

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

Thais Santana Rocha Cardoso

**Participação do relógio biológico no efeito do estradiol sobre o ganho de
peso induzido pela ovariectomia**

Belo Horizonte

2016

Thais Santana Rocha Cardoso

Participação do relógio biológico no efeito do estradiol sobre o ganho de peso induzido pela ovariectomia

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof^a. Dr^a Maristela de Oliveira Poletini

Belo Horizonte

2016

043

Cardoso, Thais Santana Rocha.

Participação do relógio biológico no efeito do estradiol sobre o ganho de peso induzido pela ovariectomia [manuscrito] / Thais Santana Rocha Cardoso. - 2016.

93 f. : il. ; 29,5 cm.

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

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Fisiologia - Teses. 2. Ovariectomia - Teses. 3. Estradiol - Teses. 4. Ganho de peso. 5. Ritmo circadiano. I. Poletini, Maristela de Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

“Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais, é só fazer outras maiores
perguntas.”

João Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus por ter me apontado esse caminho e por ter me apresentado pessoas maravilhosas no universo da pesquisa.

Aos meus pais e ao meu irmão por serem tão companheiros e amorosos e por acreditarem nas minhas escolhas. Eles são fundamentais em cada passo que dou.

À professora Maristela por ser bem mais do que uma orientadora e por ter sido tão paciente e presente em me conduzir, ensinar e inspirar. O amor que ela tem pelo trabalho que realiza é encantador!

Agradeço à Nayara, querida amiga e veterana de mestrado, por todo o conhecimento que me transferiu e por todo aquele que construímos juntas. Por ser meu par nas noites compartilhadas em colchões infláveis na ocasião dos experimentos e por ter insistido que eu usasse meu caderno de protocolo. Parceria forte essa nossa! Ao Mauro e ao Frederico por terem feito dos “sacrifícios” momentos menos sacrificantes e por terem me ensinado tudo que eu não sabia de laboratório, inclusive a enumerar tubos eppendorfs (rs). Nós compartilhamos muita coisa e vocês sabem que foram indispensáveis para a conclusão desse trabalho.

À Andreza, aluna de iniciação científica que tanto me auxiliou com as ovariectomias.

À Flavinha e à Paola, que chegaram depois, mas que também se disponibilizaram a ajudar com ternura e boa vontade.

Aos meninos do Núcleo de Neurociências Luciana, Vinicius e Hyorrana que viram no nosso laboratório um “aconchego”, quando na verdade a nossa amizade foi quem nos trouxe tamanha cumplicidade. Obrigada pelas conversas científicas, pelas tortas e sanduiches!

Ao Lucas, que se prontificou a ajudar em todas as dificuldades que encontrei na reta final. Obrigada pelos programas instalados, pelos gráficos, atenção e carinho.

Aos colegas do laboratório de Endócrino que sempre me receberam de braços abertos e compartilharam, além do espaço e dos equipamentos já bastante disputados, momentos de descontração e alegria.

À professora Janete Aparecida Anselmo Franci da USP pelas dosagens hormonais.

A Cynthia e ao Rodner, da secretaria, que sempre se prontificaram a ajudar com os processos burocráticos.

Ao Sílvio e ao Claudiomar, bioteristas dedicados, que durante todo esse tempo cuidaram com carinho dos animais e fizeram o que estava ao alcance deles para facilitar meus experimentos.

Aos professores do departamento que auxiliaram na minha formação e que se empenham em manter a qualidade do programa.

As agências de fomento, Capes e CNPQ que me concederam a bolsa de mestrado e à FAPEMIG pelo auxílio financeiro para execução do projeto. É com muita alegria que encerro mais essa etapa.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALE – atividade locomotora espontânea

ANOVA - análise de variância

AVP - arginina vasopressina

AgRp - peptídeo relacionado a agouti

Bmal1 – *brain and muscle Arnt-like protein 1*

CART – fator de transcrição regulado por anfetamina e cocaína

CCK - colecistoquinina

Ck1 ϵ/γ - Caseína quinase 1 ϵ

Clock - *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*

Cry - *criptochrome*

E2 - estradiol

ER α - receptor alfa de estradiol

ER β - receptor beta de estradiol

FSH- hormônio folículo estimulante

GRP - hormônio liberador de gastrina

LH - hormônio luteinizante

NADH - nicotinamida adenina dinucleótido hidreto

NMS - neuromedina S

NMU2R- receptor de neuromedina do tipo 2

NSQ - Núcleo supraquiasmático

NPY - neuropeptídeo Y

OVX - ovariectomizadas

Per - *period*

PPα - receptor de ativação da proliferação peroxissomal do tipo alfa

PPγ - receptor de ativação da proliferação peroxissomal do tipo gama

POMC - pro-opiomelanocortina

s.c.- subcutâneo

SF-1 - fator esteroideogênico

SHR - ratas espontaneamente hipertensas

SIRT-1 - deacetilase sirtuina 1

TAM - tecido adiposo mesentérico

TAP- tecido adiposo perigonadal

TAR - tecido adiposo retroperitoneal

T - temperatura

VIP - polipeptídeo vasoativo intestinal

VLDL - lipoproteína de densidade muito baixa

ZT - *zeitgeber*

α-MSH - hormônio estimulante de melanócito tipo alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático da divisão do relógio biológico em seus componentes central (NSQ) e periférico.....	22
Figura 2. Desenho esquemático da maquinaria molecular do relógio biológico em mamíferos.....	26
Figura 3. Representação esquemática do tratamento com estradiol ou óleo de milho via injeção.....	37
Figura 4. Representação esquemática do tratamento com estradiol ou óleo de milho via implante.....	38
Figura 5. Avaliação de peso uterino relativo.....	49
Figura 6. Concentrações plasmáticas de LH.....	50
Figura 7. Análise da variação do ganho de peso.....	50
Figura 8. Análise do peso relativo dos tecidos adiposos retroperitoneal (TAR), mesentérico (TAM) e perigonadal (TAP).....	52
Figura 9. Análise dos níveis de RNAm relativo do gene <i>Bmal1</i> do tecido adiposo retroperitoneal de ratas ovariectomizadas (OVX) 14 dias após inserção de implante..	53
Figura 10. Análise dos níveis de RNAm relativo dos genes <i>Per1</i> e <i>Bmal1</i> do tecido adiposo retroperitoneal de ratas tratadas com 3 injeções.....	54
Figura 11. Análise dos níveis de RNAm relativo do gene <i>Reverb-α</i> do tecido adiposo retroperitoneal de ratas tratadas com 3 injeções	55
Figura 12. Actograma representativo de uma rata ciclando regularmente (intacta), OVX e tratada com implantes.....	57

Figura 13. Actograma representativo de uma rata ciclando regularmente (intacta), OVX e tratada com injeções.....	58
Figura 14. Análise dos parâmetros do ritmo de ALE.....	59
Figura 15. Análise da amplitude do ritmo circadiano de atividade locomotora.....	60
Figura 16. Variação da temperatura interna de ratas intactas ou ovariectomizadas (OVX).....	61
Figura 17. Variação da temperatura interna de ratas OVX+ Implantes.....	62
Figura 18. Variação de temperatura interna de ratas OVX + Injeções.....	62
Figura 19. Análise da amplitude do ritmo circadiano de temperatura interna.....	63
Figura 20. Modelo de funcionamento do relógio biológico no tecido adiposo branco..	72
Figura 21. Representação esquemática do efeito do estradiol sobre o sistema circadiano.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de <i>primers</i> utilizados no qPCR.....	44
Tabela 2. Valores da média de Tinterna dos animais do grupo intactas e do grupo OVX nos horários que ocorreram diferenças significativas.....	91
Tabela 3. Valores da média de Tinterna dos animais tratados com injeções de cipionato de E2 ou de óleo nos horários que ocorreram diferenças significativas.....	92

RESUMO

O balanço energético depende do funcionamento da maquinaria molecular do relógio biológico de tal maneira que animais nocautes para genes de relógios são obesos. A ovariectomia promove ganho de peso corporal em ratas, um efeito similar ao observado em mulheres após o período da menopausa. Sabe-se que o tratamento de reposição hormonal estrogênica é capaz de reverter este quadro. Diante disso, levantamos a hipótese de que a função do estradiol em reverter o ganho de peso induzido pela retirada dos ovários seja via sua ação sobre o relógio biológico. Avaliamos, assim, o efeito da injeção com cipionato de estradiol (E2-injeção, 10 µg/0,2mL) ou do 17β-estradiol (E2, 180 µg/mL) em implantes feitos com tubos de silastic s.c. sobre variação de peso corporal, variação do peso de tecido adiposo branco e sobre os parâmetros do ritmo circadiano (amplitude do ritmo, padrão de atividade locomotora e temperatura corporal) de ratas ovariectomizadas. Para registro de atividade locomotora, foram inseridos na cavidade abdominal dos animais sensores de telemetria. Além disso, investigamos a expressão dos genes de relógio (*Per1*, *Bmal1* e *Reverb-α*) no tecido adiposo branco retroperitoneal (TAR), uma vez que este apresentou uma redução significativa de peso após ambos os tratamentos com estradiol. Estes tratamentos também foram capazes de reduzir o ganho de peso induzido pela ovariectomia. Injeções de cipionato de E2 aumentou expressão de *Per1* e *Reverb-α* e não alterou a expressão de *Bmal1*. Já a expressão de *Bmal1* apresentou variações temporais nos animais com implantes de 17β-E2, com níveis aumentados no ZT0. O início da atividade locomotora foi antecipado após 7 e 11 dias de ovariectomia e houve uma tendência a um atraso nesse horário após 21 de ovariectomia. O horário do

final da atividade não foi alterado, bem como não foram observadas variações nos horários de acrofase após os tratamentos com E2. No que se refere aos valores de temperatura corporal, observou-se diferença estatística entre os animais intactos e os animais ovariectomizados, sendo a temperatura maior nas ratas intactas durante a fase clara. Já os animais tratados com injeções de cipionato de E2 apresentaram temperatura interna maior que os tratados com injeções de óleo durante a fase escura. O tratamento com implantes de 17β -E2 não alterou o perfil circadiano tão pouco os valores de temperatura. A amplitude do ritmo de temperatura interna dos animais foi reduzida após 7 dias de ovariectomia e ficou ainda maior que a de animais intactos após 21 dias após a inserção de implantes com 17β -E2 ou óleo. Em conclusão, os efeitos de redução no ganho de peso promovido pelo E2 podem ser resultantes da ação deste hormônio sobre a sincronização do relógio biológico periférico presente no tecido adiposo, uma vez que a expressão dos genes do relógio alterou-se após os tratamentos. Além disso, o estradiol parece influenciar o relógio central, localizado no núcleo supraquiasmático, uma vez que, levou a alterações no ritmo circadiano de temperatura interna.

Palavras-chave: ritmo circadiano, estradiol, ovariectomia, ganho de peso, tecido adiposo retroperitoneal

ABSTRACT

Energy balance depends on the functioning of biological clock molecular machinery in such a way that clock-genes-knockout mice are obese. In rats, ovariectomy causes body weight gain, similar effect observed in post-menopausal women. It is known that estrogenic hormonal replacement is capable of reverting this condition. In light of this we hypothesize that estradiol's role in reducing body weight gain induced by ovariectomy could be via its action over biological clock. We evaluated the effects of cypionate of estradiol injections (E2-injected, 10 µg/0,2mL) and the effects of 17-β- estradiol (17β-E2-*Pellet*, 180 µg/mL) in silastic pellets over body-weight changes, white adipose tissue weight and circadian rhythms parameters (rhythm amplitude, spontaneous locomotor activity and core temperature pattern) of ovariectomized (OVX) rats.

For spontaneous locomotor activity and core temperature pattern recordings, telemetry sensors were implanted into the animals' abdominal cavities. Besides, we investigated clock genes expression (*Per1*, *Bmal1* and *Rev-erba*) in retroperitoneal white adipose tissue (TAR) once this tissue showed a weight reduction after estradiol treatment. Both estradiol treatments were able to reduce body weight gain induced by ovariectomy. After E2-injected administration, *Per1* mRNA expression was elevated. *Bmal1* expression temporally varied in 17β-E2-*Pellet* group, with higher levels at ZT0, while E2-Injected animals did not show any difference in *Bmal1* mRNA expression. E2-injected treatment also elevated *Reverb-α* expression. The onset of activity was anticipated after 7 and 10 days of ovariectomy and there was a tendency for a delay in this time after 21 days. Offset and acrophase were not altered after both E2 treatments

(injection of ciprofloxacin or E2 or 17 β -E2-Pellet). Concerning the core temperature, it was observed a statistical difference among intact and OVX rats, the first group showing higher core temperature values at light phase. E2-injected rats showed higher core temperature than Oil-injected rats at dark phase. E2-*Pellet* and Oil-*Pellet* groups did not differ statistically in core temperature, but apparently, E2-*Pellet* rats showed higher core temperature values. The amplitude of core temperature rhythm was reduced after 7 days of ovariectomy and it was higher than the intact rats after 21 days of *pellet* implantation. In conclusion, the effects of body weight gain reduction caused by E2 treatment can be a result of the action of this hormone over the biological clock synchronization within white adipose tissue (peripheral clock) considering that clock gene expression was altered in this tissue after E2 treatment. Furthermore, estradiol seems to influence on central clock, in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus, because this hormone changed the circadian rhythm of core temperature.

Key words: circadian rhythms, estradiol, ovariectomy, body weight-gain, retroperitoneal white adipose tissue

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA.....	19
2. INTRODUÇÃO.....	21
2.1 Relógio Biológico	21
2.2 Maquinaria do Relógio Biológico.....	25
2.3 Relógio Biológico e Metabolismo	28
2.4 Relógio Biológico e Estradiol.....	29
2.5 Estradiol e Metabolismo.....	31
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Animais	36
4.2 Ciclo Estral.....	36
4.3 Padronização da dose e tempo do tratamento com estradiol	37
4.4 Ovariectomia e tratamento hormonal.....	37
Análise dos efeitos do tratamento hormonal sobre o ganho de peso	39
4.5 Análise dos efeitos do tratamento hormonal sobre a expressão gênica	40
4.6 Análise dos efeitos do tratamento hormonal sobre parâmetros circadianos....	41
4.7 Extração de RNA e Real-Time PCR	42
4.8 Dosagem plasmática de hormônio luteinizante.....	46
4.9 Análise dos dados.....	47
5. RESULTADOS	48

5.1	Tratamento hormonal com estradiol altera parâmetros morfológicos e fisiológicos em ratas ovariectomizadas.	48
5.2	Efeito do tratamento com estradiol sobre ganho de peso corporal e sobre peso dos tecidos adiposos brancos	52
5.3	Efeito do tratamento com <i>pellet</i> de estradiol sobre expressão temporal de <i>Bmal1</i> no TAR em ratas ovariectomizadas.....	54
5.4	Efeito da injeção de estradiol sobre a expressão dos genes <i>Per1</i> e <i>Bmal1</i> em ratas ovariectomizadas.....	55
5.5	Efeito da injeção de estradiol sobre a expressão do gene <i>Reverb-a</i> em ratas ovariectomizadas.....	56
5.6	Actograma típico de ratas em ciclo regular, ovariectomizadas e tratadas com E2- <i>Pellet</i>	57
5.7	Actograma típico de ratas em ciclo regular, ovariectomizadas e tratadas com E2-injeção.....	57
5.8	Análise de Parâmetros do ritmo de atividade locomotora	60
5.9	Análise da Amplitude do ritmo de atividade locomotora.....	61
5.10	Análise da variação de temperatura interna	62
5.11	Análise da amplitude do ritmo de temperatura interna.....	64
6.	DISCUSSÃO.....	65
6.1	Padronização do modelo “crônico” de tratamento com estradiol	65
6.2	Efeito do estradiol sobre o ganho de peso	66
6.3	Efeito do estradiol sobre o relógio local	68
6.4	Efeito do estradiol sobre o relógio central: avaliação do ritmo circadiano de atividade locomotora.....	73

6.5	Efeito do estradiol sobre o relógio central: avaliação do ritmo circadiano de temperatura interna	77
7.	CONCLUSÃO	80
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
9.	ANEXOS.....	93

1. JUSTIFICATIVA

A cirurgia de ovariectomia tem sido amplamente descrita na literatura como capaz de ocasionar ganho de peso corporal e aumento na ingestão alimentar em ratas, situação revertida com tratamento de reposição hormonal (Gambacciani *et al.*, 2001; Geary, 2001; Asarian e Geary, 2006; Pantaleao *et al.*, 2010). A retirada abrupta do estradiol relaciona-se, também, com alterações do ritmo circadiano de sono vigília, havendo uma redução da supressão do sono observada durante o pico de estradiol proveniente do proestro. Essa supressão é reestabelecida com o tratamento de reposição hormonal (Schwartz e Mong, 2013).

A retirada dos ovários tem sido empregada como modelo de menopausa em ratas visto que as mesmas não apresentam uma resposta biológica de falência ovariana como acontece em mulheres. A partir da meia idade, ratas podem apresentar ciclos regulares, ciclos irregulares, ou se tornarem completamente acíclicas, estes períodos de transição são semelhantes aos períodos de pré-menopausa, perimenopausa e pós-menopausa nos quais passam as mulheres antes da falência reprodutiva. Este processo de transição, em ratas, inicia-se aproximadamente entre os 10 e 12 meses de idade e pode levar vários meses (Lefevre e Mcclintock, 1988).

A organização Mundial de Saúde define menopausa como a interrupção permanente da menstruação resultante da perda da atividade folicular ovariana (Who, 1996) levando a uma redução acentuada na produção de estrógenos e progesterona (Burger *et al.*, 2002). Mulheres na menopausa apresentam alterações fisiológicas que resultam em redução do gasto energético e oxidação de gordura, o que predispõe um ganho de peso, aumento do percentual de gordura corporal e uma redistribuição do

tecido adiposo (Reimer *et al.*, 2005; Lovejoy *et al.*, 2008). Essas alterações aumentam a circunferência abdominal, o que potencializa os riscos de infarto do miocárdio, hipertensão e de desenvolvimento de síndrome metabólica (Van Der Schouw *et al.*, 1996).

Tendo em vista que a ovariectomia ocasiona ganho de peso corporal e alterações no ciclo sono vigília, processos decorrentes, também, da menopausa, acreditamos estar consolidando um modelo animal para o estudo das alterações fisiológicas da menopausa, ampliando o escopo de mecanismos pelos quais o estradiol regula o metabolismo energético, a redistribuição de gordura e componentes do relógio biológico.

2. INTRODUÇÃO

2.1 Relógio Biológico

O período de rotação da Terra ao redor do próprio eixo acontece em aproximadamente 24 horas e cria um ciclo de luminosidade/escuridão que afeta o estilo de vida de todos os organismos. A adaptação dos seres vivos a essas oscilações diárias do ambiente resultou em ciclos de atividade que respeitam os horários nos quais há maior disponibilidade de alimentos, menor variedade de predadores e condições climáticas favoráveis. Antecipar-se às mudanças diárias, ao invés de apenas reagir a elas, é um mecanismo que visa favorecer os indivíduos em seus ajustes comportamentais e fisiológicos frente às mudanças externas e aos parâmetros internos (Dodd *et al.*, 2005).

Os relógios biológicos são sistemas de controle de tempo que permitem essas antecipações por parte dos organismos de modo a gerar uma adaptação fisiológica e/ou comportamental compatível com a hora do dia (Albrecht, 2012). Os relógios biológicos são encontrados nos mais diversos organismos, incluindo cianobactérias, plantas, fungos e mamíferos (Sancar e Brunner, 2014). A capacidade antecipatória desses ritmos circadianos pode ser exemplificada pelo fato de que as plantas induzem a expressão de genes fotossintéticos algumas horas antes do nascer do sol a fim de otimizar o processo de fotossíntese (Dodd *et al.*, 2005).

Em humanos, os ciclos de sono e vigília, frequência cardíaca, pressão arterial, temperatura corporal, metabolismo e secreção hormonal são controlados pelo ritmo circadiano, determinado pelo relógio biológico (Portaluppi *et al.*, 1996; Rabinowitz,

1996; Roenneberg e Merrow, 1999). Os relógios biológicos são caracterizados por três propriedades: (1) as oscilações circadianas quando em condições constantes, persistem por um período aproximado de 24 horas (auto sustentadas); (2) o comprimento do período permanece estável dentro de uma ampla variação fisiológica de temperatura (compensado pela temperatura) e (3) podem ser sincronizados por pistas ambientais rítmicas tais como luz, temperatura e disponibilidade de alimentos (arrastável) (Sancar e Brunner, 2014). Essas pistas ambientais são denominadas *zeitgebers*, uma palavra do idioma alemão que significa doadores de tempo (Aschoff, 1978), e é comumente empregada na literatura sobre ritmos biológicos. A luz é o agente que mais fortemente ajusta as oscilações endógenas. Na ausência de pistas ambientais, em especial em escuridão constante, o relógio biológico assume seu período próprio que pode ser um pouco maior ou menor do que o período de 24 horas ajustado pelo ciclo de luminosidade/escuridão ou outro *zeitgeber*. Nessas circunstâncias, diz-se que o animal está em *free-running* ou livre curso (Pittendrigh, 1993).

