

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia

Thais Santana Rocha Cardoso

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS HORMÔNIOS OVARIANOS E DA  
ALIMENTAÇÃO RESTRITA À FASE DE LUZ SOBRE O RELÓGIO  
HEPÁTICO E PARÂMETROS METABÓLICOS DE RATAS**

Belo Horizonte

2020

Thais Santana Rocha Cardoso

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS HORMÔNIOS OVARIANOS E DA  
ALIMENTAÇÃO RESTRITA À FASE DE LUZ SOBRE O RELÓGIO  
HEPÁTICO E PARÂMETROS METABÓLICOS DE RATAS**

Versão Final

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

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Dra. Maristela de Oliveira Poletini

Belo Horizonte

2020

043

Cardoso, Thais Santana Rocha.

Avaliação dos efeitos dos hormônios ovarianos e da alimentação restrita à fase de luz sobre o relógio hepático e parâmetros metabólicos de ratas [manuscrito] / Thais Santana Rocha Cardoso. – 2020.

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

Orientadora: Maristela de Oliveira Poletini.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fígado. 2. Ovários – Fisiologia – Teses. 3. Alimentação com Horário Restrito. 4. Ritmo Circadiano. I. Poletini, Maristela de Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

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

**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 318 DE THAIS SANTANA ROCHA CARDOSO**

Às 09:00 horas do dia 04 do mês de junho de 2020, através da ConferênciaWeb da Rede Nacional de Pesquisa, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Thais Santana Rocha Cardoso**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa**, UEL, **Profa. Dra. Jaqueline Alvarez Leite**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. André Gustavo de Oliveira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Bruna Kalil Cutti**, UNIFAL-MG, e **Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS HORMÔNIOS OVARIANOS E DA ALIMENTAÇÃO RESTRITA À FASE DE LUZ SOBRE O RELÓGIO HEPÁTICO E PARÂMETROS METABÓLICOS DE RATAS**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 04 de junho de 2020.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:

*Maristela de Oliveira Poletini*

*Ernane Torres Uchôa*

*Bruna Kalil Cutti*

*André Gustavo de Oliveira*

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

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus por me abençoar durante essa etapa e me conceder tamanha oportunidade.

Aos meus pais, Lecy e Sérgio, por investirem tanto em mim e por me apoiarem em todos os momentos da minha vida. Me sinto uma pessoa de sorte por ter tanto amor e cuidado das pessoas mais importantes da minha vida.

Agradeço ao Guilherme, meu irmão tão amado e querido, que me ouve, incentiva e me inspira na tentativa de ser melhor a cada dia.

À Maristela que no decorrer desses anos além de ter sido minha orientadora, se tornou uma referência de força e admiração. Sou grata por ter sido acolhida no seu universo de pesquisa onde aprendi que a ciência é feita com muito esforço, mas também com amor e leveza. Obrigada pela oportunidade e por acreditar em mim e no meu trabalho.

Às amigas Nayara e Paola que participaram ativamente desse trabalho contribuindo substancialmente nos experimentos, inclusive em várias madrugadas. Vocês foram as melhores companheiras nesse desafio e fundamentais para a conclusão desse trabalho.

À Flávia, nossa rainha das cirurgias de ovariectomia que me ajudou e compartilhou inúmeros momentos nessa jornada.

Ao Fernando Pedro, meu amigo querido, que participou de seminários, opinou na estética dos gráficos, discutiu comigo resultados e me contagiou com sua alegria que parece ser inesgotável.

Agradeço à amiga Luciana, uma pesquisadora incrível com quem compartilhei ideias, lanches e a vida.

Aos alunos de iniciação científica Tito, Mariana, Ingrid, Diego, Vitória e Thaís que se prontificaram a cuidar da ração dos animais em horários inadequados e em alguns finais de semana.

Agradeço aos professores do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo Adelina dos Reis, Cândido Coimbra, Glauber da Silva, Raphael Szawka e Paula Bargi pelas discussões e ensinamentos.

Aos colegas de laboratório Ana Clara, Ayla, Bruna, Daniela, Helton, Gleisy, Kaoma, Lucas, Nayara Aquino, Patricia, Thatiane e Quézia por todos os momentos compartilhados.

À Simone Pio, técnica do laboratório por todo o auxílio nos processos e pela organização extrema.

Agradeço aos bioteristas Cássio e Samir e aos demais funcionários cujo trabalho foi indispensável para que eu realizasse meus experimentos.

Aos companheiros Cristiane, Heric, Filipe e Sthéfanie por termos compartilhado gargalhadas nessa reta final.

À secretaria do programa de pós-graduação.

