262, 2008.

MROSOVSKY, N. Masking: history, definitions, and measurement. v. 16, n. 4, p. 415–429, 1999.

MUKHERJI, A.; KOBIITA, A.; CHAMBON, P. Shifting the feeding of mice to the rest phase creates metabolic alterations, which, on their own, shift the peripheral circadian clocks by 12 hours. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 48, p. E6683–E6690, 2015.

NILIUS, B. et al. Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 165–217, jan. 2007.

OISHI, K. et al. Genome-wide Expression Analysis of Mouse Liver Reveals CLOCK-regulated Circadian Output Genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41519–41527, 17 out. 2003.

OISHI, K.; SHIRAI, H.; ISHIDA, N. CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor α (PPAR α) in mice. **Biochemical Journal**, v. 386, n. 3, p. 575–581, 15 mar. 2005.

OKAMURA, H.; YAMAGUCHI, S.; YAGITA, K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. **Cell and Tissue Research**, v. 309, n. 1, p. 47–56, 24 jul. 2002.

OOSTERMAN, J. E. et al. Impact of nutrients on circadian rhythmicity. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 308, n. 5, 2015.

PAGE, A. J. et al. The TRPV1 channel regulates glucose metabolism. **American**

Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, v. 317, n. 4, p. E667–E676, 2019.

PANCHAL, S.; BLISS, E.; BROWN, L. Capsaicin in Metabolic Syndrome. **Nutrients**, v. 10, n. 5, p. 630, 17 maio 2018.

PATAPOUTIAN, A. et al. Sensory systems: ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 7, p. 529–539, 2003.

PATEL, H.; BHARDWAJ, A. **Physiology, Respiratory Quotient**. [s.l.: s.n.].

PEDERSEN, S. F.; OWSIANIK, G.; NILIUS, B. TRP channels: An overview. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3- 4 SPEC. ISS., p. 233–252, 2005.

PENDERGAST, J. S. et al. Robust food anticipatory activity in BMAL1-deficient mice. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 2009.

PENDERGAST, J. S.; YAMAZAKI, S. The Mysterious Food-Entrainable Oscillator: Insights from Mutant and Engineered Mouse Models. **Journal of Biological Rhythms**, v. 33, n. 5, p. 458–474, 2018.

PITTENDRIGH, C. S. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. **Annual Review of Physiology**, v. 55, p. 16–54, 1993.

POTTER, G. D. M. et al. Nutrition and the circadian system. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 03, p. 434–442, 2016.

PREITNER, N. et al. The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 251–260, jul. 2002.

REFINETTI, R.; CORNÉLISSEN, G.; HALBERG, F. Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. **Biological Rhythm Research**, v. 38, n. 4, p. 275–325, ago. 2007.

REFINETTI, R.; MENAKER, M. Body temperature rhythm of the tree shrew, *Tupaia belangeri*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 263, n. 4, p. 453–457, 1 out. 1992.

REFINETTI, R.; MENAKER, M. The circadian rhythm of body temperature. **Frontiers in Bioscience**, v. 15, n. 1, p. 564, 2010.

REINKE, H. et al. factor 1 as a circadian transcription factor Differential display of DNA-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor. p. 331–345, 2008.

REZNICK, J. et al. Altered feeding differentially regulates circadian rhythms and energy metabolism in liver and muscle of rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 1, p. 228–238, 2013.

ROMANOVSKY, A. A et al. The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: A thermosensor it is not. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 3, p. 228–261, 2009.

SAKAGUCHI, R.; MORI, Y. Transient receptor potential (TRP) channels: Biosensors for redox environmental stimuli and cellular status. **Free Radical Biology and Medicine**, nov. 2019.

SALGADO-DELGADO, R. et al. Food intake during the normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work. **Endocrinology**, v. 151, n. 3, p. 1019–1029, 2010.

SALGADO-DELGADO, R. et al. Disruption of Circadian Rhythms: A Crucial Factor in the Etiology of Depression. **Depression Research and Treatment**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

SANTOSO, P. et al. Suprachiasmatic vasopressin to paraventricular oxytocin neurocircuit in the hypothalamus relays light reception to inhibit feeding behavior. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 315, n. 4, p. E478–E488, 1 out. 2018.

SCHEER, F. A. J. L. et al. Environmental light and suprachiasmatic nucleus interact in the regulation of body temperature. **Neuroscience**, v. 132, n. 2, p. 465–477, 2005.

SCHIBLER, U. et al. Clock-Talk: Interactions between central and peripheral circadian oscillators in mammals. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 80, p. 223–232, 2016.

SCHIBLER, U.; RIPPERGER, J.; BROWN, S. A. Peripheral Circadian Oscillators in Mammals: Time and Food. **Journal of Biological Rhythms**, v. 18, n. 3, p. 250–260, 29 jun. 2003.