Em mamíferos, o sistema circadiano é composto por dois integrantes principais: o relógio central, localizado no núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo e os relógios periféricos presentes nas células dos mais diversos tecidos tais como fígado, rins, útero, pulmão, córnea e tecido adiposo branco (Yoo *et al.*, 2004; Bray e Young, 2009). O NSQ de ratos é dividido em dois núcleos, o ventrolateral e o dorsomedial. Neurônios da região dorsomedial produzem, predominantemente, VIP (peptídeo vasoativo intestinal) e GRP (hormônio liberador de gastrina) e representam 43% da população neuronal do NSQ. Já neurônios da parte dorsal produzem AVP (arginina

vasopressina) (Moore *et al.*, 2002). Essa organização é observada, também em humanos, nos quais células contendo VIP e AVP estão presentes no NSQ (Buijs *et al.*, 1995). Neurônios da região dorsal estão envolvidos com a sincronização do relógio, possivelmente por ser a região que recebe as informações fóticas, enquanto os da região ventral são responsáveis por gerar o sinal de saída do NSQ e, possivelmente, iniciar os ritmos circadianos (Hamada *et al.*, 2001). A figura 1 representa um modelo esquemático dos relógios central e periféricos.

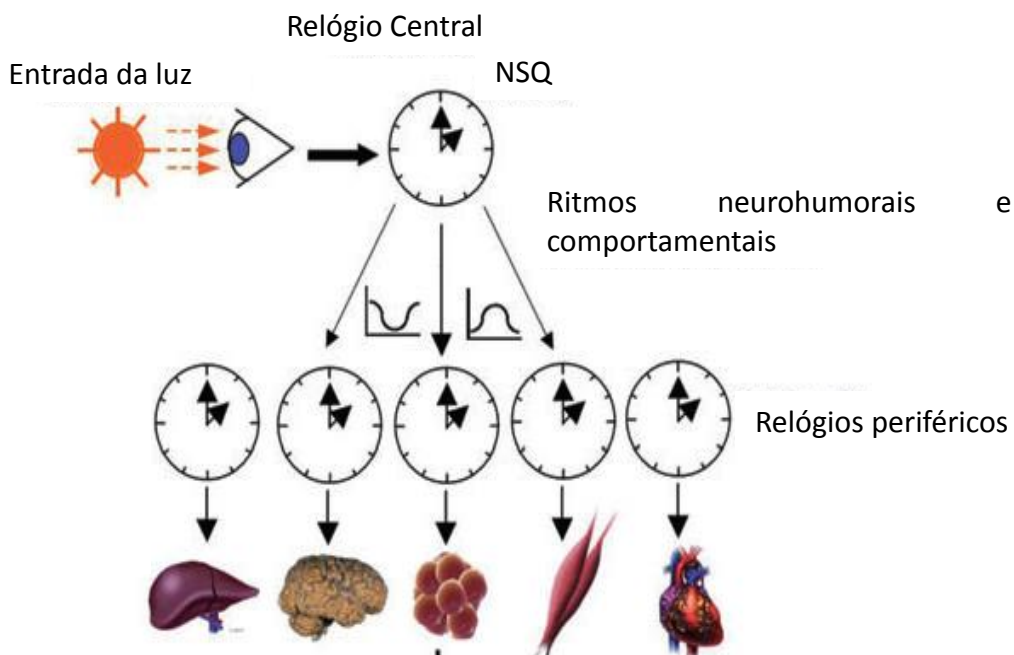


Figura 1. Adaptado de Bray e Young (2009). Desenho esquemático da divisão do relógio biológico em seus componentes central (NSQ) e periféricos (fígado, cérebro, tecido adiposo branco, músculo, coração)

O núcleo supraquiasmático compõe o topo de uma cadeia hierárquica responsável por gerar ritmos circadianos de comportamento e atividade locomotora (Yoo *et al.*, 2004) porque é capaz de expressar oscilações persistentes e auto-sustentadas por até 30 ciclos após isolamento, enquanto os ritmos periféricos perdem

essa capacidade após 2 ou mais ciclos (Yamazaki *et al.*, 2000). A lesão do NSQ leva à perda do padrão rítmico de expressão gênica nos tecidos periféricos (Akhtar *et al.*, 2002), ou ocasiona uma perda na sincronia de fases entre os tecidos de um mesmo animal ou entre animais (Yoo *et al.*, 2004). O núcleo supraquiasmático recebe informações do meio externo, em especial das células da retina. Dentre estas células, existem as intrinsecamente fotossensíveis, as quais expressam melanopsina, e comunicam o sinal luminoso para o NSQ, diretamente, pelo trato retino-hipotalâmico (Challet, 2015; Van Diepen *et al.*, 2015).

A temperatura corporal de mamíferos apresenta variação circadiana. Experimentos com macacos expostos a ciclos de luz constante e morcegos, a escuro constante revelaram a persistência dessa oscilação mesmo em face da ausência da pista ambiental (ciclo claro/escuro) comprovando que o ritmo de temperatura interna é uma variável de controle circadiano (Simpson, 1906; Aschoff, 1990). Uma ferramenta de controle do bom funcionamento do relógio central é a análise de parâmetros da atividade locomotora uma vez que uma alteração na sincronização do relógio central pode alterar os horários de início, pico ou término dessa variável, denominados *onset*, *acrofase* ou *offset*, respectivamente. Além disso, em análises de sincronização do relógio central é comum avaliar-se a amplitude da atividade locomotora ou da temperatura interna que é dada pela diferença entre o ponto mais alto e mais baixo da curva, ou seja, valores mais altos menos os mais baixos (Royston *et al.*, 2014).

O NSQ dita o ritmo dos relógios periféricos, no entanto, não está completamente elucidado como os relógios biológicos interagem com as pistas externas (ambientais) ou internas (sinais humorais, hormonais ou neurais) promovendo a sincronização dos

múltiplos relógios periféricos (Albrecht, 2012), situação desejável para que as respostas fisiológicas ocorram organizadas temporalmente. Uma hipótese aventada como mecanismo de ajuste ou sincronização dos relógios a pistas internas seria a de que a maquinaria molecular do relógio responderia a variações hormonais. Por exemplo, Balsalobre *et al.* (1998) demonstraram, em cultura, que uma população de fibroblastos apresentou expressão circadiana de *Per1* após tratamento com um análogo dos glicocorticoides. Acredita-se, ainda, que o NSQ sincronize os relógios periféricos através de pistas químicas, como a secreção hormonal, ou conexões sinápticas (Shibata e Tominaga, 1991; Damiola *et al.*, 2000). Por outro lado, outras pistas ambientais, como a alimentação, são capazes de alterar parâmetros do relógio periférico, mas não do central (Damiola *et al.*, 2000) demonstrando que além do ritmo ditado pelo relógio central, os periféricos são sincronizados, também por outros fatores.

2.2 Maquinaria do Relógio Biológico

O primeiro estudo que identificou a existência de uma maquinaria genética de regulação do funcionamento do ritmo circadiano foi realizado em *Drosophila* a partir de mutações genéticas que tiveram como consequência insetos arrítmicos ou com alteração de período do ritmo circadiano (Konopka e Benzer, 1971).

O relógio molecular é composto por genes denominados genes de relógio que se auto-regulam através de alças de retroalimentação positivas e negativas que são reiniciadas a cada 24 horas aproximadamente. Em mamíferos, os genes *Clock* (*circadian locomotor outpus cycles kaput*) e *Bmal1* (*brain and muscle ARNT-like1*) dimerizam-se e ligam-se à região promotora E-box de elementos que expressam a

porção repressiva do relógio biológico, o que inclui *cryptochromes* 1 e 2 (*Cry1/2*), *periods* 1, 2 e 3 (*Per1/2/3*) e os receptores nucleares *Rev-erba* e *Rev-erbβ*. As proteínas *PER* e *CRY* formam um heterodímero que retornam ao núcleo celular e inibem a ação estimulatória do dímero *CLOCK:BMAL1*. *Rev-erba/β*, por sua vez, ao recrutarem uma histona deacetilase 3, reprimem a síntese de *Bmal1*. Outra classe de receptores nucleares órfãos que tem transcrição induzida por *CLOCK/BMAL1* é o *ROR-α/γ* que funciona como ativador da maquinaria circadiana ao atuar positivamente na alça de retroalimentação que ativa a expressão de *Bmal1*. Ele compete com *Rev-erba/β* pelo mesmo sítio de ligação. Além disso, a caseína quinase 1δ and -ε desempenha uma função importante nesse processo porque é capaz de fosforilar e desestabilizar as proteínas *PER* (Ko e Takahashi, 2006; Zhang *et al.*, 2014; Schibler *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016). A Figura 2, adaptada de um trabalho realizado por nosso grupo (Poletini *et al.*, 2015), apresenta um esquema representativo dessa alça molecular.

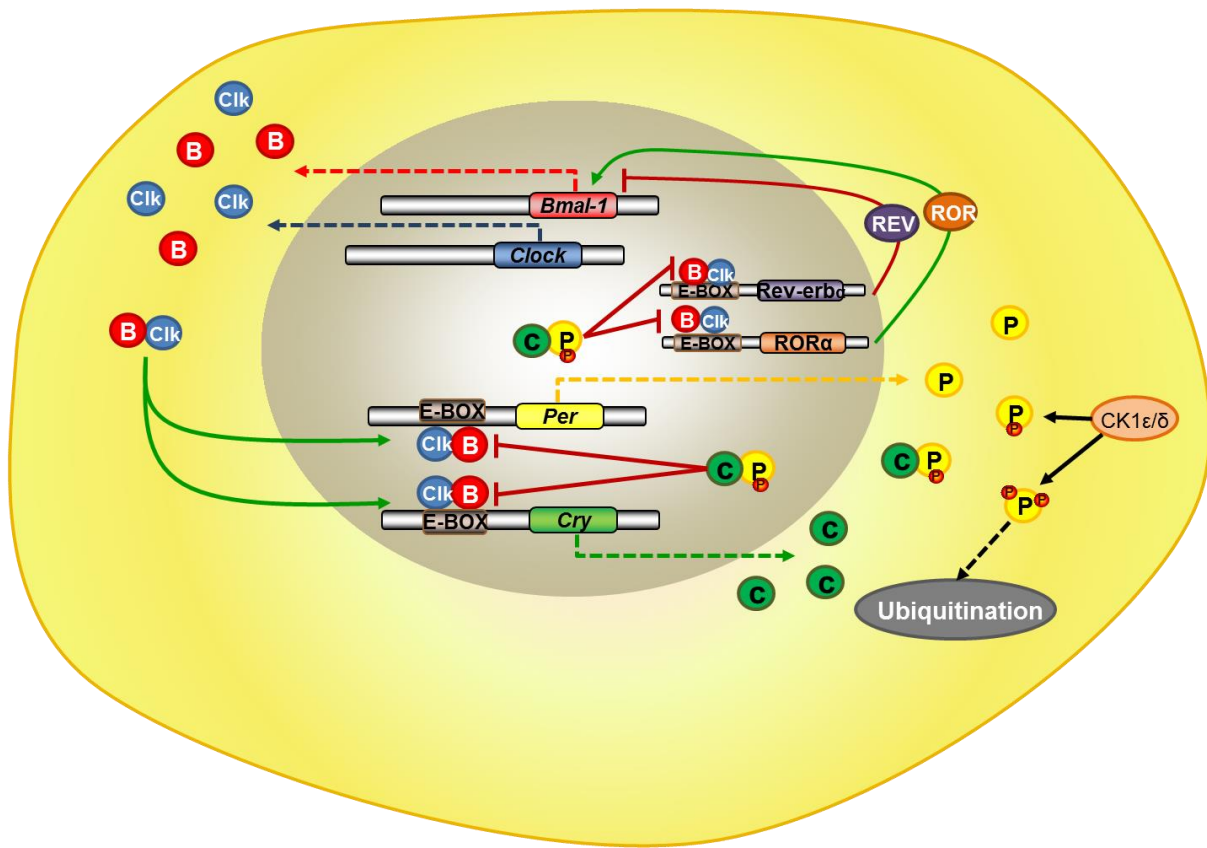


Figura 2. Desenho esquemático da maquinaria molecular do relógio biológico em mamíferos adaptado de Poletini et al, 2015. O heterodímero CLOCK/BMAL1 é um fator de transcrição da região E-box de genes como *Per*, *Cry*, *Reverba* e *Rora*. PER e CRY também formam heterodímeros que podem ser fosforilados pela caseína kinase1 ϵ/γ , o que resulta em ubiquitinações ou em migração para o núcleo onde inibem ação do CLOCK:BMAL1. A transcrição de *Bmal1* pode ser inibida pela proteína Rev-erba ou ativada por ROR α . Clk = proteína CLOCK; B = proteína BMAL1; C = proteína CRY; P = proteína PER; CK1 ϵ/γ = caseína kinase1 ϵ/γ ; círculos vermelhos ligados ao PER = sítios de fosforilação; setas pretas sólidas = fosforilação pela CK1; setas pontilhadas pretas = ubiquitinação seguida de degradação protéica; setas sólidas e vermelhas = inibição; setas sólidas e verdes = estimulação; setas pontilhadas vermelhas, verdes, azuis e amarelas = transcrição e translação dos respectivos genes de relógio

2.3 Relógio Biológico e Metabolismo

Sabemos que várias vias metabólicas possuem suas enzimas chaves de controle expressas de forma circadiana (Panda *et al.*, 2002) e que muitas delas têm, de fato, sua expressão regulada pelas proteínas de relógio (Kornmann *et al.*, 2007). Ao nível celular, *Bmal1* regula a diferenciação e a lipogênese de adipócitos (Shimba *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2012). Camundongos mutantes para *Bmal1* no pâncreas apresentam diabetes (Marcheva *et al.*, 2010). Também demonstrando os efeitos dos genes de relógio sobre o metabolismo é sabido que *Per2* é capaz de reprimir a expressão de PPAR γ , receptor nuclear envolvido na sensibilidade à insulina e adipogênese. Camundongos deficientes em *Per2* apresentam redução dos níveis totais de triacilglicerol e de ácidos graxos não esterificados (Grimaldi *et al.*, 2010). O receptor nuclear Rev-erba também está amplamente associado ao metabolismo de modo que nocautes para esse componente do relógio apresentam aumento de adiposidade (Delezie *et al.*, 2012).

Por fim, os genes de relógio levam a uma expressão rítmica de genes associados ao metabolismo tais como receptor de glucagon, receptores de glicose e enzimas da biossíntese de colesterol (Panda *et al.*, 2002). Alguns estudos tem demonstrado que sensores energéticos das células são capazes de se comunicar com o relógio biológico. Nesse sentido, as formas reduzidas do cofactor NADH aumentam a atividade do heterodímero CLOCK/BMAL1 enquanto as formas oxidadas NAD $^{+}$ inibem essa mesma atividade. A deacetilase sirtuina 1 (SIRT1) dependente de NAD $^{+}$, que tem sua ação induzida pelos baixos níveis de nutrientes também se liga a CLOCK/BMAL1 para regular a expressão dos genes de relógio (Huang *et al.*, 2011).

2.4 Secreção de estradiol e ciclo estral

O ciclo reprodutivo de roedores, denominado ciclo estral, apresenta duração de aproximadamente 4 dias e divide-se em proestro, estro, metaestro e diestro. No proestro, a rata encontra-se receptiva ao macho e é nessa fase em que ocorrem os picos de gonadotrofinas que culminam na ovulação (Franci et al, 2005). O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), liberado pelo hipotálamo, regula a produção de outros dois, a saber, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH). Ambos agem nos ovários para produzir estrógeno e progesterona (White, 2009). O estradiol secretado pelas gônadas é o que regula a atividade dos neurônios GnRH. Elucidar os mecanismos pelos quais esse efeito ocorre tem sido uma tarefa difícil devido a existência de um processo de retroalimentação negativa e outro de retroalimentação positiva exercida pelo estradiol, os quais resultam em supressão ou estímulo da secreção de LH. A retroalimentação positiva acontece no meio do ciclo ovariano, em um período crítico da tarde de proestro, poucas horas antes das luzes se apagarem, para gerar o pico preovulatório de GnRH que leva à ovulação (Chappell *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2010; Cheong *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015). Por esse motivo, lesões do núcleo supraquiasmático, localizado no hipotálamo, abolem o pico de LH e, conseqüentemente, a ovulação (Wiegand *et al.*, 1980). Já a retroalimentação negativa é exercida pelos esteroides ovarianos (estrogênios e progesterona), sendo responsável por manter os níveis de LH baixos na maior parte do ciclo estral (Williams e Kriegsfeld, 2012).

Em ratas ovariectomizadas, ou seja, com níveis séricos reduzidos de estradiol, o tratamento de reposição hormonal com três injeções diárias de cipionato de estradiol

demonstrou-se capaz de mimetizar os picos de LH observados durante a fase de proestro (Szawka *et al.*, 2013).

A primeira evidência da existência de uma relação entre o processo ovulatório e os genes de relógio surgiu de um trabalho no qual uma injeção de anestésico às 14 horas da tarde do proestro atrasou o pico de LH, e conseqüentemente, a ovulação em ratas (Everett e Sawyer, 1950). Atualmente é sabido que camundongas mutantes que não expressam o gene *Clock* apresentam prolongamento do ciclo estral e ausência de pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), dificuldade de manutenção da gravidez além de apresentam fenótipo de *diabetes mellitus* tipo 2 e obesidade (Miller *et al.*, 2004; Marcheva *et al.*, 2010). Além disso, a expressão do gene *Per 1* ocorre de maneira circadiana nos neurônios produtores do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Gillespie *et al.*, 2003) e a expressão de todos os cognatos dos genes de relógio foi detectada nos gonadotrofos hipofisários (Olcese *et al.*, 2006; Resuehr *et al.*, 2007; Resuehr *et al.*, 2009), assim como em células ovarianas (Nakamura *et al.*, 2005; Sellix e Menaker, 2010).

2.5 Relógio Biológico e Estradiol

A observação de que a administração crônica de estradiol leva a ativação de neurônios do núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo, medida pela expressão de c-fos sugere que esse hormônio possa regular tais neurônios (Takamata *et al.*, 2011). Outro dado que demonstra a influência do estradiol sobre o ritmo circadiano é a descoberta de que em ratas OVX, o comprimento do período de atividade locomotora é diminuído após o tratamento com estradiol (Albers *et al.*, 1981; Wollnik, 1989). Quando

intactas, as ratas apresentam maior volume de atividade total durante o proestro e estro em comparação ao diestro (Wollnik e Turek, 1988). Em humanos, o efeito do estradiol sobre o relógio biológico pode ser evidenciado pelo fato de que durante a menopausa, a gravidez e o ciclo menstrual ocorrem variações de temperatura corporal e possível distúrbio do sono (Shinohara *et al.*, 2000; Moline *et al.*, 2003). Não há ainda estudos que demonstrem como o estradiol influencia a variação circadiana de temperatura corporal.

O estradiol também é capaz de regular a expressão dos genes de relógio no útero, no NSQ, nos rins, no fígado e no tecido adiposo branco, como demonstrado recentemente. (Nakamura *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2005; He *et al.*, 2007). Esses achados evidenciam que o estradiol exerce efeitos sobre o ritmo circadiano.

2.6 Estradiol e Metabolismo

Os estrógenos, além de estarem envolvidos com a regulação da função reprodutiva, se relacionam, também, com o metabolismo energético. Na maioria das espécies, inclusive no homem, a ingestão alimentar e a função reprodutiva estão associados de tal maneira a garantir adaptações metabólicas durante a gestação, a lactação e as diferentes fases do ciclo menstrual (Hirschberg, 2012), situações onde ocorrem variações na secreção de estrógenos.

Em ratas, a ovariectomia leva a ganho de peso e hiperfagia, e o tratamento com estradiol reverte este quadro (Geary, 2001; Asarian e Geary, 2006). Além disso, a elevação dos níveis circulantes de estradiol, no período periovulatório, reduz a ingestão alimentar (Pedersen *et al.*, 2004; Santollo *et al.*, 2010). Sabe-se que o estradiol

potencia o efeito de saciedade do peptídeo colecistocinina (CCK), liberado pelo intestino delgado, em resposta à ingestão alimentar (Linden *et al.*, 1990; Geary *et al.*, 2001), enquanto que, atenua o efeito estimulador do apetite do hormônio gástrico grelina (Clegg *et al.*, 2007). Além disso, o estradiol estimula a atividade anorexígena dos neurônios do núcleo arqueado que expressam pro-opiomelanocortina (POMC) e o fator de transcrição regulado por anfetamina e cocaína (CART) e inibe os neurônios orexígenos que expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado a agouti (AgRP), neste núcleo (Olofsson *et al.*, 2009; Sotonyi *et al.*, 2010).