Às agências de fomento CAPES e FAPEMIG que financiaram esse projeto e a bolsa de estudo que me permitiu concluir mais uma etapa da minha formação profissional e acadêmica.

Meus sinceros agradecimentos a todos que participaram de alguma forma. É com orgulho e alegria que finalizo mais essa etapa

## LISTA DE ABREVIATURAS

AD- *Ad libitum*

AgRP- peptídeo relacionado ao *agouti*

AUC -Área sob a curva

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

CART - transcrito regulado por anfetamina e cocaína

CCG- genes controlados pelo relógio

cDNA- DNA complementar

Clk $\epsilon$  i- Caseína quinase I $\epsilon$

Clock- *Circadian locomotor Output Cycles Kaput*

Cry- *Cryptochrome*

CT- Ciclo de temperatura

ER- receptor de estrógeno

H<sub>2</sub>O DEPC- Água tratada com dietil-pirocarbonato

i.m. Intramuscular

i.p: Intraperitoneal

ipTTG- Teste de tolerância intraperitoneal à glicose

mRNA- RNA mensageiro

NAD- Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NPY- neuropeptídeo Y

NSQ- Núcleo supraquiasmático

OVX- ratas ovariectomizadas

Per- *Period*

PCR- Reação de cadeia polimerase

PGC-1 $\alpha$ - coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

POMC- pró-opiomelanocortina

PPAR $\alpha$ - receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa

qPCR- PCR quantitativo em tempo real

RervErba- *Reverse-erythroblastosis virus alpha*

ROR $\alpha$ - *Retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha*



SIRT-1- deacetilase sirtuina 1

s.c- Subcutâneo

TR- Tempo restrito

*TRB-3- Pseudoquinase tribbles 3*

ZT- *Zeitgeber time*

$\alpha$ -MSH - hormônio alfa estimulador de melanócito

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático dos protocolos alimentares de dieta <i>ad libtum</i> ou em tempo restrito à fase de luz (TR).....	32
Figura 2. Linha do tempo dos experimentos realizados durante o protocolo de dieta em tempo restrito à fase de luz (TR)..	34
Figura 3. Desenho esquemático do tratamento hormonal e do protocolo alimentar das ratas. ....	34
Figura 4. Linha do tempo do experimento realizado durante o protocolo de OVX seguido de tratamento de reposição de estradiol.....	35
Figura 5. Ganho de peso corporal de ratas SHAM e OVX em regime alimentar <i>ad libtum</i> (AD) e restrita à fase de luz (TR).....	43
Figura 6. Variação de ganho de peso corporal e ingestão alimentar de ratas SHAM e OVX em regime alimentar <i>ad libtum</i> (AD) e restrito à fase de luz (TR).....	44
Figura 7. Expressão de <i>Per1</i> no fígado de ratas SHAM e OVX em regime alimentar <i>ad libtum</i> (AD) ou restrito à fase de luz (TR). ....	47
Figura 8. Expressão de <i>Bmal1</i> no fígado de ratas SHAM e OVX em regime alimentar <i>ad libtum</i> (AD) ou restrito à fase de luz (TR). ....	48
Figura 9. Expressão de <i>Reverb-<math>\alpha</math></i> no fígado de ratas SHAM e OVX em regime alimentar <i>ad libtum</i> (AD) ou restrito à fase de luz (TR). ....	49
Figura 10 . Expressão de <i>Cry1</i> no fígado de ratas SHAM e OVX em regime alimentar <i>ad libtum</i> (AD) ou restrito à fase de luz (TR)..	50
Figura 11. Expressão de <i>Cry2</i> no fígado de ratas SHAM e OVX em regime alimentar <i>ad libtum</i> (AD) ou restrito à fase de luz (TR).....	51
Figura 12. Concentrações plasmáticas de leptina de ratas SHAM e OVX em regime alimentar <i>ad libtum</i> (AD) e restrito à fase de luz (TR) .....	53
Figura 13. Expressão hepática de genes metabólicos de ratas SHAM e OVX em regime alimentar <i>ad libtum</i> (AD) ou restrito à fase de luz (TR). ....	54
Figura 14. Teste de tolerância à glicose em ratas NAIVE e ovariectomizadas (OVX) em regime alimentar <i>ad libtum</i> (AD) realizado às 08:00 (ZT1) e às 20:00 (ZT13) .....	56
Figura 15. Teste de tolerância à glicose em ratas NAIVE e ovariectomizadas (OVX) em regime alimentar <i>ad libtum</i> (AD) realizado às 8:00 (ZT1) e às 20:00 (ZT13). ....	57
Figura 16. Teste de tolerância à glicose em ratas ovariectomizadas (OVX) em regime alimentar <i>ad libtum</i> (AD) e restrito à fase de luz (TR) realizado às 8:00 (ZT1). ....	57
Figura 17. Expressão de genes de relógio em ratas SHAM e ovariectomizadas (OVX) tratadas com óleo e estradiol..	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados nas reações de PCR em tempo real .....	40
Tabela 2. Análise de Fourier dos genes de relógio. ....	85