SCHOELLER, D. A. et al. Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 7, p. 1882–1887, 1 out. 1997.

SHERMAN, H. et al. Timed high-fat diet resets circadian metabolism and prevents obesity. **FASEB Journal**, v. 26, n. 8, p. 3493–3502, 2012.

SLÁDEK, M.; HOUDEK, P.; SUMOVÁ, A. Circadian profiling reveals distinct regulation of endocannabinoid system in the rat plasma, liver and adrenal glands by light-dark and feeding cycles. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1864, n. 12, p. 158533, 2019.

SMOLANDER, J. et al. Circadian variation in peripheral blood flow in relation to core temperature at rest. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 67, n. 2, p. 192–196, ago. 1993.

SOKOLOVE, P. G.; BUSHELL, W. N. The Chi Square Periodogram: Its Utility for Analysis of Circadian Rhythms. **J. theor. Biol**, v. 72, p. 131–160, 1978.

SOTÁK, M. et al. Peripheral circadian clocks are diversely affected by adrenalectomy. **Chronobiology International**, v. 0528, n. April, p. 1–10, 2016.

STEINER, A. A. et al. Nonthermal Activation of Transient Receptor Potential

Vanilloid-1 Channels in Abdominal Viscera Tonicly Inhibits Autonomic Cold-Defense Effectors. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 28, p. 7459–7468, 2007.

STEINER, A. A. et al. Respiratory gas exchange as a new aid to monitor acidosis in endotoxemic rats: relationship to metabolic fuel substrates and thermometabolic responses. **Physiological Reports**, v. 5, n. 1, p. 1–16, 2017.

STEPHAN, F. K. Coupling between feeding- and light-entrainable circadian pacemakers in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 38, n. 4, p. 537–544, out. 1986.

STEPHAN, F. K. The “Other” Circadian System: Food as a Zeitgeber. **Journal of Biological Rhythms**, v. 17, n. 4, p. 284–292, 1 ago. 2002.

STOKKAN, K. A. et al. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. **Science**, v. 291, n. 5503, p. 490–493, 2001.

SUJINO, M. et al. Differential entrainment of peripheral clocks in the rat by glucocorticoid and feeding. **Endocrinology**, v. 153, n. 5, p. 2277–2286, 2012.

SUN, X. et al. Glucagon-CREB/CRTC2 Signaling Cascade Regulates Hepatic BMAL1 Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 4, p. 2189–2197, 23 jan. 2015.

TAKAHASHI, J. S. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 3, p. 164–179, 19 mar. 2017.

TAMARU, T. et al. Synchronization of circadian Per2 rhythms and HSF1-BMAL1:clock interaction in mouse fibroblasts after Short-Term heat shock pulse. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1–7, 2011.

TOMINAGA, M. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, n. 3, p. 531–543, 1998.

TUREK, F. W. Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice.

Science, v. 308, n. 5724, p. 1043–1045, 13 maio 2005.

VAN DER STELT, M.; DI MARZO, V. Endovanilloids: Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 10, p. 1827–1834, 2004.

VENNEKENS, R.; OWSIANIK, G.; NILIUS, B. Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channels: an Overview. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 18–31, 2008.

VITATERNA, M. H.; TAKAHASHI, J. S.; TUREK, F. W. Overview of circadian rhythms. **Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 25, n. 2, p. 85–93, 2001.

WAKAMATSU, H. et al. Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 1190–1196, mar. 2001.

WEBB, I. C. et al. Bidirectional interactions between the circadian and reward systems: is restricted food access a unique zeitgeber? **European Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 9, p. 1739–1748, nov. 2009.

WEHRENS, S. M. T. et al. Meal Timing Regulates the Human Circadian System. **Current Biology**, p. 1–8, 2017.

WEINERT, D.; WATERHOUSE, J. The circadian rhythm of core temperature: Effects of physical activity and aging. **Physiology and Behavior**, v. 90, n. 2–3, p. 246–256, 2007.

WELSH, D. K.; TAKAHASHI, J. S.; KAY, S. A. Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. **Annual Review of Physiology**, v. 72, n. 1, p. 551–577, 2010.

WESTERTERP-PLANTENGA, M. S.; SMEETS, A.; LEJEUNE, M. P. G. Sensory

and gastrointestinal satiety effects of capsaicin on food intake. **International Journal of Obesity**, v. 29, n. 6, p. 682–688, 21 jun. 2005.

WOODS, A. J. et al. Thermoregulatory effects of resiniferatoxin in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 264, n. 2, p. 125–133, 1994.

YAMAZAKI, S. Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. **Science**, v. 288, n. 5466, p. 682–685, 28 abr. 2000.