Além dos efeitos do estradiol sobre a ingestão alimentar, este hormônio é capaz de modular a proliferação, a diferenciação e o tamanho do adipócito (Darimont *et al.*, 1997; Dieudonne *et al.*, 2000), tem ação dual sobre os níveis de leptina de ratas ovariectomizadas (Pantaleao *et al.*, 2010), e aumenta o receptor de ativação da proliferação peroxissomal do tipo alfa (PPAR- α) no fígado de ratas espontaneamente hipertensas (Abeles *et al.*, 2012), além de interferir com as ações anti-obesidade dos fenofibratos em estimular o PPAR- α (Yoon, 2010). Recentemente um trabalho realizado em camundongos fêmeas demonstrou que o estradiol foi capaz de alterar a expressão de genes de relógio nos tecidos adiposos subcutâneo e gonadal além de exercer um efeito protetor contra acúmulo de tecido visceral, que em animais controle (ovariectomia e tratamento com veículo) levou à hiperinsulinemia, intolerância à glicose e à insulina (Zhu *et al.*, 2015). Ademais, esse hormônio esteróide parece contribuir para a manutenção da sensibilidade à insulina em camundongos na fase inicial/precoce da síndrome metabólica, possivelmente prevenindo inflamação do tecido adiposo (Shen *et al.*, 2014)

Considerando que o estradiol exerce influência sobre aspectos metabólicos e circadianos, aventamos a hipótese de esse ser uma fator endógeno determinante para a sincronização dos relógios biológicos periféricos ou mesmo central. Na menopausa, onde observa-se uma redução expressiva deste hormônio, há uma dessincronização dos relógios, causando as sintomatologias clássicas apresentadas pelas mulheres durante essa fase.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do estradiol sobre os parâmetros do sistema circadiano central – tais como atividade locomotora e temperatura corporal - e a expressão dos genes, *Per1*, *Bmal1* e *Rev-erba* no tecido adiposo branco – sistema circadiano periférico - de ratas ovariectomizadas.

3.2 Objetivos Específicos

1. Comparar o efeito da injeção de cipionato de E2 (10 µg/0,2 mL) com o do tratamento com implantes subcutâneos de tubos de *silastic* (implantes) contendo 17β-E2 (180 µg/mL) sobre o ganho de peso corporal de ratas ovariectomizadas (OVX) e comparar com as de ratas que apresentam ciclos estrais regulares.
2. Comparar o efeito da injeção de cipionato de estradiol (10 µg/0,2 mL) com o do tratamento com implantes subcutâneo de tubos de *silastic* contendo 17β-E2 (180µg/mL) sobre o ganho de peso dos tecidos adiposos brancos (retroperitoneal, mesentérico e perigonadal) de ratas ovariectomizadas (OVX).
3. Determinar temporalmente os níveis de RNAm de *Bmal1* no tecido adiposo branco nos seguintes grupos: ratas OVX com inserção subcutânea de tubos de *silastic* (implantes) contendo óleo ou 17β- estradiol (180µg/mL).

4. Determinar o efeito da injeção de cipionato de E2 sobre os níveis de RNAm de *Per1*, *Bmal1* e *Rev-erb α* no tecido adiposo branco.
5. Comparar o efeito de injeções de cipionato de E2 (10 μ g/0,2 mL) com o tratamento de E2 por implantes contendo 17 β -E2 (180 μ g/mL) sobre as variações circadianas de atividade locomotora espontânea e temperatura interna de ratas OVX e comparar com as de ratas que apresentam ciclos estrais regulares.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFMG) sob o protocolo de número 323/2015. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12/12 horas e temperatura ambiente de 24°C, com livre acesso à ração e água. Os procedimentos na fase escura do fotoperíodo foram realizados sob luz vermelha de intensidade de menos de 1 lux.

4.2 Ciclo Estral

Os animais tiveram o ciclo estral acompanhado durante, pelo menos duas semanas (3 ciclos completos), por meio da coleta e visualização de esfregaço vaginal. Para a coleta de material através do esfregaço vaginal, uma ponteira contendo aproximadamente 200 µl de solução salina (0.9% NaCl) foi inserida na entrada do canal vaginal. A gota coletada, contendo células da mucosa, foi depositada em lamina de vidro para visualização em microscópio (aumento de 10x na objetiva). O aspecto e morfologia das células seguem um padrão já bem estabelecido na literatura que refletem as variações dos níveis estrogênicos observadas durante o ciclo estral (Freeman, 1994). Coletas provenientes da fase de proestro apresentam células epiteliais nucleadas e agrupadas, os chamados *clusters*. Na fase de estro são encontradas células epiteliais cornificadas, com aspecto de folhas secas. O metaestro

e caracterizado pela presença de leucócitos e resquícios de células cornificadas enquanto no diestro ocorre uma extensa invasão leucocitária (Freeman, 1994).

4.3 Padronização da dose e tempo do tratamento com estradiol

O tratamento com implantes contendo 17β -E2 foi realizado pela primeira vez em nosso laboratório para o desenvolvimento do presente estudo. Para padronização desse protocolo foram escolhidas duas doses de tratamento baseados em dados da literatura. Foram realizados testes com 17β -E2 para as doses de 180 $\mu\text{g/mL}$ (Dacks e Rance, 2010) e de 360 $\mu\text{g/mL}$, durante 7, 14 e 21 dias de tratamento. Os parâmetros avaliados para checar a eficiência do tratamento foram: (1) peso do útero – é sabido que a ausência de estradiol diminui o tamanho e o preenchimento líquido no interior do útero e (2) as concentrações de LH – é sabido que o estradiol promove um aumento das concentrações plasmáticas deste hormônio.

4.4 Ovariectomia e tratamento hormonal

As ratas foram anestesiadas com uma solução de Cetamina (80 mg/kg) e Xilasina (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Foi realizada tricotomia na região média entre a última costela e a coxa do animal onde foi feita incisão longitudinal da pele e da musculatura para exposição e retirada dos ovários. A pele foi posteriormente suturada e esse procedimento foi realizado bilateralmente em cada animal. Ao término da cirurgia, os animais receberam uma dose subcutânea de Flunixin Meglumine (16 mg/kg, s.c., analgésico e antiinflamatório) e uma dose profilática de antibiótico Pentabiótico (2400 UI/Kg, i.m). As ratas se recuperaram da cirurgia e após uma

análise das variações desse parâmetro foi feita por meio de delta, subtraindo-se o valor encontrado no último dia de tratamento pelo valor obtido no primeiro dia de ovariectomia. Esses dados foram agrupados e apresentados como média±EPM dos grupos experimentais (Óleo, OVX-Implante 17β-E2 e OVX-Cipionato E2).

4.6 Análise dos efeitos do tratamento hormonal sobre a expressão gênica

A fim de avaliar se o estradiol administrado em três doses altera a expressão dos genes de relógio *Per1*, *Bmal1* e *Rev-erba*, fêmeas Wistar com peso aproximado de 250 g tiveram seu ciclo estral acompanhado por 14 dias e aquelas que apresentaram dois ciclos regulares foram ovariectomizadas e acondicionadas em gaiolas individuais para aferição da variação de peso corporal. Uma semana após a cirurgia de remoção dos ovários, ratas foram injetadas com cipionato de E2 ou óleo de milho (0,2 mL) por três dias consecutivos e decapitadas no quarto dia de tratamento às 19:00 (ZT12), imediatamente após as luzes se apagarem. O sangue e o tecido adiposo retroperitoneal foram coletados. O plasma foi obtido após centrifugação a 4^oC durante 20 minutos em rotação de 3.200 rpm e acondicionado a -20^oC. O tecido adiposo branco foi imediatamente congelado em gelo seco e mantido a -80^o C até o processamento para análise por qPCR. O útero foi pesado como controle do efeito da terapia de reposição hormonal segundo cada tratamento.

Com objetivo de avaliar se a administração de estradiol por 14 dias exerce influência sobre a expressão dos genes de relógio *Per1*, *Bmal1* e *Reverba*, fêmeas Wistar com peso aproximado de 250 g tiveram o ciclo estral acompanhado por 14 dias e apresentaram dois ciclos regulares foram ovariectomizadas e acondicionadas em

gaiolas individuais para aferição diária de variação de peso corporal. Uma semana após a cirurgia de remoção dos ovários, ratas foram anestesiadas com 3% de isoflurano e 100% de oxigênio, em fluxo de 1 mL/min (Lavorato *et al.*, 2016), as ratas foram posicionadas em decúbito dorsal para realização da tricotomia da região interescapular, onde se fez uma incisão de aproximadamente 1 cm para posicionamento subcutâneo do implante de 17β -E2, num outro conjunto de ratas os implantes continhas óleo de milho. Realizou-se sutura da pele e foi injetado, também subcutaneamente, uma dose de Flunixin Meglumine 0,3 mg/kg (1,0 mg/kg, s.c.). O tratamento teve duração de 14 dias, sendo os animais decapitados em quatro horários, denominados *zeitgeber*: ZT0, ZT6, ZT12 e ZT18 correspondentes 07:00h, 13:00h, 19:00h e 01:00h, respectivamente, sendo ZT0 o momento em que a luz se acendia. O sangue e o tecido adiposo retroperitoneal foram coletados. O plasma foi obtido após centrifugação a 4°C durante 20 minutos em rotação de 3.200 rpm e acondicionado a -20°C. O tecido adiposo branco foi imediatamente congelado em gelo seco e mantido a -80°C até o processamento para análise por qPCR. O útero foi pesado como controle do efeito da terapia de reposição hormonal segundo cada tratamento.

4.7 Análise dos efeitos do tratamento hormonal sobre parâmetros circadianos

A fim de analisar os efeitos do tratamento com três injeções sobre parâmetros do ritmo circadiano - temperatura interna e atividade locomotora - ratas ciclando regularmente foram implantadas intraperitonealmente com um sensor de telemetria (modelo G2 E-Mitter, Mini-Mitter Company, Sun River, OR, USA) durante anestesia

com mistura Cetamina (80mg/kg) e Xilasina (10mg/kg). Foi feita tricotomia da região abdominal e uma incisão na pele para expor a linha alba do músculo reto abdominal, onde foi realizada uma incisão para posicionamento do sensor. Esse foi suturado junto ao músculo para garantir constância nos registros uma vez que esteve posicionado na mesma região durante todo o registro. Prosseguiu-se com sutura da pele e as ratas receberam uma dose de Flunixin Meglumine (16 mg/kg s.c.) e uma dose de Pentabiótico (2400 UI/Kg, i.m). Os animais foram posicionados isoladamente sobre um receptor (ER-4000 Energizer/Receiver, Mini-Mitter Company, Sun River, OR, USA) conectado em série a um computador pessoal contendo o software de aquisição de dados. Após uma semana de registros, as mesmas ratas foram ovariectomizadas e mantidas em registro por mais uma semana. Ao término desse período, as ratas foram injetadas com óleo (0,2 mL) ou cipionato de E2 (10 µg/0,2mL) por três dias, sendo sacrificadas 5 dias após término do tratamento.

A observação dos efeitos do tratamento com implantes de 17β-E2 sobre os parâmetros circadianos atividade locomotora e temperatura foram aferidos da mesma forma que mencionado para o protocolo de injeção, sendo realizada implantação de sensor para aferição dos parâmetros em ratas ciclando, ovariectomizadas e tratadas via inserção de implantes contendo 17β-E2 (180 µg/mL) ou óleo de milho por 14 dias.

4.8 Extração de RNA e Real-Time PCR

Os tecidos foram manipulados em tubos autoclavados. Foi adicionado 1 mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen, E.U.A.) a cada tubo para homogeneização dos tecidos de acordo com protocolo já empregado em nosso laboratório. O homogenato foi

centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante, constituído basicamente de gordura, foi removido. Adicionou-se 200µl de clorofórmio ao tubo que permaneceu em temperatura ambiente por 5 minutos ao final dos quais foi realizada centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm à 4°C. O sobrenadante translúcido foi transferido cuidadosamente para outros tubos eppendorf de 1,5 mL autoclavados, e adicionou-se 500 µL de isopropanol. Nesse momento os tubos foram acondicionados a - 80°C por 30 minutos e, ao final, nova centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C foi realizada. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol a 75% ao precipitado, seguindo-se de uma centrifugação por 10 minutos de 13.000 rpm à 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o RNA extraído foi diluído em água estéril livre de DNase e RNase sendo mantido à -80°C. O RNA foi ressuspendido em 20µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (H₂O DEPC, Ambion Inc.), e tratado com DNase conforme instruções do fabricante (Kit turbo-DNA-freeTM, Life Technologies). De forma resumida, à cada amostra foi adicionado 10% de volume do tampão para DNase I e 1 µl de DNase I. Na sequência, as amostras foram incubadas por 30 min à 37°C. Acrescentou-se 10% do volume de reagente de inativação, seguido por incubação por 2 min à temperatura ambiente. As amostras foram, então, centrifugadas a 10.000 rpm durante 2 min com intuito de precipitar o reagente de inativação juntamente com a DNase.

A transcrição reversa foi realizada em tubos autoclavados a partir de 1 µg de RNA total, adicionando-se 2 µL de oligo DT (50 pmol/ µL) ou 1µL de Random Primers (100 pmol/ µL), 1 µL de dNTP (10 mM) e água livre de RNases e DNases para um volume final de 13 µL. A incubação ocorreu à 65^o C por 5 minutos e à 4°C por 1 minuto.

A seguir foi adicionada à solução anterior, 4 µL de tampão para PCR, DTT (0,1 M), inibidor de ribonuclease (40 U/µL) e 1 µL da enzima Superscript III RT. Realizou-se nova incubação à 25^o C por 5 minutos; 50^o C por 50 minutos e 70^o C por 15 minutos. O cDNA obtido foi armazenado à -20^o C. Para realização do PCR quantitativo para os genes de interesse *Per1*, *Bmal1*, *Rev-erba* e para os normalizadores *S26* e *18S*, foram preparadas soluções que permitem a amplificação dos mesmos. Tais soluções possuem *primers* forward e reverse dos genes citados em água livre de RNAses e DNAses.

Tabela 1. Sequência de *primers* utilizados no qPCR

18S	Forward: 5'CGGCTACCACATCCAAGGAA3' Reverse: 5'GCTGGAATTACCGCGGCT 3'
S26	Forward: 5'CGATTCCTGACAACCTTGCTA3' Reverse: 5'CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT3'
<i>Per 1 (Rattus)</i>	Forward: 5'ATGCAGAAACAACAGCCACGGTTC3' Reverse: 5'TGGCCAGGATCTTGAACACTGCTA3'
<i>Bmal 1 (Rattus)</i>	Forward: 5'AGGCCTTCACTGGAATGGTGCTAT3' Reverse:5' TGACTGGCCTGGAAGTTGCTACAT3'
<i>Reverb-α (Rattus)</i>	Forward: 5'ACAGCTGACACCACCCAGATC3' Reverse: 5'CATGGGCATAGGTGAAGATTTCT3'

As amostras, seguidas das suas respectivas soluções, foram pipetadas na placa de 96 poços juntamente com *mix* universal SYBRgreen (LifeTechnologiesTM). A

análise dos dados foi feita pela comparação entre número de cópias dos poços controle e experimentais, obtida entre as porções de crescimento geométrico das curvas, passando-se uma reta denominada limiar que cruza essas porções. Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta limiar (CT), foi encontrado o ΔCT que é a diferença do valor médio para o gene de interesse e para o RNA S26. A seguir, foram subtraídos os valores médios encontrados para os poços tratados da média dos poços de menor expressão, obtendo-se o $\Delta\Delta CT$. Esse valor foi colocado como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$), obtendo-se assim o número de vezes que o gene foi expresso em relação a este grupo de menor expressão (Livak & Schmittgen, 2001). A análise da expressão gênica segundo o método citado parte da comparação entre diferentes tratamentos ou estados fisiológicos capazes de mudar o perfil de expressão de RNAm do tecido alvo.

4.9 Dosagem plasmática de hormônio luteinizante

Para a dosagem das concentrações plasmáticas de LH foi utilizado um kit de radioimunoensaio específico fornecido pelo National Hormone and Peptide Program (Harbor-University of California at Los Angeles). O anticorpo para o LH foi o anti-rat LH-S10, diluído em soro de coelho normal e a preparação padrão foi o LH-RP3 diluído em tampão fosfato gel 0,1% (0,01M, pH=7.5). O menor limite de detecção foi 0,04 ng/ml e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4%

4.10 Análise dos dados

Os dados de variação de peso corporal, de peso uterino, de concentração plasmática de LH e da amplitude do ritmo de atividade locomotora foram comparados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida por Tukey ou Bonferoni, conforme a situação experimental. A análise das expressões gênicas temporais foi feita por ANOVA de duas vias e para aquelas em apenas um ponto empregou-se teste de *t-student*. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$, obtidos pelo programa estatístico Graph Pad Prism 5.0. Para as análises dos actogramas e amplitude utilizou-se o programa ClockLAB (Actimetrics, IL, USA). Os registros foram agrupados em blocos de 2, e plotados numa resolução de 30 42 pontos por hora. Os actogramas foram construídos para que os padrões rítmicos de ALE fossem analisados. O programa utiliza o teste estatístico Períodograma Qui-quadrado descrito por Sokolove e Bushell (1978) para calcular o período do ritmo.

5. RESULTADOS

5.1 Tratamento hormonal com estradiol altera parâmetros morfológicos e fisiológicos em ratas ovariectomizadas.

Os parâmetros peso uterino, concentrações de LH plasmático e ganho de peso corporal das ratas tratadas injeções de óleo ou com implantes (7, 14 ou 21 dias) não foram estatisticamente diferentes, dessa forma, agrupamos estes resultados em um único grupo, apresentado como óleo nos gráficos das figuras 5, 6 e 7.

As ratas do grupo OVX - Cipionato de E2 apresentaram maior peso uterino quando comparadas aos grupos óleo e OVX- Implante 17β -E2 nas duas concentrações testadas. O grupo OVX - cipionato de E2 apresentou um aumento significativo no peso uterino quando comparado aos valores encontrados nas ratas tratadas com óleo ou com OVX + implante óleo em ambas concentrações (Figura 5, Painel A). A partir destes resultados, optamos pelo tratamento com OVX+implante de 17β -E2 na concentração de 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e passamos a testar o tempo de tratamento.

Ratas do grupo óleo tiveram uma redução no peso do útero quando comparadas com as ratas ciclando regularmente (intactas) ($p < 0,01$). O tratamento com implante 17β -E2 na concentração de 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 7 e 14 dias restaurou os valores de peso uterino apresentados pelas ratas intactas ($p < 0,01$). O peso uterino das ratas OVX-cipionato E2 foi maior em comparação com o das ratas tratadas com implante de 17β -E2 por 7, 14 e 21 dias e com óleo ($p < 0,01$, Figura 5, Painel B).

O peso uterino varia de acordo com as concentrações plasmáticas de estradiol, sendo utilizado como um parâmetro das ações tróficas deste hormônio em promover um aumento das células endometriais, que pode decorrer de uma exposição ao estradiol e persistir por certo tempo, mesmo que essas concentrações já tenham diminuído. Assim, com o objetivo de melhor caracterizar fisiologicamente estes tratamentos, também analisamos as concentrações plasmáticas de LH, as quais, neste modelo, se correlacionam de forma inversa com as de estradiol num mesmo momento. Todos os tratamentos utilizados (Implante 17 β E2 por 7, 14 ou 21 dias e com cipionato de E2) promoveram uma redução nas concentrações plasmáticas de LH quando comparados com o grupo óleo ($p < 0,01$, Figura 6).