## SUMÁRIO

1.	JUSTIFICATIVA.....	19
2.	INTRODUÇÃO.....	20
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
3.1	Sistema Circadiano .....	23
3.2	Relógio Biológico e Metabolismo .....	26
3.3	Papel dos hormônios ovarianos no metabolismo .....	27
3.4	Papel dos hormônios ovarianos no relógio biológico .....	28
4.	OBJETIVOS.....	30
4.1	OBJETIVO GERAL.....	30
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
5.	METODOLOGIA .....	31
5.1	ANIMAIS.....	31
5.2	DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS.....	31
5.2.1	Delineamento Experimental 1.....	31
5.2.2	Delineamento Experimental 2.....	33
5.3	OVARIECTOMIA.....	35
5.4	DOSAGEM DE LEPTINA .....	36
5.5	Teste de tolerância à glicose.....	36
5.6	Extração de RNA, Reação de Transcriptase e PCR quantitativo em Tempo-Real (qPCR) .....	37
5.6.1	Extração de RNA.....	37
5.6.2	Transcrição reversa.....	38
5.6.3	qQRT-PCR .....	38
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
7.	RESULTADOS.....	42
8.	DISCUSSÃO.....	60

9.	CONCLUSÃO .....	72
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73
11.	ANEXOS.....	85

## RESUMO

O horário da alimentação provou ser um aliado no controle do ganho de peso corporal e na regulação do metabolismo da glicose. Um dos efeitos diretos da oferta de alimento exclusivamente durante a fase de inatividade de roedores, ou seja, a fase de luz, é a alteração do padrão temporal da expressão dos genes de relógio no fígado. O relógio hepático, por sua vez, regula diretamente a homeostase da glicose, contribuindo para manter a glicemia no jejum. O estradiol é um regulador da ingestão alimentar e da resistência à insulina. Dessa forma, o presente trabalho investigou o papel dos hormônios ovarianos na resposta do relógio hepático à alimentação restrita à fase de luz, assim como sobre a tolerância à glicose. Para isso, ratas Wistar foram submetidas a cirurgia fictícia de remoção dos ovários (Grupo: SHAM) ou foram ovariectomizadas (Grupo: OVX). Ambos os grupos tiveram acesso à dieta padrão em regime *ad libitum* (AD) ou restrita às 12 h da fase de luz (Time Restricted, TR) por vinte e um dias. Foram aferidos o peso corporal e a ingestão alimentar e, ao final do protocolo, os animais foram eutanasiados no *Zeitgeber Time 1* (ZT1, uma hora após as luzes se acenderam no biotério), no ZT6, ZT12 e ZT18 para coleta do fígado e do sangue. Em todos os ZTs, foram analisados a expressão dos seguintes genes de relógio: *Per1*, *Bmal1*, *Reverb- $\alpha$* , *Cry1* e *Cry2*, por qRT-PCR. Um maior ganho de peso corporal foi observado nas ratas OVX. A alimentação TR reduziu o ganho de peso corporal tanto de ratas SHAM quanto OVX. A ingestão alimentar foi maior nas ratas OVX, por outro lado, a falta dos hormônios ovarianos não alterou o padrão circadiano de ingestão alimentar, assim tanto ratas SHAM quanto OVX apresentaram maior consumo durante a noite. A alimentação TR promoveu uma redução na ingestão alimentar das ratas SHAM e OVX. Este efeito da alimentação TR sobre o ganho de peso corporal e ingestão alimentar foi acompanhado de alterações na expressão temporal dos genes de relógio de forma similar nas ratas SHAM e OVX. Dessa forma, os hormônios ovarianos não interferiram na resposta do relógio hepático à alimentação TR. Por outro lado, ratas OVX apresentaram valores aumentados de mRNA dos genes *Per1*, *Bmal1*, *Cry1* e *Cry2* quando comparados às SHAM no ZT1. Dessa forma, avaliamos se o estradiol contribui para a manutenção dos valores de mRNA dos genes de relógio neste horário. Para isso, um outro grupo de ratas OVX foi tratado com óleo de milho (0,2 mL) ou cipionato de estradiol (10  $\mu$ g / 0,2 mL) por