YANG, X. et al. Nuclear Receptor Expression Links the Circadian Clock to Metabolism. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 801–810, ago. 2006.

YASUMOTO, Y. et al. Short-term feeding at the wrong time is sufficient to desynchronize peripheral clocks and induce obesity with hyperphagia, physical inactivity and metabolic disorders in mice. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 65, n. 5, p. 714–727, 2016.

YE, R. et al. Dual modes of CLOCK:BMAL1 inhibition mediated by Cryptochrome and period proteins in the mammalian circadian clock. **Genes and Development**, v. 28, n. 18, p. 1989–1998, 2014.

YIN, L. et al. Rev-erb , a Heme Sensor That Coordinates Metabolic and Circadian Pathways. **Science**, v. 318, n. 5857, p. 1786–1789, 14 dez. 2007.

YOSHIOKA, M. et al. Effects of red pepper on appetite and energy intake. **British Journal of Nutrition**, v. 82, n. 2, p. 115–123, 9 ago. 1999.

ZHANG, S. et al. Capsaicin Reduces Blood Glucose by Increasing Insulin Levels and Glycogen Content Better than Capsiate in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 11, p. 2323–2330, 22 mar. 2017.

ZHOU, B. et al. CLOCK/BMAL1 regulates circadian change of mouse hepatic insulin sensitivity by SIRT1. **Hepatology**, v. 59, n. 6, p. 2196–2206, 2014.

ZSOMBOK, A. Vanilloid receptors - Do they have a role in whole body metabolism? Evidence from TRPV1. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 27, n. 3, p. 287–292, 2013.

ZYLKA, M. J. et al. Three period Homologs in Mammals: Differential Light Responses in the Suprachiasmatic Circadian Clock and Oscillating Transcripts Outside of Brain. **Neuron**, v. 20, n. 6, p. 1103–1110, jun. 1998.