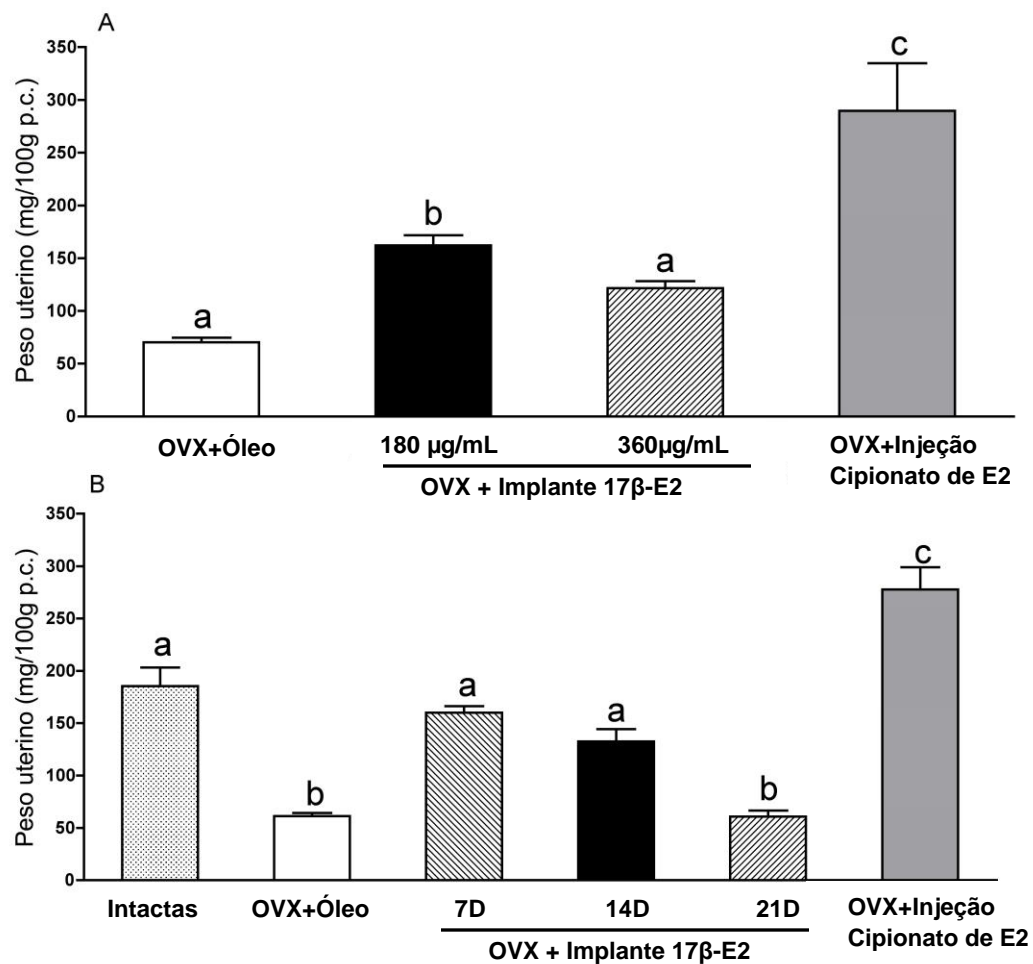


Figura 5. Avaliação de peso uterino relativo. **Painel A:** Análise do peso uterino de ratas ovariectomizadas (OVX+ óleo), **14 dias** após a inserção de implantes s.c. contendo estradiol (E2) nas concentrações de **180 µg/mL** ou **360 µg/mL** diluído em óleo de milho ou somente óleo de milho (Óleo) e de ratas OVX tratadas com 3 injeções s.c consecutivas de cipionato de estradiol (Ovx- injeção cipionato de E2) na concentração de 10 µg/0,2 mL. **Painel B:** Análise do peso uterino de ratas ciclando regularmente (Intacta), de ratas ovariectomizadas (OVX+ óleo), 7 14 e 21 dias (d) após a inserção de implantes s.c. contendo estradiol (E2, **180 µg/mL**) diluído em óleo de milho ou somente óleo de milho (Óleo) e de ratas OVX tratadas com 3 injeções s.c consecutivas de cipionato de estradiol (Ovx- injeção cipionato de E2) na concentração de 10 µg/0,2 mL. Os dados são apresentados pela média ± EPM. Letras diferentes apontam diferenças pela análise de variância de uma via seguida do teste de *Bonferroni*, $p < 0,05$.

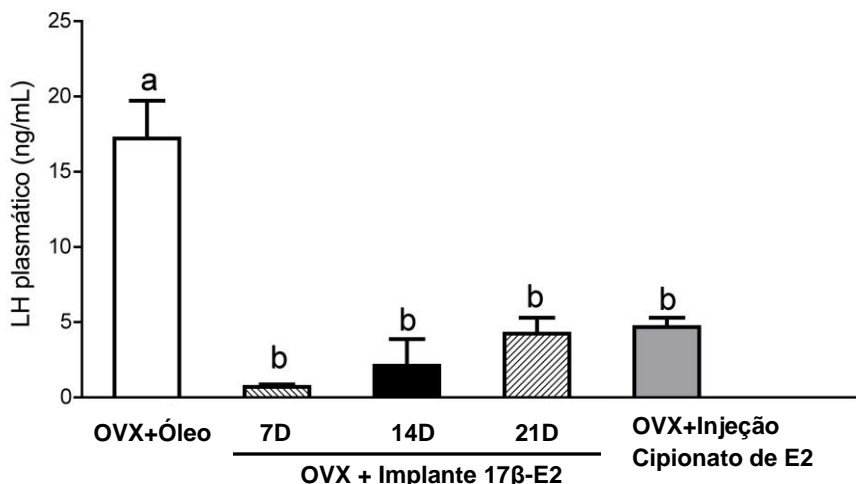


Figura 6. Concentrações plasmáticas de LH de ratas ovariectomizadas (OVX+óleo), 7 14 e 21 dias (d) após a inserção de implantes s.c. contendo estradiol (E2, **180 µg/mL**) diluído em óleo de milho ou somente óleo de milho e de ratas OVX tratadas com 3 injeções s.c consecutivas de cipionato de estradiol (Ovx- injeção cipionato de E2) na concentração de 10 µg/0,2 mL. Todas as ratas foram eutanasiadas às **7:00 h**. Os dados são apresentados pela média ± EPM. Letras diferentes apontam diferenças pela análise de variância de uma via seguida do teste de *Bonferroni*, $p < 0,05$.

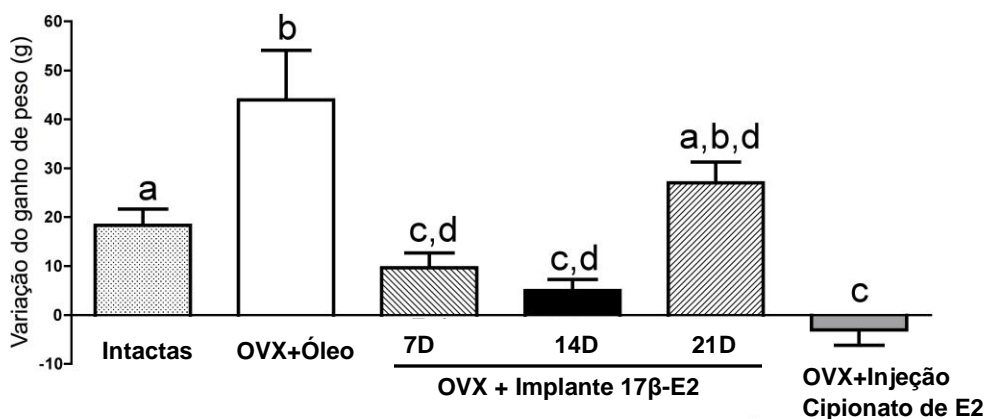


Figura 7: Análise da variação do ganho de peso de ratas ciclando regularmente (Intacta), de ratas ovariectomizadas (OVX+óleo), 7 14 e 21 dias (d) após a inserção de implantes s.c. contendo estradiol (E2, **180 µg/mL**) diluído em óleo de milho ou somente óleo de milho e de ratas OVX tratadas com 3 injeções s.c consecutivas de cipionato de estradiol (Ovx+injeção cipionato de E2) na concentração de 10 µg/0,2 mL. Os dados são apresentados pela média ± EPM. Letras diferentes apontam diferenças pela análise de variância de uma via seguida do teste de *Bonferroni*, $p < 0,05$.

5.2 Efeito do tratamento com estradiol sobre ganho de peso corporal e sobre peso dos tecidos adiposos brancos

Todos os tratamentos com estradiol, com exceção do Ovx- implante de 17β E2 pelo período de 21 dias, foram capazes de reduzir o ganho de peso corporal induzido pela ovariectomia (Figura 7). Baseado nos resultados apresentados nas figuras 5 (Peso Uterino), 6 (LH plasmático) e 7 (variação de ganho de peso) estabelecemos o tratamento com Ovx-implante de 17β E2 por 14 dias para análise dos próximos parâmetros a serem investigados (peso do tecido adiposo branco, expressão gênica e parâmetros do ritmo circadiano de atividade locomotora e temperatura corporal).

Os tratamentos com Ovx- implante de 17β E2 e com Ovx-cipionato de E2 ocasionaram uma redução no peso do tecido adiposo retroperitoneal ($p < 0,001$, TAR), enquanto estes tratamentos não alteram o peso dos tecidos mesentérico (TAM) e perigonadal (TAP) (Figura 8).

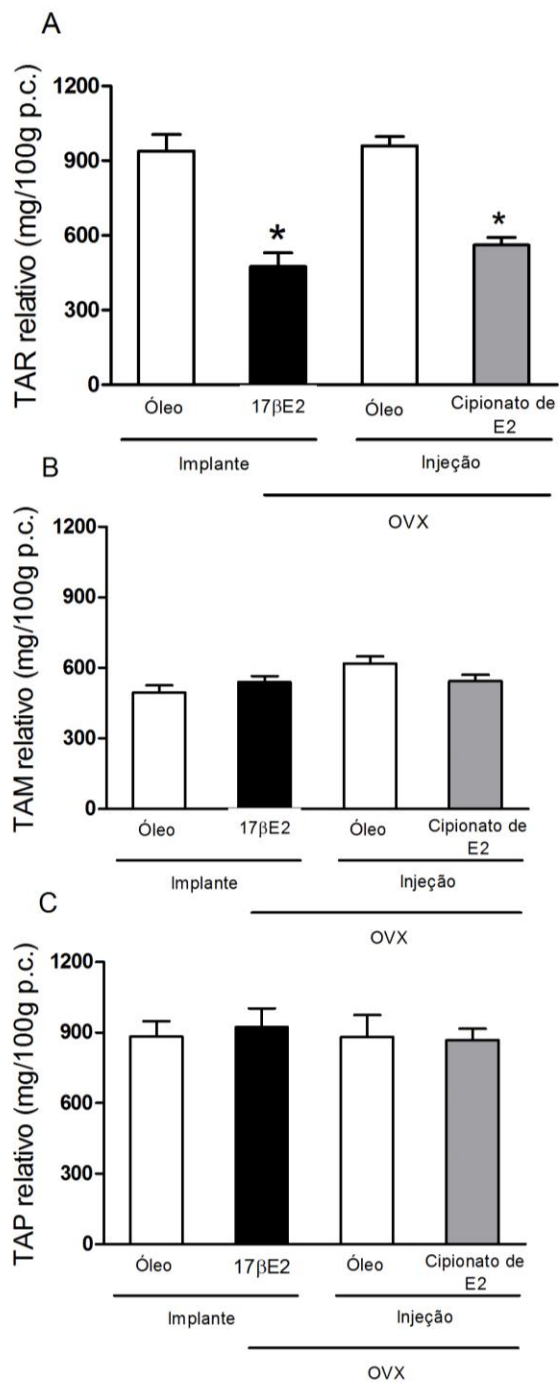


Figura 8: Análise do peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal (TAR), mesentérico (TAM) e perigonadal (TAP) de ratas ovariectomizadas (OVX) 14 dias após a inserção de implantes s.c. contendo estradiol (E2, 180 µg/mL) diluído em óleo de milho ou somente óleo de milho (Óleo) e de ratas OVX tratadas com 3 injeções s.c consecutivas de cipionato de estradiol (E2) na concentração de 10 µg/0,2 mL. Os dados são apresentados pela média ± EPM. *, p<0,001 versus grupo óleo, análise de variância de uma via seguida do teste de *Bonferroni*.

5.3 Efeito do tratamento com *pellet* de estradiol sobre expressão temporal de *Bmal1* no TAR em ratas ovariectomizadas

Considerando que o peso do TAR foi reduzido pelo tratamento com Ovx-implante de 17β E2 e com Ovx- cipionato E2, este tecido adiposo foi eleito para analisarmos o padrão temporal da expressão do gene de relógio *Bmal1*. O tratamento com Ovx-implante de 17β E2 de ratas ovariectomizadas foi capaz de alterar temporalmente a expressão do gene de relógio *Bmal1*, ocasionando um pico de expressão no ZT0, inexistente no grupo óleo ($p < 0,01$, Figura 9).

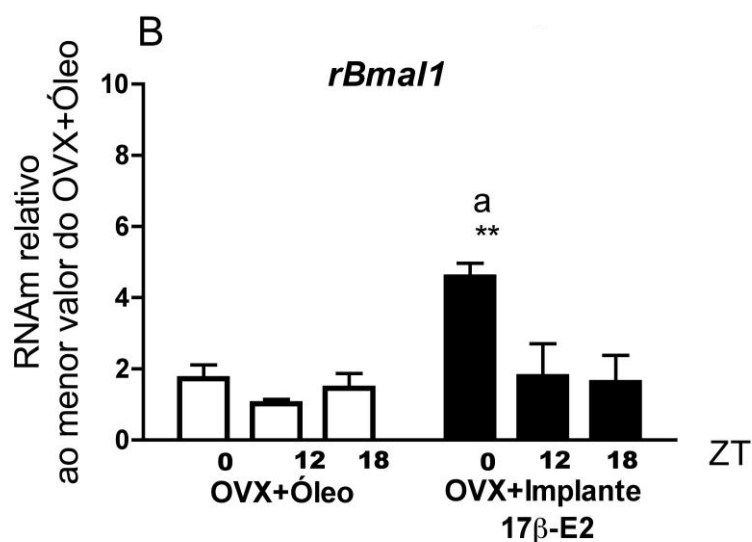


Figura 9: Análise dos níveis de RNAm relativo do gene *Bmal1* do tecido adiposo retroperitoneal de ratas ovariectomizadas (OVX) 14 dias após a inserção de implantes s.c. contendo estradiol (E2, $180 \mu\text{g/mL}$) diluído em óleo de milho ou somente óleo de milho (Óleo) eutaniadas no zeitgeber (ZT) 0, 12 e 18. Os dados são apresentados pela média \pm EPM. O gene foi normalizado pelo gene 18S e pelo menor valor de expressão de seu controle. *, $p < 0,001$ versus grupo óleo no mesmo ZT, e **a**, $p < 0,05$ versus ZTs 12 e 18 no mesmo grupo, análise de variância de duas vias seguida do teste de *Bonferroni*.

5.4 Efeito da injeção de estradiol sobre a expressão dos genes *Per1* e

Bmal1 em ratas ovariectomizadas

As injeções de cipionato de estradiol, administradas em ratas ovariectomizadas, foram capazes de aumentar a expressão do gene de relógio *Per1* às 19:00h (ZT12) do dia subsequente à aplicação da última dose ($p < 0,01$). O tratamento hormonal, no entanto, não foi capaz de alterar a expressão do gene *Bmal1* no mesmo ZT (Figura 10, painéis A e B).

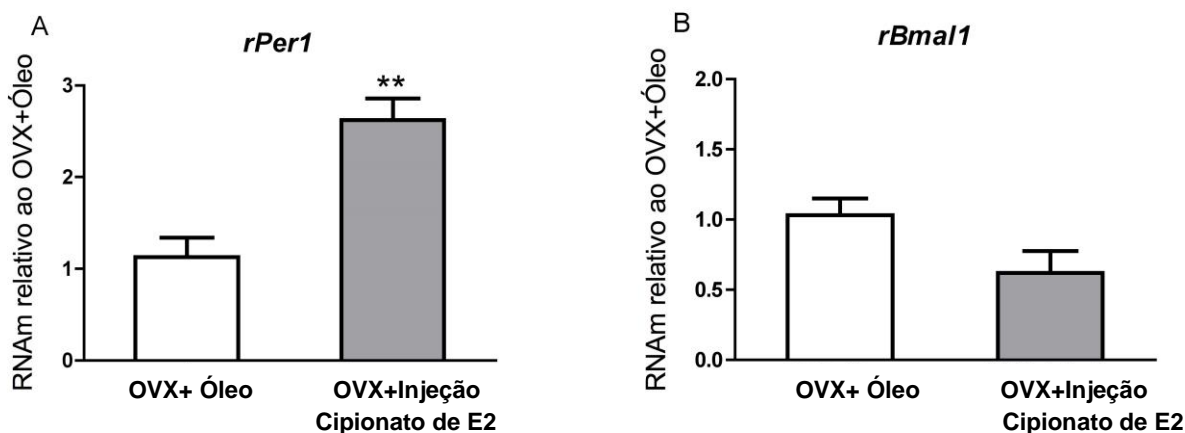


Figura 10: Análise dos níveis de RNAm do gene *Per1* (Painel A) e do gene *Bmal1* (Painel B) relativo do tecido adiposo retroperitoneal de ratas OVX tratadas com 3 injeções s.c consecutivas de cipionato de estradiol (E2) na concentração de 10 μ g/0,2 mL eutanasiadas no **ZT 12**. Ambos genes foram normalizados pelo RNAm do gene *S26* e pelo menor valor de expressão de seu respectivo controle. Os dados são apresentados pela média \pm EPM. **, $p < 0,01$ versus grupo óleo, test t *student*.

5.5 Efeito da injeção de estradiol sobre a expressão do gene *Reverb-α* em ratas ovariectomizadas

A administração de injeções de cipionato de estradiol (10µl/0,2mL) aumentou a expressão do gene *Reverb-α* no tecido adiposo retroperitoneal de ratas ovariectomizadas eutanasiadas às 19:00h (ZT 12) do dia seguinte ao final do tratamento ($p < 0,05$, Figura 11).

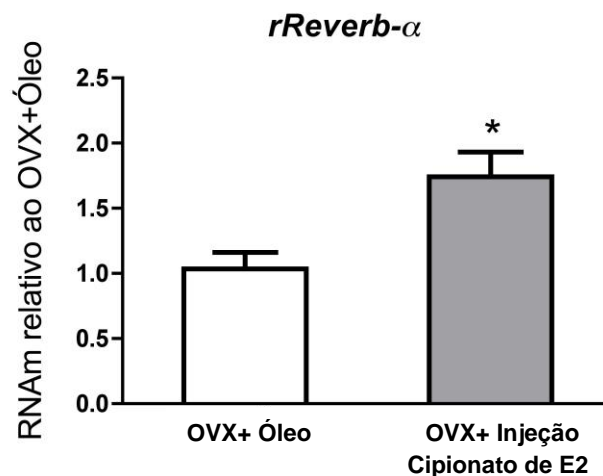


Figura 11: Análise dos níveis de RNAm relativo do gene *Reverb-α* do tecido adiposo retroperitoneal de ratas OVX tratadas com 3 injeções s.c consecutivas de cipionato de estradiol (E2) na concentração de 10 µg/0,2 mL eutanasiadas no **ZT 12**. Os níveis de RNAm do gene S26 foram utilizados como referencia e o valor de expressão do grupo óleo foi utilizado como normalizador. Os dados são apresentados pela média ± EPM. **, $p < 0,01$ versus grupo óleo, test t *student*.

5.6 Actograma típico de ratas em ciclo regular, ovariectomizadas e tratadas com Implantes de 17 β -E2

A figura 12 mostra um actograma, ou seja, uma representação gráfica do perfil de atividade locomotora de uma rata ciclando regularmente, seguida dos protocolos de ovariectomia e tratamento com implante óleo (painel A) ou implante de 17 β -E2 (painel B). Os pontos vermelhos referem-se ao momento em que houve o pico de atividade, denominado acrofase. Observou-se que durante a fase de ciclo estral regular (Ciclo) a variação da acrofase foi pequena e que após a ovariectomia, esse pico foi deslocado para a esquerda, o que significa que o horário de pico de atividade foi antecipado. As ratas tratadas com óleo mantiveram o padrão de ALE do período de ovariectomia, enquanto que a reposição com estradiol atrasou o horário de pico de atividade.

5.7 Actograma típico de ratas em ciclo regular, ovariectomizadas e tratadas com E2-injeção

O actograma da figura 13 mostrou que durante o registro de atividade locomotora no ciclo estral, ocorrem discretas variações na acrofase, o que é mantido durante a ovariectomia. Os registros foram mantidos por 5 dias após o tratamento com injeções de óleo (painel A) ou cipionato de E2 (painel B). O perfil de atividade locomotora foi similar ao observado com no grupo OVX-Implant 17 β -E2, assim, o estradiol parece atrasar o horário no qual o pico da atividade locomotora em ambos os tratamentos (Figura 9, painel B).

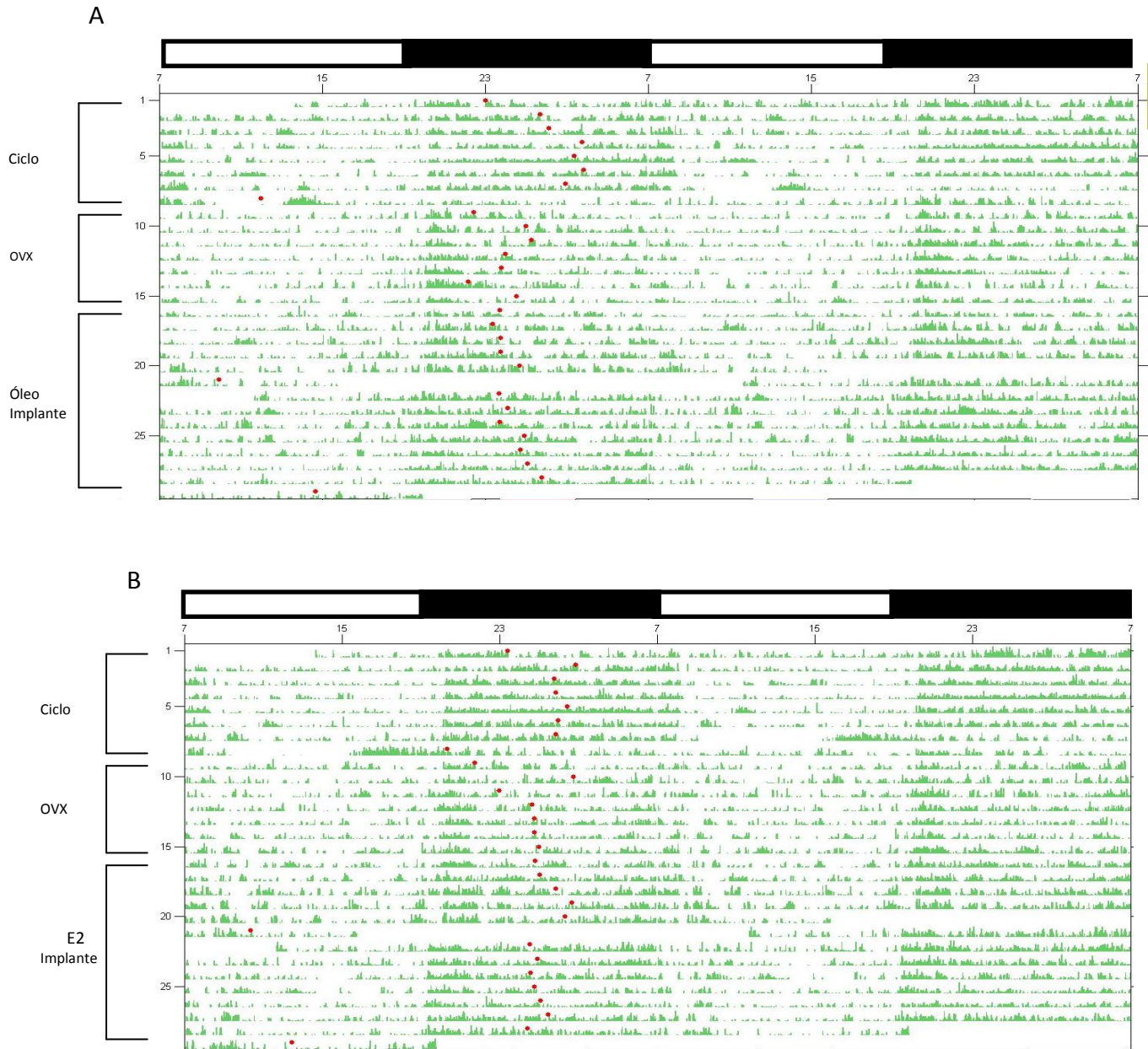


Figura 12: Actograma representativo de uma rata ciclando regularmente (ciclo) e submetida à ovariectomia (OVX) e depois à inserção de implante s.c. contendo estradiol (E2, 180 µg/mL) diluído em óleo de milho ou somente óleo de milho (Óleo) por 14 dias. Barras brancas na parte superior da figura representam a fase clara e barras pretas, fase escura. Os números na horizontal indicam as horas do dia. Os números nas laterais se referem ao número de dias registrados. Os pontos em vermelho representam a acrofase.

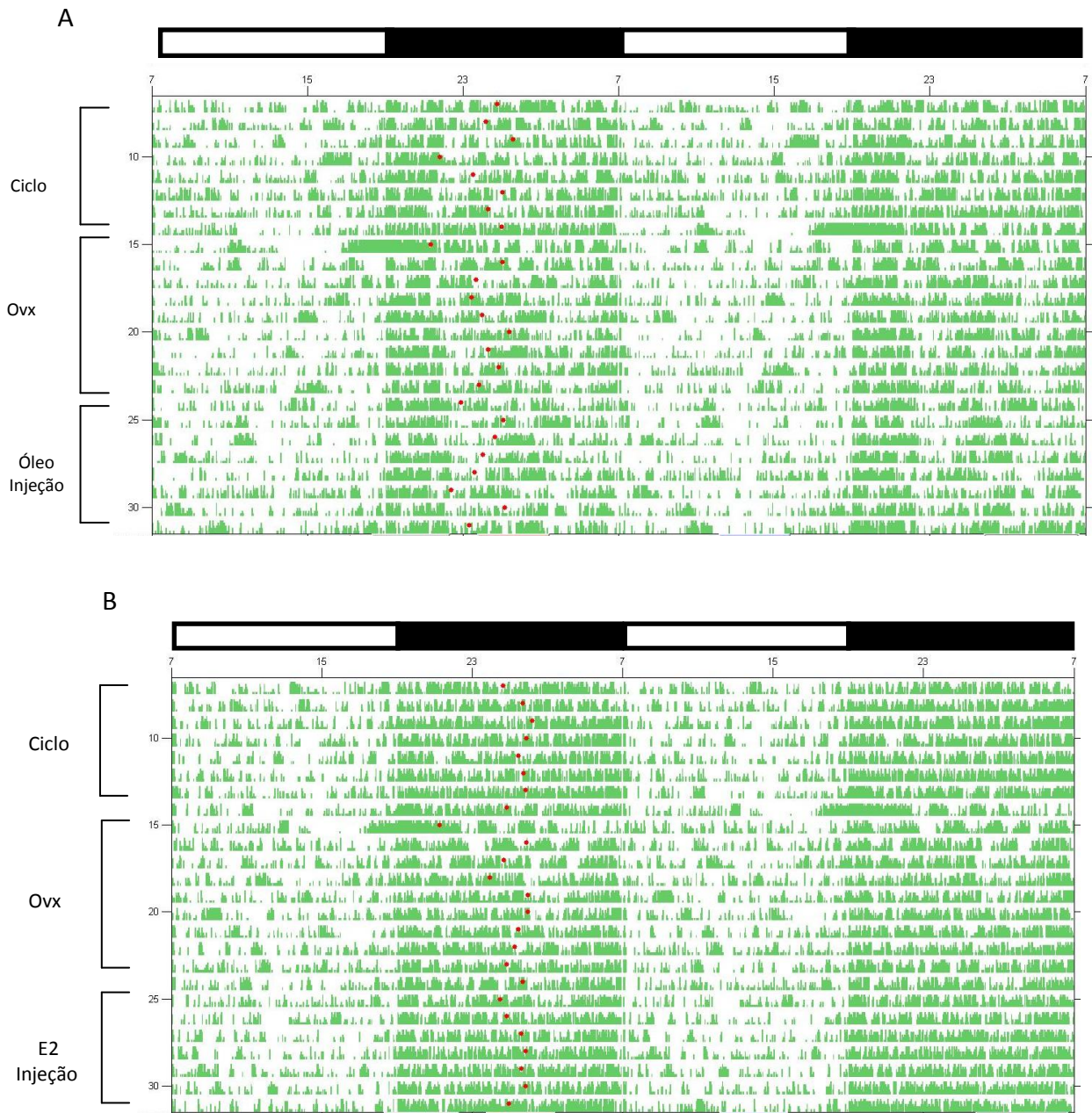


Figura 13: Actograma representativo de uma rata ciclando regularmente (Ciclo) e submetida à ovariectomia (OVX) e depois ao tratamento com 3 injeções s.c consecutivas de cipionato de estradiol (E2) na concentração de 10 $\mu\text{g}/0,2$ mL ou somente óleo de milho (Óleo). Barras brancas na parte superior da figura representam a fase clara e barras pretas, fase escura. Os números na horizontal indicam as horas do dia. Os números nas laterais se referem ao número de dias registrados. Os pontos em vermelho representam a acrofase.

5.8 Análise de Parâmetros do ritmo de atividade locomotora

A ovariectomia, por até 11 dias, antecipa o horário de início da atividade locomotora espontânea (Figura 14, Painel A). Aos 21 dias de castração, o *onset* da atividade não mais se diferencia daquele observado em ratas ciclando. O estradiol parece não exercer efeito sobre esse parâmetro. Os outros dois parâmetros de ritmo de atividade locomotora analisados, acrofase (Painel B) e *offset* (Painel C) e não foram afetados pela ovariectomia.

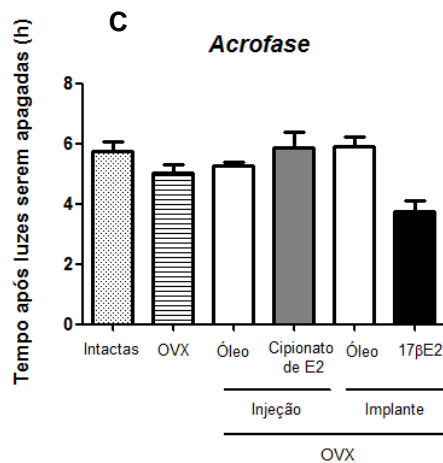
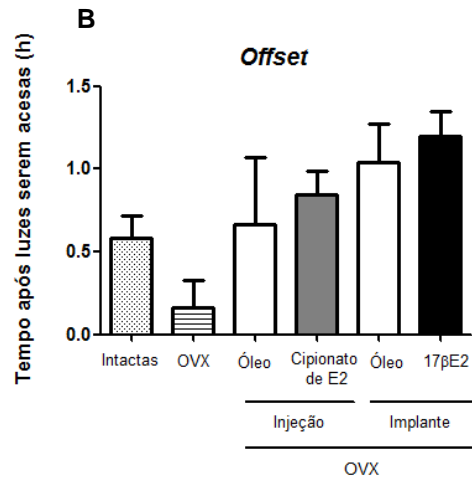
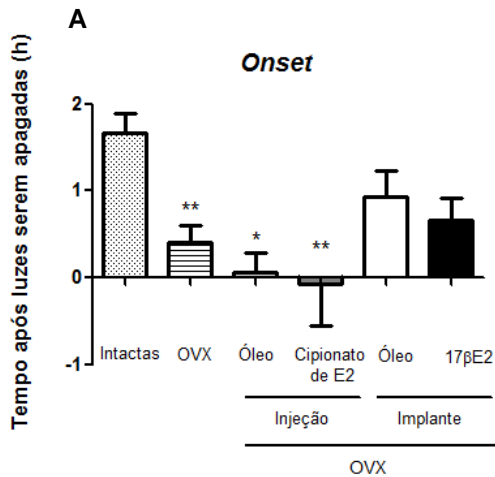
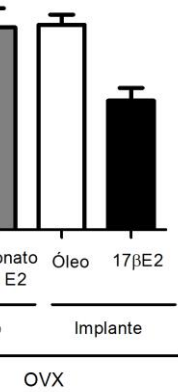


Figure 14. Análise dos parâmetros do ritmo de ALE *Onset* (Painel A), *Acrofase* (Painel B) e *Offset* (Painel C) de ratas ciclando regularmente (Intactas), de ratas ovariectomizadas por sete dias (OVX), de ratas OVX tratadas com 3 injeções s.c consecutivas de óleo de milho (Óleo) ou com cipionato de estradiol diluído em óleo de milho (Cipionato de E2, 10µg/0,2mL), após a inserção de implantes s.c. contendo 17β estradiol (17βE2 180µg/mL) ou óleo de milho (óleo) por 14 dias. Os dados são apresentados pela média ± EPM, * p<0,05; ** p<0,01 versus intactas pela análise de variância de uma via seguida do teste de Bonferroni

5.9 Análise da Amplitude do ritmo de atividade locomotora

A amplitude do ritmo de atividade locomotora mostrou-se reduzida em relação às fêmeas intactas após 7 dias de ovariectomia e elevada nos grupos OVX-Implante Óleo e OVX-Implante 17β-E2, que representam 21 dias de ovariectomia, quando comparados com o grupo OVX (Figura 15).

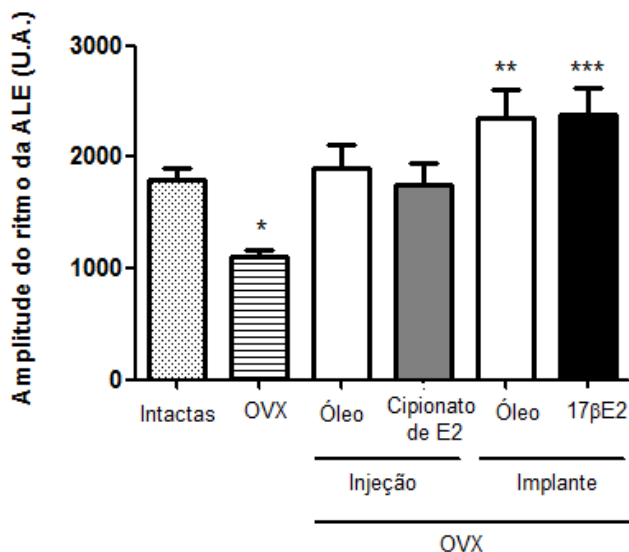


Figura 15: Análise da amplitude do ritmo circadiano de atividade locomotora de ratas ciclando regularmente (Intactas), de ratas ovariectomizadas por sete dias (OVX), de ratas OVX tratadas com 3 injeções s.c consecutivas de óleo de milho (Óleo) ou com cipionato de estradiol diluído em óleo de milho (cipionato de E2, 10µg/0,2mL), após a inserção de *pellets* s.c. contendo óleo de milho (Óleo) ou estradiol diluído em óleo de milho (17βE2, 180 µg/mL) por 14 dias. Os dados são apresentados pela média ± EPM; * versus Intactas p<0,05; **/** versus OVX p<0,01 e p<0,001, respectivamente, pela análise de variância de uma via seguida do teste de Bonferroni.

5.10 Análise da variação de temperatura interna

As ratas ciclando regularmente, após serem ovariectomizadas apresentaram valores de temperatura corporais mais baixos na fase clara, conforme apresentado na figura 16.

As ratas dos grupos OVX-Implante Óleo e OVX-Implante 17β -E2 não apresentaram diferença estatística na variação de temperatura corporal nos dias aos quais foram expostas ao tratamento. Os animais dos dois grupos apresentam oscilações circadianas, com temperaturas levemente mais elevadas no período de atividade, ou seja, fase escura (Figura 17).

Já as ratas OVX cipionato de E2 tiveram variações circadianas de temperatura no decorrer do tratamento que se diferenciaram das temperaturas apresentadas pelas ratas OVX+ injeção óleo na fase escura, conforme demonstrado na Figura 18.

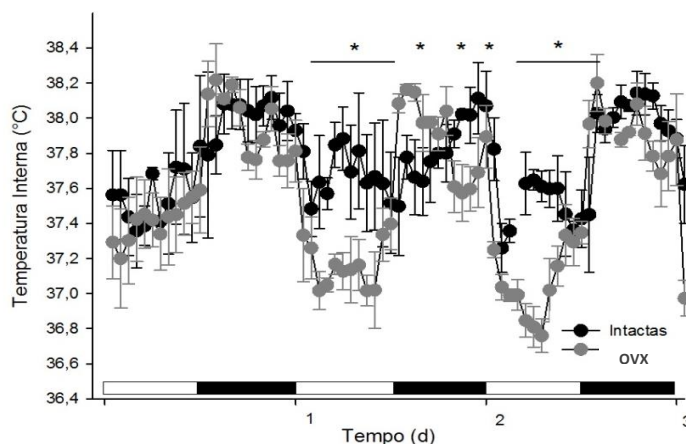


Figura 16. Variação da temperatura interna de ratas intactas (círculos pretos) ou ovariectomizadas (OVX) (círculos cinzas). Os dados são apresentados pela média \pm EPM; * $p < 0,05$ em comparação com grupo intactas pela análise de variância de medidas repetidas de duas vias seguida do teste de Tukey.

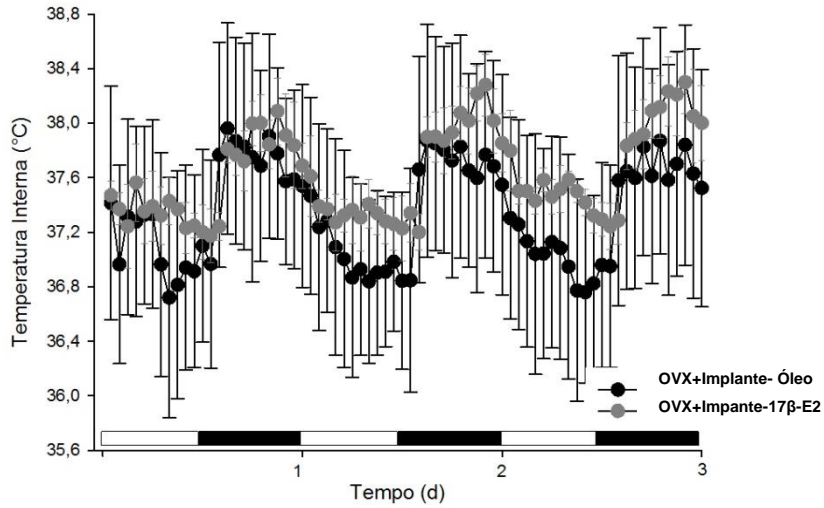


Figura 17. Variação da temperatura interna de ratas ovx tratadas com implantes s.c. contendo óleo de milho (círculos pretos) ou 17- β estradiol diluído em óleo de milho (180 μ g/mL) (círculos cinza). Os dados são apresentados pela média \pm EPM; * $p < 0,05$ em comparação com grupo óleo pela análise de variância de medidas repetidas de duas vias seguida do teste de *Tukey*

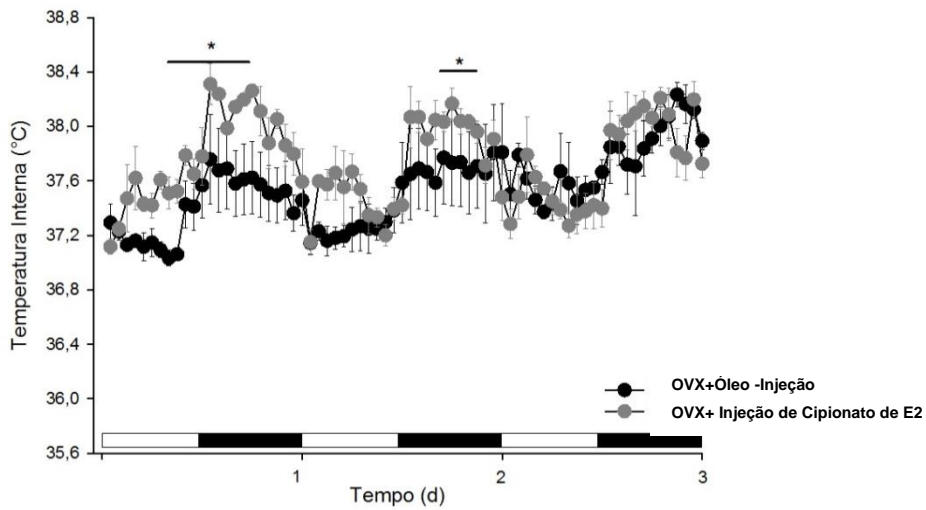


Figura 18. Variação da temperatura interna de ratas ovx tratadas com 3 injeções s.c. consecutivas de óleo de milho (círculos pretos) ou cipionato de estradiol diluído em óleo de milho (10 μ g/0,2mL) (círculos cinza). Os dados são apresentados pela média \pm EPM; * $p < 0,05$ em comparação com grupo óleo pela análise de variância de medidas repetidas de duas vias seguida do teste de *Tukey*.

5.11 Análise da amplitude do ritmo de temperatura interna

A amplitude do ritmo de temperatura interna apresentou-se elevada no grupo OVX-Implante 17 β -E2, quando comparado com o grupo de ratas ciclando regularmente. Diante dos demais tempos de ovariectomia (7 e 11 dias) ou tratamentos (injeção de óleo ou estradiol e implantes contendo óleo de milho), a amplitude manteve-se inalterada (Figura 19).

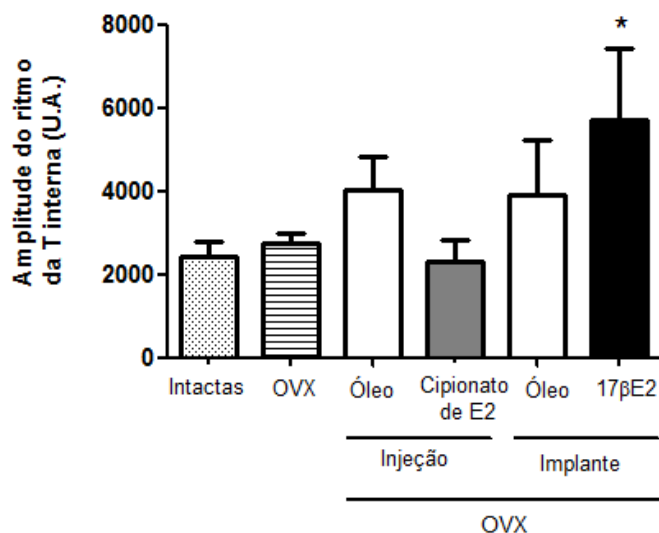


Figura 19: Análise da amplitude do ritmo circadiano de temperatura interna de ratas ciclando regularmente (Intactas), de ratas ovariectomizadas por sete dias (OVX), de ratas OVX tratadas com 3 injeções s.c consecutivas de óleo de milho (Óleo) ou com cipionato de estradiol diluído em óleo de milho (cipionato de E2, 10 μ g/0,2mL), após a inserção de *pellets* s.c. contendo óleo de milho (Óleo) ou estradiol diluído em óleo de milho (17 β E2, 180 μ g/mL) por 14 dias. Os dados são apresentados pela média \pm EPM; * $p < 0,05$ em comparação com grupo OVX pela análise de variância de uma via seguida do teste de *Bonferroni*.