9 APÊNDICES

APÊNDICE A

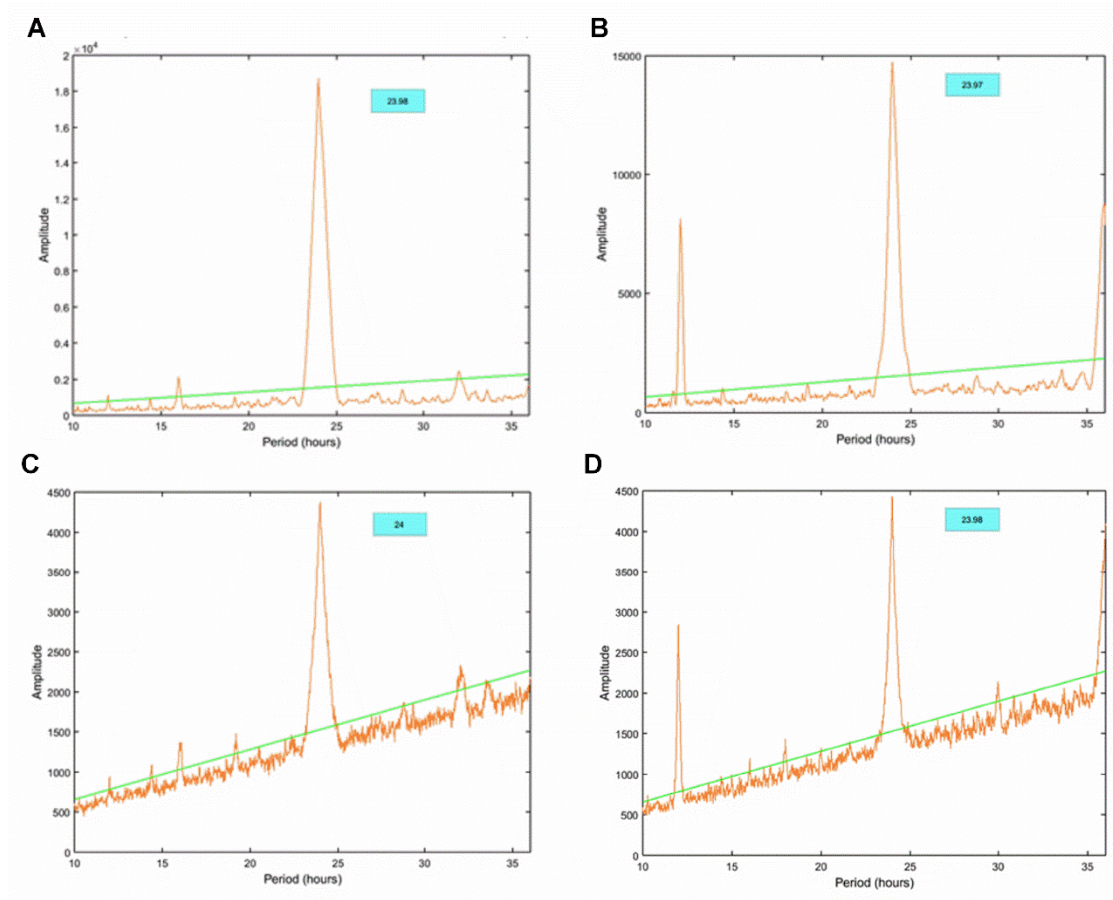


Figura 17: Periodograma representativo de um animal do grupo AD (A e C) e de um animal do grupo TR (B e D). Periodograma da $T_{interna}$ (A) e ALE (C) de um animal do grupo AD. Periodograma da $T_{interna}$ (B) e da ALE (D) de um animal do grupo TR. A linha verde representa o nível de significância calculado a partir do teste de qui-quadrado. O quadrado azul representa o valor do período (TAU). AD: *ad libitum*. TR: tempo restrito.

APÊNDICE B

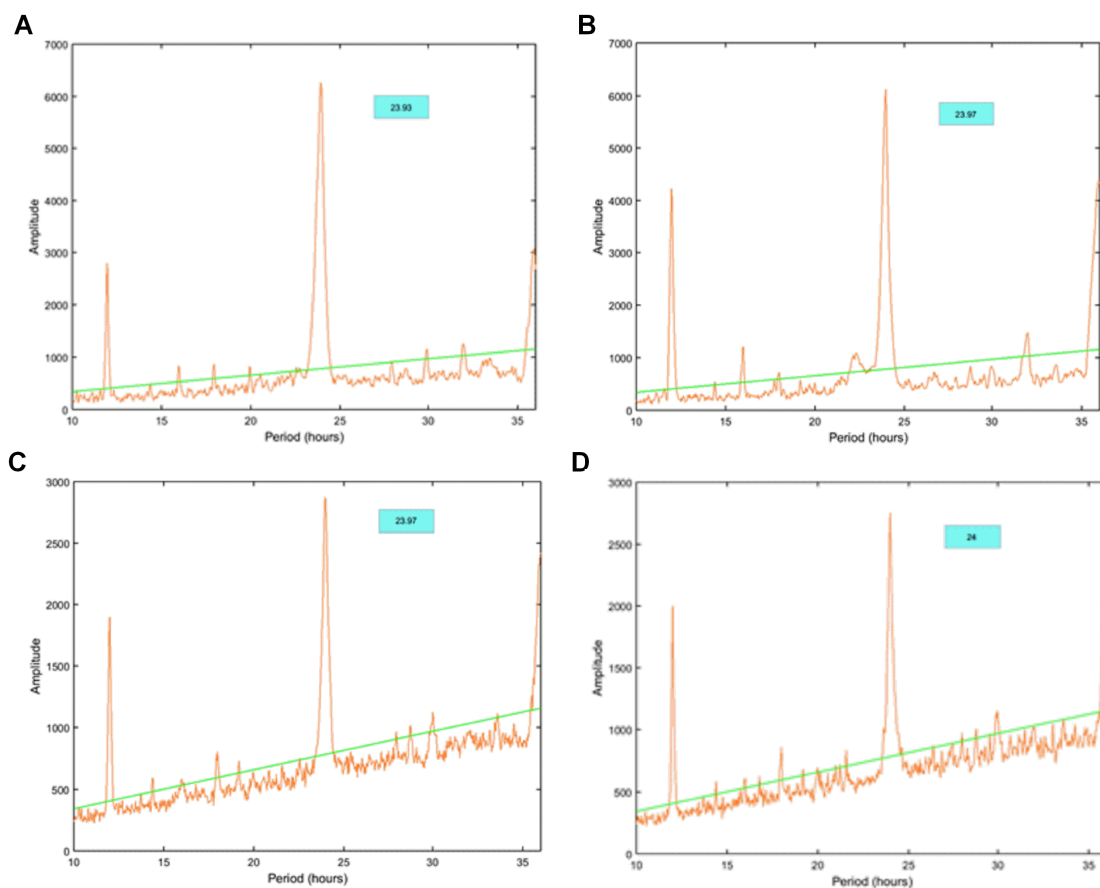


Figura 18: Periodograma representativo de um animal do grupo *Vehicle* (A e C) e de um animal do grupo RTX (B e D). Periodograma da $T_{interna}$ (A) e ALE (C) de um animal do grupo *Vehicle*. Periodograma da $T_{interna}$ (B) e da ALE (D) de um animal do grupo RTX. A linha verde representa o nível de significância calculado a partir do teste de qui-quadrado. O quadrado azul representa o valor do período (TAU). AD: ad libitum. TR: tempo restrito.