6. DISCUSSÃO

6.1 Padronização do modelo “crônico” de tratamento com estradiol

O estabelecimento de um modelo de reposição hormonal pouco invasivo é de grande valia, uma vez que permite manter concentrações adequadas de estradiol sem que os animais passem por injeções diárias de E2 por um longo período. Este foi um dos objetivos deste estudo, que nos permitiu realizar um tratamento com estradiol por 14 dias durante os quais avaliamos, também, parâmetros do ritmo circadiano.

A cirurgia de ovariectomia ocasiona uma queda abrupta dos níveis de estrógeno que está associada, entre outros fatores, com aumento de peso corporal, aumento de ingestão alimentar e elevação dos níveis de LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante) (Geary *et al.*, 2001; Asarian e Geary, 2006). Na falta de estradiol a concentração de FSH e de LH circulantes tendem a aumentar de cinco a dez vezes em função da perda do mecanismo de *feedback* negativo exercido por esse hormônio ovariano, responsável pela sinalização hipotalâmica para redução da secreção de gonadotrofinas. Tratamentos de reposição com baixas doses de estradiol são capazes de diminuir os níveis plasmáticos de LH, de ganho de peso corporal, como o observado em nossos experimentos, e de reestabelecer níveis séricos de estradiol.

A ação do estradiol sobre a morfologia do útero de ratas foi descrita ainda na década de 50 por (Everett e Sawyer) que relataram mudanças ocorridas no decorrer do ciclo estral frente às oscilações dos níveis de estrógenos. No presente trabalho, foi observada uma redução no peso uterino de ratas ovariectomizadas e o

reestabelecimento de peso de útero em animais tratados com implante de E2 ou injeções de cipionato de E2. Dessa forma, podemos concluir que o modelo de reposição hormonal com estradiol utilizando implantes de 17β -E2 parece ser satisfatório para o propósito de restabelecer os níveis de estradiol plasmático.

6.2 Efeito do estradiol sobre o ganho de peso

Os mecanismos pelos quais o tratamento com estradiol reduz o ganho de peso tem sido amplamente investigados e, há evidências de que ele atue em regiões hipotalâmicas tais como PVN e núcleo arqueado promovendo diminuição da ingestão de alimentos (Simonian e Herbison, 1997; Mauvais-Jarvis *et al.*, 2013). Nesse sentido, o ER α (receptor alfa de estradiol) parece ser o responsável pelas ações centrais do estradiol em controlar a homeostase energética. Xu *et al.* (2011) demonstraram que neurônios hipotalâmicos positivos para o fator esteroideogênico 1 (SF-1) ou para pro-opiomelanocortina (POMC) que não expressam ER α apresentam metabolismo reduzido, obesidade visceral e hiperfagia. A expressão de ER α em neurônios POMC pode explicar como o estradiol facilita a secreção de α -MSH (hormônio estimulante de melanócitos tipo alfa) que age nos receptores de melanocortina 3 e 4 nos núcleos lateral e paraventricular do hipotálamo, gerando efeito catabólico que resulta em perda de peso e aumento de gasto energético (Elmqvist *et al.*, 1998). Além disso, camundongos fêmeas e macho nocautes para o receptor alfa apresentaram ganho de peso secundário à redução do gasto energético (Ribas *et al.*, 2010). Outro achado interessante é que os ER α estão colocalizados com receptores longos de leptina, no núcleo arqueado do hipotálamo, podendo o estradiol exercer uma função moduladora

da mesma. Níveis aumentados de estradiol tem sido associados com aumento da sensibilidade à leptina em roedores (Clegg *et al.*, 2003; Clegg *et al.*, 2006). Em nosso trabalho, não foi avaliada a expressão de RNAm de leptina no tecido adiposo ou sua concentração plasmática. No entanto, tendo em vista que esse é um hormônio que tem um padrão circadiano de liberação (Sukumaran *et al.*, 2010), o estradiol poderia agir como um facilitador no tecido adiposo branco para receber as informações eferentes do relógio central, frente à liberação de leptina por este tecido.

Alternativamente, o estradiol poderia agir diretamente no tecido adiposo branco promovendo lipólise e diminuição deste tecido, conforme observado em um estudo com ratas espontaneamente hipertensas (SHR) (Abeles *et al.*, 2012) podendo inibir, também, genes chaves da adipogênese (Stubbins *et al.*, 2012). Um estudo com camundongos α ERKO revelou menor peso de tecido adiposo perigonadal, inguinal, e perirenal nos animais machos e fêmeas selvagens (Heine *et al.*, 2000). De fato, esse efeito foi observado em nossos resultados. Ambos tratamentos, implantes de 17β -E2 e cipionato de E2, levaram à uma redução no ganho de peso corporal e uma diminuição no peso do TAR. Estes efeitos podem ser decorrentes tanto de uma ação indireta do E2 sobre a saciedade (como detalhado acima), como direta no tecido adiposo.

Os estrógenos parecem promover, ainda, uma redistribuição de gordura. Mulheres apresentam maior proporção de gordura subcutânea enquanto homens possuem maior tecido adiposo visceral. De maneira importante, essa redistribuição é abolida em mulheres na pós-menopausa quando comparadas a homens de mesma idade (Kotani *et al.*, 1994). Uma vez que, dentre os depósitos de gordura analisados no

presente estudo, o E2 reduziu o peso somente do TAR, aventamos que possa ser em decorrência do efeito deste hormônio sobre a redistribuição de gordura corporal.

Esta ação do estradiol no tecido adiposo branco parece ser mediada pelos ER- α . Há estudos que indicam que camundongos nocautes para estes receptores são lipodistróficos (ausência de gordura subcutânea) e apresentam perda de gordura visceral. Além disso, no tecido adiposo, o ER α parece promover a quebra dos estoques de gordura (Pedersen *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2015) e camundongos que apresentam mutações no gene que codifica tal receptor são obesos. Tratamento de ratas ovariectomizadas com E2 reduz a expressão do ER α (e não do ER β) no TAR (Heine *et al.*, 2000). Dessa forma, sugerimos que a ação do E2 observado em nossos estudos seja via este receptor. Não observamos efeito do E2 no peso do tecido adiposo perigonadal (TAP). Diferente dos nossos resultados, contudo, (Zhu *et al.*, 2015) demonstraram, recentemente, que o tratamento de camundongas com estradiol levou a uma diminuição dos estoques de tecido adiposo perigonadal. Esta divergência pode ser explicada pela diferença entre as espécies analisadas. Apesar disso, podemos dizer que há um efeito claro do estradiol em reduzir o peso do tecido adiposo branco em roedores.

6.3 Efeito do estradiol sobre o relógio local

Considerando-se a redução do peso do TAR induzido pelo estradiol, elegemos este tecido para analisar a expressão dos genes da alça molecular principal do relógio, *Per1* e *Bmal1* e, da alça auxiliar, o gene *Reverb α* . O tratamento com implantes de 17 β -

E2 permite observar os efeitos do E2 por período maior do que com injeções de E2 (14 dias versus 4 dias, respectivamente), assim, optamos por analisar a expressão temporal dos genes *Per1* e *Bmal1* no TAR. Em resultados preliminares (não mostrados nesta dissertação), observamos que a expressão do gene *Per1* não variou nos ZTs analisados tanto no grupo Óleo-*Pellet* quanto no grupo E2-*Pellet*. O tratamento com implantes de 17β -E2, no entanto, leva a variações temporais que não foram observadas no grupo implante Óleo, com um aumento na expressão do gene *Bmal1* no ZT0.

As proteínas do relógio apresentam um ritmo circadiano de expressão em todas as células do organismo e o controle da expressão destas proteínas é dependente, em nível celular, da regulação da maquinaria dos genes de relógio (*Clock*, *Bmal1*, *Per* e *Cry*) (Zanquetta *et al.*, 2010).

A coerência de fase da expressão destas proteínas, ao nível celular, é fator determinante para o funcionamento das variações circadianas advindas do tecido em questão, que pode ser nomeado de relógio periférico. Esta coerência depende do relógio central, o NSQ, em mamíferos, que tem função de coordenar os múltiplos relógios periféricos por meio de diversos sinais internos, que são considerados *zeitgebers* internos (Challet, 2015). Está bem estabelecido, por exemplo, que a variação circadiana na secreção de glicocorticóide é abolida pela lesão do NSQ (Kalsbeek e Fliers, 2013). Assim, o hormônio estradiol poderia ser o sinal interno, regulado pelo NSQ, utilizado pelo organismo para estabelecer sincronia de fase ao nível celular de relógios periféricos. O E2 não apresenta variações circadianas de liberação, no entanto, poderia ter um efeito permissivo sobre as ações de outros

zeitgebers internos. Por exemplo, a secreção de leptina é circadiana e regulada pelos NSQ via sistema nervoso autonômico (Zanquetta *et al.*, 2010); as ações de promover saciedade deste hormônio parecem depender de uma ação permissiva do E2, uma vez que mulheres na pós-menopausa (com baixos níveis circulantes de E2) apresentam dislipidemia, aumento da adiposidade central e altos níveis de leptina circulantes (Tanko e Christiansen, 2006).

As oscilações temporais de *Per1* e *Bmal1* podem ser cruciais para garantir a manutenção da homeostasia lipídica e o estradiol parece contribuir nessa dinâmica, uma vez que levou a variações temporais do gene *Bmal1*. De fato, alterações no perfil circadiano de expressão de *Per1*, *Bmal1* e *Clock* são observadas em obesos (Vieira *et al.*, 2014) e mulheres menopausadas apresentam ganho de peso (Van Sinderen *et al.*, 2015). O pico de expressão de *Bmal1* no adiposo inguinal de camundongas é no ZT1 (Yoo *et al.*, 2004), e nas amostras coletadas no ZT0 pudemos observar também a expressão de *Bmal1* aumentada. Até onde sabemos, não foi analisada a expressão temporal de *Per1* no tecido adiposo branco de ratas, mas se compararmos, a expressão deste gene, no fígado, por exemplo, um aumento acontece no início da fase de escuridão - ZT12 em (Horta, 2014) e, ZT14 em (Su *et al.*, 2016). No presente trabalho houve uma grande dispersão nos resultados para o gene *Per1* (dados não apresentados), mas acreditamos que essa análise é de grande importância para apreciação mais completa dos efeitos do estradiol sobre o funcionamento da maquinaria do relógio circadiano nesse tecido.

O tratamento com cipionato de E2 aumentou a expressão de *Per1*, no entanto, não afetou a expressão de *Bmal1*, apesar de uma tendência a diminuí-la ($p=0,059$).

Esse foi um achado interessante porque *Per1* e *Bmal1* são componentes de partes diferentes da alça da maquinaria celular, de modo que, devem apresentar expressões em antifase (quando um está no seu pico de expressão, espera-se que o outro esteja no nadir). Por se tratar de um tratamento curto, as injeções de cipionato de estradiol podem evidenciar um efeito agudo desse hormônio sobre a expressão dos genes de relógio nos tecidos periféricos analisados. O padrão aumentado de *Per1* em relação ao controle fornece um indicativo de que o estradiol possa estar modulando a expressão desse gene, o que poderia levar a sincronização da alça local da maquinaria do relógio no tecido adiposo e contribuir para o reestabelecimento da homeostase energética. De fato, a reposição via implantes de 17β -E2 levou à alterações de fase no ritmo de expressão gênica, o que justifica, no nosso trabalho, o aparecimento do pico de expressão de *Bmal1* no ZT0. Os efeitos de arraste nos parâmetros do ritmo circadiano causados por alguma pista ambiental ou interna só são observadas após alguns dias da exposição ao *zeitgeber*. Animais expostos a alteração de ciclo de luz, por exemplo, quando em ambiente de luminosidade e escuridão, ou expostos a um pulso de luz branca, quando anteriormente em escuridão constante, apresentam mudanças no padrão circadiano de atividade locomotora, que são observadas nos actogramas depois de aproximadamente 3 dias (Yamazaki *et al.*, 2000). Fazendo um paralelo com os nossos resultados de expressão gênica, podemos dizer que após três dias de injeção de estradiol, este hormônio leva a um aumento da expressão de *Per1*, necessária para o arraste de fase do ritmo circadiano de expressão da maquinaria do relógio, neste caso, temos que supor um padrão oscilatório do relógio local (tecido adiposo) na rata com ciclos estrais regulares (dados não observados neste trabalho e

inexistente na literatura até o presente) (Figura 20). Este efeito de pista para o relógio para promover o arraste na maquinaria molecular, já foi, de fato, demonstrada no NSQ, onde um pulso de luz leva a um aumento de *Per1* e arraste de fase (Weaver, 2002, 2001). Em conclusão, aventamos a possibilidade de o estradiol possa estar funcionando como uma pista interna para o relógio local do tecido adiposo.

O receptor nuclear Rev-erb α é descrito como um componente do relógio biológico que atua no sentido de manter ciclos de oscilações da maquinaria molecular circadiana. Animais nocautes de Rev-erb α , apesar de continuarem apresentando ritmos circadianos, mostram um encurtamento no período de atividade (Preitner *et al.*, 2002). Além disso, esse receptor desempenha um papel importante no metabolismo lipídico, regulando a adipogênese e a homeostase de triglicérides. Camundongos nocautes para Rev-erb- α apresentam dislipidemia, com elevados níveis de (VLDL), triglicérides e aumento de níveis séricos de apo lipoproteína C3, além de serem hiperglicêmicos quando comparados aos controles (Preitner *et al.*, 2002; Raspe *et al.*, 2002; Fontaine *et al.*, 2003; Delezie *et al.*, 2012). Em nosso estudo, tratamento com cipionato de E2 aumentou a expressão de *Reverb- α* . Estes dados se correlacionam com a redução do ganho de peso corporal observado nas ratas tratadas com E2. Tratamento com agonista para *Reverb- α* em camundongos promove perda de peso corporal e de massa gordurosa e aumenta o consumo de O₂, indicando um efeito deste componente da maquinaria do relógio sobre o metabolismo basal (Solt *et al.*, 2012). Assim, o efeito do estradiol em reduzir a massa do TAR e o peso corporal pode ser via o aumento de *Reverb- α* . Além disso, o aumento de *Reverb- α* promovido pelo E2 pode ter modificado a maquinaria molecular do relógio biológico do TAR, uma vez que após o tratamento

com E2-injeção, a expressão de *Per1* também aumentou, e no ZT analisado (ZT12) o E2 não alterou significativamente a expressão de *Bmal1*, embora a mesma apresentou-se com uma tendência de diminuição ($p = 0,054$). Contrário aos nossos achados, Zhu *et al.* (2015) demonstraram que o estradiol não teve nenhum efeito sobre a expressão dos genes de relógio no tecido adiposo perigonadal de camundongas. Assim, o efeito do estradiol parece ser dependente da espécie e do depósito gorduroso analisado.

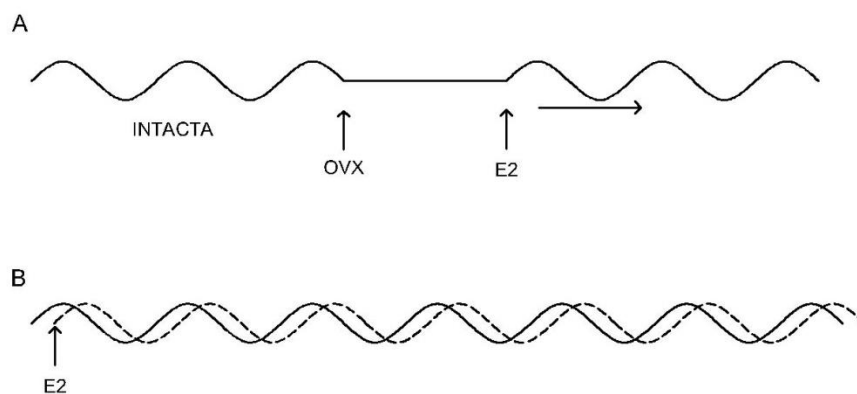


Figura 20. Modelo de funcionamento do relógio biológico no tecido adiposo branco relativo ao perfil de expressão gênica (painel A) e representação do efeito do estradiol em gerar um arraste de fase no ritmo circadiano (painel B).

6.4 Efeito do estradiol sobre o relógio central: avaliação do ritmo circadiano de atividade locomotora

Sabe-se que fêmeas nocautes de aromatase – enzima que converte testosterona em estradiol – exibem menor atividade locomotora espontânea e aumento de atividade na fase de luminosidade quando comparadas com a linhagem selvagem,

sugerindo que a ausência de estradiol durante o desenvolvimento modifica a expressão do ritmo diário de atividade (Solt *et al.*, 2012). Já camundongos machos com alterações no receptor ER- α apresentam alterações no padrão de atividade locomotora em livre curso, no horário do início da atividade e na distribuição da atividade entre as fases de luminosidade e de escuridão (Blattner e Mahoney, 2014). No que se refere à atividade locomotora espontânea total, obtida do número de rotações na roda, tem-se uma redução de aproximadamente 80% após ovariectomia em camundongas e reversão do quadro em poucos dias após administração de 17 β -E2 (Gorzek *et al.*, 2007). Em ratas ovariectomizadas implantes de estradiol na área preóptica resultaram em aumento de atividade espontânea na roda (Fahrbach *et al.*, 1985). No presente estudo, o registro de atividade locomotora foi realizado por telemetria, o que permite a avaliação da atividade locomotora e a distribuição da mesma entre fase de luminosidade e de escuridão, mas não da distância percorrida. Os registros obtidos forneceram os seguintes parâmetros: horários de início (*onset*), pico (*acrophase*) e final (*offset*) do ritmo de atividade locomotora bem como a amplitude. Os resultados de *onset* revelaram que a ovariectomia ocasionou, por até 10 dias, uma antecipação desse horário. Aos 21 dias de ovariectomia, representados pelos grupos OVX-Implante óleo ou OVX-Implante 17 β -E2 já não há diferença estatística em comparação ao grupo de animais intactos, com uma aparente tendência ao reestabelecimento do horário mais tardio de início de atividade. Acreditamos que esse fato esteja associado ao estabelecimento de um mecanismo contra-regulatório à perda de um sinalizador para o núcleo supraquiasmático causado pela ovariectomia. Em nossas análises observamos que durante o ciclo estral, os horários de início de atividade sofreram alterações, que

acreditamos serem provenientes das oscilações nos níveis de estradiol e progesterona observadas durante o ciclo estral. Condizentes com esta hipótese, alguns trabalhos descrevem que há um avanço do *onset* no período pré-ovulatório, o qual pode ser em decorrência de níveis mais elevados de estradiol observados nesta fase; este hormônio parece, então, exercer um efeito ao alterar algum efator que delimite o limiar para horário do início da atividade locomotora (Morin, Fitzgerald, Rusak, *et al.*, 1977; Morin, Fitzgerald e Zucker, 1977). De fato, após a remoção desse esteroide, houve uma alteração deste parâmetro, de modo que o horário de início de atividade passou a acontecer praticamente imediatamente após as luzes serem apagadas. Os tratamentos com estradiol via injeções de cipionato de E2 ou via implantes de 17β -E2, ao contrário do esperado, não reestabeleceram o *onset*. Baseado nestes resultados, levantamos a hipótese de que o tratamento com estradiol não foi capaz de reestabelecer o mecanismo regulador do horário da atividade circadiana, o qual foi perdido após a ovariectomia. Uma vez que esta regulação foi alterada pela ovariectomia, interessantemente, não podemos excluir a participação dos esteroides ovarianos. Para a acrofase e *offset* não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. O tempo decorrido após a ovariectomia parece influenciar, verdadeiramente, o ritmo circadiano de atividade locomotora, já que além de exercer ação sobre o *onset*, altera, também, a amplitude. Após 7 dias de ovariectomia, ocorre uma redução na amplitude quando comparada com animais intactos e um aumento após 21 dias de ovariectomia, quando comparada com 7 dias de ovariectomia (grupo OVX versus OVX-Implante óleo e OVX-Implante 17β -E2). Se em nosso estudo o estradiol não foi capaz de interferir com o *onset* e com a amplitude do ritmo circadiano de ratas, por outro lado, em

camundongos machos e fêmeas, este hormônio tem ação de antecipar o horário de início da atividade, bem como aumentar a amplitude da atividade locomotora [89,90]. Interessantemente, nestes estudos da literatura, o tratamento com estradiol teve início logo após a remoção das gônadas.

Acreditamos fortemente que um possível mecanismo de regulação da atividade locomotora que dependa dos esteroides ovarianos envolva o peptídeo neuromedina S (NMS). Tem sido proposto a participação deste peptídeo no controle da atividade locomotora espontânea. A NMS está expressa restritamente no NSQ com pico diurno de expressão; injeção intracerebroventricular de NMS causa alteração de fase de atividade locomotora em ratos (MORI, 2005) e a mutação condicional do gene *clock* em neurônios que expressam NMS leva a um período mais longo de atividade. Estas ações devem-se a ligação deste peptídeo a receptores de NMS do tipo 2 (NMU2R), expressos nos núcleos paraventricular e arqueado do hipotálamo (Lee *et al.*, 2015). Interessantemente, a expressão gênica da NMS e do NMU2R sofrem oscilações no decorrer do ciclo estral, apresentando valores mais altos durante o proestro e mais baixos no estro e diestro I (Vigo *et al.*, 2007). Esta expressão, portanto, correlaciona-se, positivamente, com as flutuações de estradiol observadas durante o período pré-ovulatório (Moenter *et al.*, 2009). Por outro lado, a ovariectomia (por 7 dias) reduz os níveis de mRNA de NMS no NSQ, no entanto, o tratamento com Ovx+ implante 17 β E2 por 7 dias não reverte esta redução (Vigo *et al.*, 2007). Levando-se em consideração a participação da NMS sobre o período e fase do ritmo circadiano de atividade locomotora, mais uma vez, e, de acordo com nossos achados, podemos dizer que há uma participação dos esteroides ovarianos, esta participação, no entanto, não pode ser

confirmada com o modelo de ovariectomia por 7 dias e, posterior reposição hormonal com estradiol.

No que se refere ao poder anorexígeno da NMS, os mecanismos ainda não foram elucidados. No entanto, esse efeito foi observado em um estudo no qual injeções intracerebroventriculares de NMS em ratos foram capazes de reduzir a ingestão alimentar durante a fase de escuridão e que esse efeito persistiu por três dias (Ida, 2005). Desse modo, mais estudos precisam ser feitos a respeito dos mecanismos nos quais a NMS exerce suas funções sobre a ingestão alimentar, no entanto, a relação entre o estradiol e esse peptídeo parece dar indícios de que esses dois fatores desempenhem uma função conjunta na dinâmica alimentar. De tal maneira, a diminuição de peso corporal e do tecido adiposo retroperitoneal decorrentes do tratamento com estradiol obtidos em nossos estudos podem ser também explicadas por essa ação do estradiol sobre o relógio central, mediado pela neuromedina S.

6.5 Efeito do estradiol sobre o relógio central: avaliação do ritmo circadiano de temperatura interna

A variação de temperatura interna é outra variável fisiológica que apresenta um ritmo circadiano, o qual é controlado pelo relógio central (Liu *et al.*, 1998). Em nossos estudos, o tratamento com implantes de 17β -E2 não foi capaz de promover alterações na temperatura interna, resultados similares aos encontrados por (Dacks e Rance, 2010). Já, frente a um desafio térmico (exposição dos animais a ambiente aquecido), ratas OVX, tratadas tanto com injeções de 2 μ g de benzoato de estradiol ou com

implantes de estradiol (Dacks e Rance, 2010) apresentam uma temperatura corporal mais elevada em comparação ao grupo óleo.

Por outro lado, verificamos diferenças significativas nas temperaturas internas entre os grupos injeção cipionato de E2 e Óleo-injeção, onde maiores valores de temperaturas interna foram observadas predominantemente na fase de escuridão dos animais OVXc Cipionato de E2. Corroborando estes resultados, injeções com 1, 3 ou 10 µg de benzoato de estradiol s.c. elevam a temperatura interna de ratas ovariectomizadas (Marrone *et al.*, 1976).

Comparou-se, também, a temperatura interna das ratas intactas (com ciclo estral regular) com a temperatura dessas mesmas ratas após a cirurgia de ovariectomia. Após a ovariectomia houve uma diminuição nos valores de temperatura interna na fase clara, efeito semelhante ao encontrado durante o tratamento com cipionato de estradiol e injeção de óleo no qual os animais controles apresentaram temperaturas mais baixas que os tratados com E2, este efeito, contudo, observado durante a fase escura. Esses resultados nos fazem acreditar em uma participação do estradiol na regulação da variação circadiana de temperatura, embora não tenhamos encontrado na literatura trabalhos que tenham avaliado essa oscilação circadiana ou os efeitos dos hormônios ovarianos sobre esse parâmetro.

Além disso, tem sido postulado que as variações internas de temperatura corporal possam funcionar como um *zeitgeber* universal para os relógios periféricos (Brown *et al.*, 2002; Buhr *et al.*, 2010; Poletini *et al.*, 2015). Levando-se em consideração esta possibilidade, o estradiol, além de influenciar a oscilação circadiana

de temperatura, poderia sinalizar para o tecido adiposo via seu efeito modulatório sobre a temperatura interna.

7. CONCLUSÃO

Frente aos resultados do tratamento com estradiol sobre a expressão dos genes de relógio em tecidos periféricos (tecido adiposo branco) e sobre o relógio central (atividade locomotora e temperatura), podemos concluir que esse hormônio pode agir diretamente sobre o ritmo circadiano local e indiretamente criando condições para que os relógios periféricos e central detectem os diversos *zeitgebers* (ou pistas de sincronização).

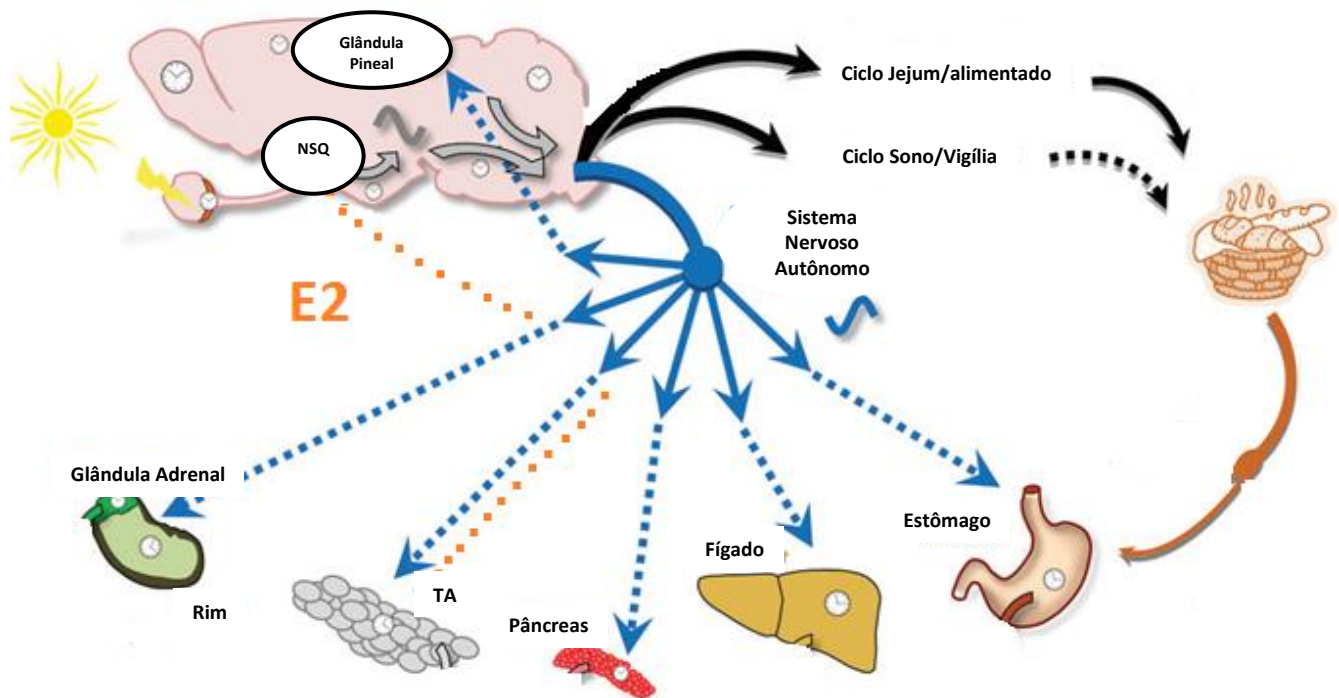


Figura 21. Representação esquemática do efeito do estradiol sobre o sistema circadiano adaptada de Challet, 2015. O núcleo supraquiasmático é resetado pela luz, percebida pela retina (seta amarela). Os tecidos periféricos recebem informações do NSQ via sistema nervoso autônomo (setas azuis). O ciclo jejum/alimentado e o ciclo sono/vigília são moduladores dos tecidos periféricos. Em alaranjado, os resultados do presente trabalho representando os pontos nos quais o estradiol exerceu influência sobre o ritmo circadiano das ratas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, E.; CORDEIRO, L. M.; MARTINS ADE, S.; PESQUERO, J. L.; REIS, A. M.; ANDRADE, S. P.; BOTION, L. M. Estrogen therapy attenuates adiposity markers in spontaneously hypertensive rats. **Metabolism**, v. 61, n. 8, p. 1100-7, Aug 2012.

AKHTAR, R. A.; REDDY, A. B.; MAYWOOD, E. S.; CLAYTON, J. D.; KING, V. M.; SMITH, A. G.; GANT, T. W.; HASTINGS, M. H.; KYRIACOU, C. P. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. **Curr Biol**, v. 12, n. 7, p. 540-50, Apr 2 2002.

ALBERS, H. E.; GERALL, A. A.; AXELSON, J. F. Effect of reproductive state on circadian periodicity in the rat. **Physiol Behav**, v. 26, n. 1, p. 21-5, Jan 1981.

ALBRECHT, U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. **Neuron**, v. 74, n. 2, p. 246-60, Apr 26 2012.

ANDREWS, W. W.; ADVIS, J. P.; OJEDA, S. R. The maturation of estradiol-negative feedback in female rats: evidence that the resetting of the hypothalamic "gonadostat" does not precede the first preovulatory surge of gonadotropins. **Endocrinology**, v. 109, n. 6, p. 2022-31, Dec 1981.

ASARIAN, L.; GEARY, N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 361, n. 1471, p. 1251-63, Jul 29 2006.

ASCHOFF, J. Phase relations between a circadian rhythm and its zeitgeber within the range of entrainment. **Naturwissenschaften**, v. 65, p. 80-84, 1978.

ASCHOFF, J. Sources of thoughts from temperature regulation to rhythm research. **Chronobiol. Int**, v. 7, p. 8, 1990.

BALSALOBRE, A.; DAMIOLA, F.; SCHIBLER, U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. **Cell**, v. 93, n. 6, p. 929-37, Jun 12 1998.

BLATTNER, M. S.; MAHONEY, M. M. Estrogen receptor 1 modulates circadian rhythms in adult female mice. **Chronobiol Int**, v. 31, n. 5, p. 637-44, Jun 2014.

BRAY, M. S.; YOUNG, M. E. The role of cell-specific circadian clocks in metabolism and disease. **Obes Rev**, v. 10 Suppl 2, p. 6-13, Nov 2009.

BROWN, S. A.; ZUMBRUNN, G.; FLEURY-OLELA, F.; PREITNER, N.; SCHIBLER, U. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. **Curr Biol**, v. 12, n. 18, p. 1574-83, Sep 17 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. 379-85, Oct 15 2010.

BUIJS, R. M.; WORTEL, J.; HOU, Y. X. Colocalization of gamma-aminobutyric acid with vasopressin, vasoactive intestinal peptide, and somatostatin in the rat suprachiasmatic nucleus. **J Comp Neurol**, v. 358, n. 3, p. 343-52, Jul 31 1995.

BURGER, H. G.; DUDLEY, E.; MAMERS, P.; ROBERTSON, D.; GROOME, N.; DENNERSTEIN, L. The ageing female reproductive axis I. **Novartis Found Symp**, v. 242, p. 161-7; discussion 167-71, 2002.

POLETINI, M. O. P. M. N. M. B. C. R. R. J. A. M. D. L. TRP Channels: a missing bond in the entrainment mechanism of peripheral clocks throughout evolution. **Temperature**, v. 2, n. 4, p. 522-34, 2015.

CHALLET, E. Keeping circadian time with hormones. **Diabetes Obes Metab**, v. 17 Suppl 1, p. 76-83, Sep 2015.

CHAPPELL, P. E.; LEE, J.; LEVINE, J. E. Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. II. Role of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate. **Endocrinology**, v. 141, n. 4, p. 1486-92, Apr 2000.

CHEONG, R. Y.; CZIESELSKY, K.; PORTEOUS, R.; HERBISON, A. E. Expression of ESR1 in Glutamatergic and GABAergic Neurons Is Essential for Normal Puberty Onset, Estrogen Feedback, and Fertility in Female Mice. **J Neurosci**, v. 35, n. 43, p. 14533-43, Oct 28 2015.

CLEGG, D. J.; BROWN, L. M.; WOODS, S. C.; BENOIT, S. C. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. **Diabetes**, v. 55, n. 4, p. 978-87, Apr 2006.

CLEGG, D. J.; BROWN, L. M.; ZIGMAN, J. M.; KEMP, C. J.; STRADER, A. D.; BENOIT, S. C.; WOODS, S. C.; MANGIARACINA, M.; GEARY, N. Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 1051-8, Apr 2007.

CLEGG, D. J.; RIEDY, C. A.; SMITH, K. A.; BENOIT, S. C.; WOODS, S. C. Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p. 682-7, Mar 2003.

DACKS, P. A.; RANCE, N. E. Effects of estradiol on the thermoneutral zone and core temperature in ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 151, n. 3, p. 1187-93, Mar 2010.

DAMIOLA, F.; LE MINH, N.; PREITNER, N.; KORNMANN, B.; FLEURY-OLELA, F.; SCHIBLER, U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues

from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. **Genes Dev**, v. 14, n. 23, p. 2950-61, Dec 1 2000.

DARIMONT, C.; DELANSORNE, R.; PARIS, J.; AILHAUD, G.; NEGREL, R. Influence of estrogenic status on the lipolytic activity of parametrial adipose tissue in vivo: an in situ microdialysis study. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 1092-6, Mar 1997.

DELEZIE, J.; DUMONT, S.; DARDENTE, H.; OUDART, H.; GRECHEZ-CASSIAU, A.; KLOSEN, P.; TEBOUL, M.; DELAUNAY, F.; PEVET, P.; CHALLET, E. The nuclear receptor REV-ERB α is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. **FASEB J**, v. 26, n. 8, p. 3321-35, Aug 2012.

DIEUDONNE, M. N.; PECQUERY, R.; LENEVEU, M. C.; GIUDICELLI, Y. Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. **Endocrinology**, v. 141, n. 2, p. 649-56, Feb 2000.

DODD, A. N.; SALATHIA, N.; HALL, A.; KEVEI, E.; TOTH, R.; NAGY, F.; HIBBERD, J. M.; MILLAR, A. J.; WEBB, A. A. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. **Science**, v. 309, n. 5734, p. 630-3, Jul 22 2005.

ELMQUIST, J. K.; MARATOS-FLIER, E.; SAPER, C. B.; FLIER, J. S. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. **Nat Neurosci**, v. 1, n. 6, p. 445-50, Oct 1998.

EVERETT, J. W.; SAWYER, C. H. A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. **Endocrinology**, v. 47, n. 3, p. 198-218, Sep 1950.

FAHRBACH, S. E.; MEISEL, R. L.; PFAFF, D. W. Preoptic implants of estradiol increase wheel running but not the open field activity of female rats. **Physiol Behav**, v. 35, n. 6, p. 985-92, Dec 1985.

FONTAINE, C.; DUBOIS, G.; DUGUAY, Y.; HELLEDIE, T.; VU-DAC, N.; GERVOIS, P.; SONCIN, F.; MANDRUP, S.; FRUCHART, J. C.; FRUCHART-NAJIB, J.; STAELS, B. The orphan nuclear receptor Rev-Erb α is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma target gene and promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation. **J Biol Chem**, v. 278, n. 39, p. 37672-80, Sep 26 2003.

FREEMAN, M. E. **The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat**. The Physiology of Reproduction: Raven Press 1994.

GAMBACCIANI, M.; CIAPONI, M.; CAPPAGLI, B.; DE SIMONE, L.; ORLANDI, R.; GENAZZANI, A. R. Prospective evaluation of body weight and body fat distribution in

early postmenopausal women with and without hormonal replacement therapy. **Maturitas**, v. 39, n. 2, p. 125-32, Aug 25 2001.

GEARY, N. Estradiol, CCK and satiation. **Peptides**, v. 22, n. 8, p. 1251-63, Aug 2001.

GEARY, N.; ASARIAN, L.; KORACH, K. S.; PFAFF, D. W.; OGAWA, S. Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER-alpha null mice. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4751-7, Nov 2001.

GILLESPIE, J. M.; CHAN, B. P.; ROY, D.; CAI, F.; BELSHAM, D. D. Expression of circadian rhythm genes in gonadotropin-releasing hormone-secreting GT1-7 neurons. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5285-92, Dec 2003.

GORZEK, J. F.; HENDRICKSON, K. C.; FORSTNER, J. P.; RIXEN, J. L.; MORAN, A. L.; LOWE, D. A. Estradiol and tamoxifen reverse ovariectomy-induced physical inactivity in mice. **Med Sci Sports Exerc**, v. 39, n. 2, p. 248-56, Feb 2007.

GRIMALDI, B.; BELLET, M. M.; KATADA, S.; ASTARITA, G.; HIRAYAMA, J.; AMIN, R. H.; GRANNEMAN, J. G.; PIOMELLI, D.; LEFF, T.; SASSONE-CORSI, P. PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPARgamma. **Cell Metab**, v. 12, n. 5, p. 509-20, Nov 3 2010.

GUO, B.; CHATTERJEE, S.; LI, L.; KIM, J. M.; LEE, J.; YECHOOR, V. K.; MINZE, L. J.; HSUEH, W.; MA, K. The clock gene, brain and muscle Arnt-like 1, regulates adipogenesis via Wnt signaling pathway. **FASEB J**, v. 26, n. 8, p. 3453-63, Aug 2012.

HAMADA, T.; LESAUTER, J.; VENUTI, J. M.; SILVER, R. Expression of Period genes: rhythmic and nonrhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. **J Neurosci**, v. 21, n. 19, p. 7742-50, Oct 1 2001.

HE, P. J.; HIRATA, M.; YAMAUCHI, N.; HATTORI, M. A. Up-regulation of Per1 expression by estradiol and progesterone in the rat uterus. **J Endocrinol**, v. 194, n. 3, p. 511-9, Sep 2007.

HEINE, P. A.; TAYLOR, J. A.; IWAMOTO, G. A.; LUBAHN, D. B.; COOKE, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 23, p. 12729-34, Nov 7 2000.

HIRSCHBERG, A. L. Sex hormones, appetite and eating behaviour in women. **Maturitas**, v. 71, n. 3, p. 248-56, Mar 2012.

HORTA, N. A. C. Role of TRPV1 in the synchronization of peripheral clocks in rats. First PanAmerican Congress of Physiological Sciences, 2014. Foz do Iguaçu.

HUANG, W.; RAMSEY, K. M.; MARCHEVA, B.; BASS, J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. **J Clin Invest**, v. 121, n. 6, p. 2133-41, Jun 2011.

KALSBECK, A.; FLIERS, E. Daily regulation of hormone profiles. **Handb Exp Pharmacol**, n. 217, p. 185-226, 2013.

KO, C. H.; TAKAHASHI, J. S. Molecular components of the mammalian circadian clock. **Hum Mol Genet**, v. 15 Spec No 2, p. R271-7, Oct 15 2006.

KONOPKA, R. J.; BENZER, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, n. 9, p. 2112-6, Sep 1971.

KORNMANN, B.; SCHAAD, O.; BUJARD, H.; TAKAHASHI, J. S.; SCHIBLER, U. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. **PLoS Biol**, v. 5, n. 2, p. e34, Feb 2007.

KOTANI, K.; TOKUNAGA, K.; FUJIOKA, S.; KOBATAKE, T.; KENO, Y.; YOSHIDA, S.; SHIMOMURA, I.; TARUI, S.; MATSUZAWA, Y. Sexual dimorphism of age-related changes in whole-body fat distribution in the obese. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 18, n. 4, p. 207-2, Apr 1994.

LAVORATO, V. N.; DEL CARLO, R. J.; DA CUNHA, D. N.; OKANO, B. S.; BELFORT, F. G.; DE FREITAS, J. S.; DA MOTA GDE, F.; QUINTAO-JUNIOR, J. F.; SILAME-GOMES, L. H.; DRUMMOND, F. R.; CARNEIRO-JUNIOR, M. A.; DE OLIVEIRA, E. M.; MONTEIRO, B. S.; PRIMOLA-GOMES, T. N.; NATALI, A. J. Mesenchymal stem cell therapy associated with endurance exercise training: Effects on the structural and functional remodeling of infarcted rat hearts. **J Mol Cell Cardiol**, v. 90, p. 111-9, Jan 2016.

LEE, I. T.; CHANG, A. S.; MANANDHAR, M.; SHAN, Y.; FAN, J.; IZUMO, M.; IKEDA, Y.; MOTOIKE, T.; DIXON, S.; SEINFELD, J. E.; TAKAHASHI, J. S.; YANAGISAWA, M. Neuromedin s-producing neurons act as essential pacemakers in the suprachiasmatic nucleus to couple clock neurons and dictate circadian rhythms. **Neuron**, v. 85, n. 5, p. 1086-102, Mar 4 2015.

LEE, J.; LEE, S.; CHUNG, S.; PARK, N.; SON, G. H.; AN, H.; JANG, J.; CHANG, D. J.; SUH, Y. G.; KIM, K. Identification of a novel circadian clock modulator controlling BMAL1 expression through a ROR/REV-ERB-response element-dependent mechanism. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 469, n. 3, p. 580-6, Jan 15 2016.

LEFEVRE, J.; MCCLINTOCK, M. K. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. **Biol Reprod**, v. 38, n. 4, p. 780-9, May 1988.

LINDEN, A.; UVNAS-MOBERG, K.; FORSBERG, G.; BEDNAR, I.; SODERSTEN, P. Involvement of Cholecystokinin in Food Intake: III. Oestradiol Potentiates the Inhibitory Effect of Cholecystokinin Octapeptide on Food Intake in Ovariectomized Rats. **J Neuroendocrinol**, v. 2, n. 6, p. 797-801, Dec 1 1990.

LIU, Y.; MERROW, M.; LOROS, J. J.; DUNLAP, J. C. How temperature changes reset a circadian oscillator. **Science**, v. 281, n. 5378, p. 825-9, Aug 7 1998.

LOVEJOY, J. C.; CHAMPAGNE, C. M.; DE JONGE, L.; XIE, H.; SMITH, S. R. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. **Int J Obes (Lond)**, v. 32, n. 6, p. 949-58, Jun 2008.

MARCHEVA, B.; RAMSEY, K. M.; BUHR, E. D.; KOBAYASHI, Y.; SU, H.; KO, C. H.; IVANOVA, G.; OMURA, C.; MO, S.; VITATERNA, M. H.; LOPEZ, J. P.; PHILIPSON, L. H.; BRADFIELD, C. A.; CROSBY, S. D.; JEBAILY, L.; WANG, X.; TAKAHASHI, J. S.; BASS, J. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. **Nature**, v. 466, n. 7306, p. 627-31, Jul 29 2010.

MARRONE, B. L.; GENTRY, R. T.; WADE, G. N. Gonadal hormones and body temperature in rats: effects of estrous cycles, castration and steroid replacement. **Physiol Behav**, v. 17, n. 3, p. 419-25, Sep 1976.

MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. **Endocr Rev**, v. 34, n. 3, p. 309-38, Jun 2013.

MILLER, B. H.; OLSON, S. L.; TUREK, F. W.; LEVINE, J. E.; HORTON, T. H.; TAKAHASHI, J. S. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. **Curr Biol**, v. 14, n. 15, p. 1367-73, Aug 10 2004.

MOENTER, S. M.; CHU, Z.; CHRISTIAN, C. A. Neurobiological mechanisms underlying oestradiol negative and positive feedback regulation of gonadotrophin-releasing hormone neurones. **J Neuroendocrinol**, v. 21, n. 4, p. 327-33, Mar 2009.

MOLINE, M. L.; BROCH, L.; ZAK, R.; GROSS, V. Sleep in women across the life cycle from adulthood through menopause. **Sleep Med Rev**, v. 7, n. 2, p. 155-77, Apr 2003.

MOORE, R. Y.; SPEH, J. C.; LEAK, R. K. Suprachiasmatic nucleus organization. **Cell Tissue Res**, v. 309, n. 1, p. 89-98, Jul 2002.

MORIN, L. P.; FITZGERALD, K. M.; RUSAK, B.; ZUCKER, I. Circadian organization and neural mediation of hamster reproductive rhythms. **Psychoneuroendocrinology**, v. 2, n. 1, p. 73-98, 1977.

MORIN, L. P.; FITZGERALD, K. M.; ZUCKER, I. Estradiol shortens the period of hamster circadian rhythms. **Science**, v. 196, n. 4287, p. 305-7, Apr 15 1977.

NAKAMURA, T. J.; MORIYA, T.; INOUE, S.; SHIMAZOE, T.; WATANABE, S.; EBIHARA, S.; SHINOHARA, K. Estrogen differentially regulates expression of Per1 and Per2 genes between central and peripheral clocks and between reproductive and

nonreproductive tissues in female rats. **J Neurosci Res**, v. 82, n. 5, p. 622-30, Dec 1 2005.

NAKAMURA, T. J.; SELLIX, M. T.; KUDO, T.; NAKAO, N.; YOSHIMURA, T.; EBIHARA, S.; COLWELL, C. S.; BLOCK, G. D. Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues: effects of fluctuating ovarian steroid hormone levels. **Steroids**, v. 75, n. 3, p. 203-12, Mar 2010.

NAKAMURA, T. J.; SHINOHARA, K.; FUNABASHI, T.; KIMURA, F. Effect of estrogen on the expression of Cry1 and Cry2 mRNAs in the suprachiasmatic nucleus of female rats. **Neurosci Res**, v. 41, n. 3, p. 251-5, Nov 2001.

OLCESE, J.; SIKES, H. E.; RESUEHR, D. Induction of PER1 mRNA expression in immortalized gonadotropes by gonadotropin-releasing hormone (GnRH): involvement of protein kinase C and MAP kinase signaling. **Chronobiol Int**, v. 23, n. 1-2, p. 143-50, 2006.

OLOFSSON, L. E.; PIERCE, A. A.; XU, A. W. Functional requirement of AgRP and NPY neurons in ovarian cycle-dependent regulation of food intake. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 37, p. 15932-7, Sep 15 2009.

PANDA, S.; ANTOCH, M. P.; MILLER, B. H.; SU, A. I.; SCHOOK, A. B.; STRAUME, M.; SCHULTZ, P. G.; KAY, S. A.; TAKAHASHI, J. S.; HOGENESCH, J. B. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. **Cell**, v. 109, n. 3, p. 307-20, May 3 2002.

PANTALEAO, T. U.; MOUSOVICH, F.; ROSENTHAL, D.; PADRON, A. S.; CARVALHO, D. P.; DA COSTA, V. M. Effect of serum estradiol and leptin levels on thyroid function, food intake and body weight gain in female Wistar rats. **Steroids**, v. 75, n. 10, p. 638-42, Oct 2010.

PEDERSEN, S. B.; KRISTENSEN, K.; HERMANN, P. A.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; RICHELSEN, B. Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 4, p. 1869-78, Apr 2004.

PITTENDRIGH, C. S. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. **Annu Rev Physiol**, v. 55, p. 16-54, 1993.

PORTALUPPI, F.; VERGNANI, L.; MANFREDINI, R.; FERSINI, C. Endocrine mechanisms of blood pressure rhythms. **Ann N Y Acad Sci**, v. 783, p. 113-31, Aug 15 1996.

PREITNER, N.; DAMIOLA, F.; LOPEZ-MOLINA, L.; ZAKANY, J.; DUBOULE, D.; ALBRECHT, U.; SCHIBLER, U. The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls

circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 251-60, Jul 26 2002.

RABINOWITZ, L. Aldosterone and potassium homeostasis. **Kidney Int**, v. 49, n. 6, p. 1738-42, Jun 1996.

RASPE, E.; DUEZ, H.; MANSEN, A.; FONTAINE, C.; FIEVET, C.; FRUCHART, J. C.; VENNSTROM, B.; STAELS, B. Identification of Rev-erb α as a physiological repressor of apoC-III gene transcription. **J Lipid Res**, v. 43, n. 12, p. 2172-9, Dec 2002.

REIMER, R. A.; DEBERT, C. T.; HOUSE, J. L.; POULIN, M. J. Dietary and metabolic differences in pre- versus postmenopausal women taking or not taking hormone replacement therapy. **Physiol Behav**, v. 84, n. 2, p. 303-12, Feb 15 2005.

RESUEHR, D.; WILDEMANN, U.; SIKES, H.; OLCESE, J. E-box regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor expression in immortalized gonadotrope cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 278, n. 1-2, p. 36-43, Nov 15 2007.

RESUEHR, H. E.; RESUEHR, D.; OLCESE, J. Induction of mPer1 expression by GnRH in pituitary gonadotrope cells involves EGR-1. **Mol Cell Endocrinol**, v. 311, n. 1-2, p. 120-5, Nov 13 2009.

RIBAS, V.; NGUYEN, M. T.; HENSTRIDGE, D. C.; NGUYEN, A. K.; BEAVEN, S. W.; WATT, M. J.; HEVENER, A. L. Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ER α -deficient mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, n. 2, p. E304-19, Feb 2010.

ROENNEBERG, T.; MERROW, M. Circadian systems and metabolism. **Journal of Biological Rhythms**, v. 14, n. 6, p. 449-459, Dec 1999.

ROYSTON, S. E.; YASUI, N.; KONDILIS, A. G.; LORD, S. V.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; MAHONEY, M. M. ESR1 and ESR2 differentially regulate daily and circadian activity rhythms in female mice. **Endocrinology**, v. 155, n. 7, p. 2613-23, Jul 2014.

SANCAR, G.; BRUNNER, M. Circadian clocks and energy metabolism. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 14, p. 2667-80, Jul 2014.

SANTOLLO, J.; KATZENELLENBOGEN, B. S.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; ECKEL, L. A. Activation of ER α is necessary for estradiol's anorexigenic effect in female rats. **Horm Behav**, v. 58, n. 5, p. 872-7, Nov 2010.

SCHIBLER, U.; GOTIC, I.; SAINI, C.; GOS, P.; CURIE, T.; EMMENEGGER, Y.; SINTUREL, F.; GOSSELIN, P.; GERBER, A.; FLEURY-OLELA, F.; RANDO, G.; DEMARQUE, M.; FRANKEN, P. Clock-Talk: Interactions between Central and Peripheral Circadian Oscillators in Mammals. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, Dec 18 2015.

SCHWARTZ, M. D.; MONG, J. A. Estradiol modulates recovery of REM sleep in a time-of-day-dependent manner. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 305, n. 3, p. R271-80, Aug 1 2013.

SELLIX, M. T.; MENAKER, M. Circadian clocks in the ovary. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 10, p. 628-36, Oct 2010.

SHEN, M.; KUMAR, S. P.; SHI, H. Estradiol regulates insulin signaling and inflammation in adipose tissue. **Horm Mol Biol Clin Investig**, v. 17, n. 2, p. 99-107, Feb 2014.

SHIBATA, S.; TOMINAGA, K. [Brain neuronal mechanisms of circadian rhythms in mammals]. **Yakugaku Zasshi**, v. 111, n. 6, p. 270-83, Jun 1991.

SHIMBA, S.; ISHII, N.; OHTA, Y.; OHNO, T.; WATABE, Y.; HAYASHI, M.; WADA, T.; AOYAGI, T.; TEZUKA, M. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 34, p. 12071-6, Aug 23 2005.

SHINOHARA, K.; UCHIYAMA, M.; OKAWA, M.; SAITO, K.; KAWAGUCHI, M.; FUNABASHI, T.; KIMURA, F. Menstrual changes in sleep, rectal temperature and melatonin rhythms in a subject with premenstrual syndrome. **Neurosci Lett**, v. 281, n. 2-3, p. 159-62, Mar 10 2000.

SIMONIAN, S. X.; HERBISON, A. E. Differential expression of estrogen receptor alpha and beta immunoreactivity by oxytocin neurons of rat paraventricular nucleus. **J Neuroendocrinol**, v. 9, n. 11, p. 803-6, Nov 1997.

SIMPSON, S. Observations on the normal temperature of the monkey and its diurnal variation, and on the effect of changes in the daily routine on this variation. **Trans. Royal Soc**, v. 45, 1906.

SOLT, L. A.; WANG, Y.; BANERJEE, S.; HUGHES, T.; KOJETIN, D. J.; LUNDASEN, T.; SHIN, Y.; LIU, J.; CAMERON, M. D.; NOEL, R.; YOO, S. H.; TAKAHASHI, J. S.; BUTLER, A. A.; KAMENECKA, T. M.; BURRIS, T. P. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. **Nature**, v. 485, n. 7396, p. 62-8, May 3 2012.

SOTONYI, P.; GAO, Q.; BECHMANN, I.; HORVATH, T. L. Estrogen promotes parvalbumin expression in arcuate nucleus POMC neurons. **Reprod Sci**, v. 17, n. 12, p. 1077-80, Dec 2010.

STUBBINS, R. E.; HOLCOMB, V. B.; HONG, J.; NUNEZ, N. P. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. **Eur J Nutr**, v. 51, n. 7, p. 861-70, Oct 2012.

SU, Y.; CAILOTTO, C.; FOPPEN, E.; JANSEN, R.; ZHANG, Z.; BUIJS, R.; FLIERS, E.; KALSBECK, A. The role of feeding rhythm, adrenal hormones and neuronal inputs in synchronizing daily clock gene rhythms in the liver. **Mol Cell Endocrinol**, v. 422, p. 125-31, Feb 15 2016.

SUKUMARAN, S.; XUE, B.; JUSKO, W. J.; DUBOIS, D. C.; ALMON, R. R. Circadian variations in gene expression in rat abdominal adipose tissue and relationship to physiology. **Physiol Genomics**, v. 42A, n. 2, p. 141-52, Oct 2010.

FRANCI, J. A. A.-F. R. E. **Controle Neuroendócrino da Reprodução Feminina**. Brasil: Guanabara Koogan S. A., 2005.

SZAWKA, R. E.; POLETINI, M. O.; LEITE, C. M.; BERNUCI, M. P.; KALIL, B.; MENDONCA, L. B.; CAROLINO, R. O.; HELENA, C. V.; BERTRAM, R.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A. Release of norepinephrine in the preoptic area activates anteroventral periventricular nucleus neurons and stimulates the surge of luteinizing hormone. **Endocrinology**, v. 154, n. 1, p. 363-74, Jan 2013.

TAKAMATA, A.; TORII, K.; MIYAKE, K.; MORIMOTO, K. Chronic oestrogen replacement in ovariectomised rats attenuates food intake and augments c-Fos expression in the suprachiasmatic nucleus specifically during the light phase. **Br J Nutr**, v. 106, n. 8, p. 1283-9, Oct 2011.

TANKO, L. B.; CHRISTIANSEN, C. Adipose tissue, insulin resistance and low-grade inflammation: implications for atherogenesis and the cardiovascular harm of estrogen plus progestogen therapy. **Climacteric**, v. 9, n. 3, p. 169-80, Jun 2006.

VAN DER SCHOUW, Y. T.; VAN DER GRAAF, Y.; STEYERBERG, E. W.; EIJKEMANS, J. C.; BANGA, J. D. Age at menopause as a risk factor for cardiovascular mortality. **Lancet**, v. 347, n. 9003, p. 714-8, Mar 16 1996.

VAN DIEPEN, H. C.; FOSTER, R. G.; MEIJER, J. H. A colourful clock. **PLoS Biol**, v. 13, n. 5, p. e1002160, May 2015.

VAN SINDEREN, M. L.; STEINBERG, G. R.; JORGENSEN, S. B.; HONEYMAN, J.; CHOW, J. D.; HERRIDGE, K. A.; WINSHIP, A. L.; DIMITRIADIS, E.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R.; BOON, W. C. Effects of Estrogens on Adipokines and Glucose Homeostasis in Female Aromatase Knockout Mice. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0136143, 2015.

VIEIRA, E.; RUANO, E.; FIGUEROA, A. L.; ARANDA, G.; MOMBLAN, D.; CARMONA, F.; GOMIS, R.; VIDAL, J.; HANZU, F. A. Altered clock gene expression in obese visceral adipose tissue is associated with metabolic syndrome. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e111678, 2014.

VIGO, E.; ROA, J.; LOPEZ, M.; CASTELLANO, J. M.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, R.; NAVARRO, V. M.; PINEDA, R.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. Neuromedin s as novel putative regulator of luteinizing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 813-23, Feb 2007.

WHITE, B. A. In: KOEPPEN, B. M. (Ed.). **Berne e Levy Fisiologia**. 6. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. cap. Hipotálamo e Hipófise, p.19.

WHO. **Research on the menopause in the 1990s : report of a WHO scientific group** World Health Organization: 107 p. 1996.

WIEGAND, S. J.; TERASAWA, E.; BRIDSON, W. E.; GOY, R. W. Effects of discrete lesions of preoptic and suprachiasmatic structures in the female rat. Alterations in the feedback regulation of gonadotropin secretion. **Neuroendocrinology**, v. 31, n. 2, p. 147-57, Aug 1980.

WILLIAMS, W. P., 3RD; KRIEGSFELD, L. J. Circadian control of neuroendocrine circuits regulating female reproductive function. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 3, p. 60, 2012.

WOLLNIK, F. Physiology and regulation of biological rhythms in laboratory animals: an overview. **Lab Anim**, v. 23, n. 2, p. 107-25, Apr 1989.

WOLLNIK, F.; TUREK, F. W. Estrous correlated modulations of circadian and ultradian wheel-running activity rhythms in LEW/Ztm rats. **Physiol Behav**, v. 43, n. 3, p. 389-96, 1988.

XU, Y.; NEDUNGADI, T. P.; ZHU, L.; SOBHANI, N.; IRANI, B. G.; DAVIS, K. E.; ZHANG, X.; ZOU, F.; GENT, L. M.; HAHNER, L. D.; KHAN, S. A.; ELIAS, C. F.; ELMQUIST, J. K.; CLEGG, D. J. Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. **Cell Metab**, v. 14, n. 4, p. 453-65, Oct 5 2011.

YAMAZAKI, S.; NUMANO, R.; ABE, M.; HIDA, A.; TAKAHASHI, R.; UEDA, M.; BLOCK, G. D.; SAKAKI, Y.; MENAKER, M.; TEI, H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. **Science**, v. 288, n. 5466, p. 682-5, Apr 28 2000.

YOO, S. H.; YAMAZAKI, S.; LOWREY, P. L.; SHIMOMURA, K.; KO, C. H.; BUHR, E. D.; SIEPKA, S. M.; HONG, H. K.; OH, W. J.; YOO, O. J.; MENAKER, M.; TAKAHASHI, J. S. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 15, p. 5339-46, Apr 13 2004.

YOON, M. PPARalpha in Obesity: Sex Difference and Estrogen Involvement. **PPAR Res**, v. 2010, 2010.

ZANQUETTA, M. M.; CORREA-GIANNELLA, M. L.; MONTEIRO, M. B.; VILLARES, S. M. Body weight, metabolism and clock genes. **Diabetol Metab Syndr**, v. 2, p. 53, 2010.

ZHANG, R.; LAHENS, N. F.; BALLANCE, H. I.; HUGHES, M. E.; HOGENESCH, J. B. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 45, p. 16219-24, Nov 11 2014.

ZHU, L.; ZOU, F.; YANG, Y.; XU, P.; SAITO, K.; OTHRELL HINTON, A., JR.; YAN, X.; DING, H.; WU, Q.; FUKUDA, M.; SUN, Z.; TONG, Q.; XU, Y. Estrogens prevent metabolic dysfunctions induced by circadian disruptions in female mice. **Endocrinology**, v. 156, n. 6, p. 2114-23, Jun 2015.

9. ANEXOS

Tabela 2. Valores da média de T interna dos animais do grupo intactas e do grupo ovx nos horários que ocorreram diferenças significativas pelo *two-way* Anova, seguido de *Tukey*

Horário	T Interna Intactas	T Interna OVX	P
27	37,93	36,93	<0,05
28	37,79	37,24	<0,05
29	37,98	37,01	<0,05
30	37,64	37,14	<0,05
31	37,90	37,12	<0,05
32	37,79	37,49	<0,05
33	37,61	37,05	<0,05
34	37,59	37,61	<0,05
35	37,64	37,60	<0,05
45	37,97	38,5	<0,05
46	37,85	38,38	<0,05
50	37,52	37,56	<0,05
51	37,54	37,23	<0,05
52	37,60	37,58	<0,05
53	37,83	38,28	<0,05
54	37,78	37,62	<0,05
55	37,65	37,18	<0,05
56	37,34	37,04	<0,05

Tabela 3. Valores da média de T interna dos animais do grupo Óleo- Injeção e do grupo E2-Injeção nos horários que ocorreram diferenças significativas pelo *two-way* Anova, seguido de *Tukey*

Horário	T Interna Intactas	T Interna OVX	P
27	37,93	36,93	<0,05
28	37,79	37,24	<0,05
29	37,98	37,01	<0,05
30	37,64	37,14	<0,05
31	37,90	37,12	<0,05
32	37,79	37,49	<0,05
33	37,61	37,05	<0,05
34	37,59	37,61	<0,05
35	37,64	37,60	<0,05
45	37,97	38,5	<0,05
46	37,85	38,38	<0,05
50	37,52	37,56	<0,05
51	37,54	37,23	<0,05
52	37,60	37,58	<0,05
53	37,83	38,28	<0,05
54	37,78	37,62	<0,05
55	37,65	37,18	<0,05
56	37,34	37,04	<0,05