três manhãs consecutivas e as ratas foram eutanasiadas no ZT1 do dia subsequente ao término do tratamento. O tratamento de reposição com estradiol foi capaz de reverter o aumento induzido pela ovariectomia dos valores de mRNA dos genes *Per1*, *Bmal1*, *Cry1* e *Cry2* sem alterar os valores de mRNA do gene *Reverb- $\alpha$* . Analisamos se a ovariectomia e/ou a alimentação TR altera o padrão temporal de secreção de leptina, uma vez que ambos fatores afetaram a ingestão alimentar. A leptina sérica foi determinada por ELISA nos ZT1 e ZT12. As concentrações séricas de leptina foram menores no ZT12 nas ratas SHAM-AD, entretanto, não variaram entre os ZTs nas ratas SHAM-TR, OVX-AD e OVX-TR. Dessa forma, tanto a ovariectomia quanto a alimentação TR aboliram as variações temporais das concentrações séricas de leptina, o que pode justificar seus efeitos sobre a ingestão alimentar. No ZT1 e ZT12, também foram analisados a expressão dos genes *PPar- $\alpha$*  e *TRB-3* envolvidos, respectivamente, com metabolismo de lipídeo e de glicose. No entanto, a expressão temporal destes genes não foi afetada nem pela ovariectomia nem tão pouco pela alimentação TR. Foram realizados testes intraperitoneais de tolerância à glicose (ipTTG) nos ZT1 e ZT13 de animais dos grupos NAIVE (antes da OVX) e OVX. Ratas NAIVE apresentaram uma melhor resposta ao ipTTG no ZT13, com menores valores da área sob a curva glicêmica. Esta diferença da resposta ao ipTTG entre os ZT1 e ZT13 não foi observada nas ratas OVX. Além da ovariectomia abolir as variações temporais observadas no ipTTG, em comparação ao grupo NAIVE, no ZT13, o grupo OVX apresentou uma pior resposta ao teste. A alimentação TR reduziu a tolerância à glicose de ratas OVX. Assim, concluímos que os hormônios ovarianos contribuem para a manutenção dos valores de mRNA dos genes de relógio do fígado de forma horário do dia específico, sem alterar, contudo, a resposta do relógio hepático ao horário da alimentação. O estradiol parece ser o responsável por esta manutenção. Os hormônios ovarianos também são importantes para a homeostase da glicose, uma vez que a ovariectomia aboliu a variação temporal da resposta ao ipTTG e ocasionou uma pior resposta ao mesmo em relação ao grupo NAIVE no ZT13. Além disso, a falta dos hormônios ovarianos somado à alimentação TR levou a uma menor tolerância à glicose. Estes resultados, em conjunto, contribuem para o entendimento das alterações metabólicas geradas pela diminuição ou ausência dos hormônios ovarianos, como por exemplo, um maior ganho de peso

corporal e um comprometimento do metabolismo da glicose observados durante a menopausa.



## ABSTRACT

It has been demonstrated that the time of food intake contributes to control body weight gain and glucose metabolism. One of the direct effects of food offering throughout inactive phase of rodents, that is, the light phase, is alteration in the temporal pattern of the liver's clock genes. On the other hand, the hepatic clock directly regulates glucose homeostasis, which contributes to the maintenance of glucose levels during fasting. Moreover, estradiol regulates food intake and insulin resistance. Thus, the present study investigated the role of ovarian hormones in the response of the hepatic clock to time restricted (TR) feeding during the light phase, as well as in the tolerance to glucose. To that end, Wistar rats went through SHAM or ovariectomy surgery (OVX). Both groups were submitted to standard chow *ad libitum* (AD), or TR of 12 hours in the light phase for twenty-one days. Food intake and body weight were measured, and at the end of the protocol, animals were euthanized at *Zeitgeber* Time 1 (ZT1, one hour after the lights went on in the vivarium), at ZT6, ZT12 and ZT18 for collecting liver and blood. The expression of the clock genes *Per1*, *Bmal1*, *Reverba*, *Cry1* and *Cry2* was performed at the four ZTs by qRT-PCR. OVX rats gained more weight than did the SHAM rats and TR feeding reduced the body weight gain of both groups. Food intake in OVX rats was higher and the lack of ovarian hormones did not change the circadian pattern of food intake. Thus, both SHAM and OVX rats under TR feeding showed reduced food intake during the dark phase. TR feeding also reduced the food intake of both groups over the 24 hours. These effects of TR feeding on body weight gain and food intake were accompanied by similar temporal changes in hepatic clock genes expression in SHAM and OVX rats. Therefore, ovarian hormones did not interfere in the response of the hepatic clock to TR feeding. On the other hand, OVX rats presented higher levels of *Per1*, *Bmal1*, *Cry1* e *Cry2* mRNA expression compared to SHAM at ZT1. Hence, we evaluated whether estradiol contributes to the maintenance in the clock genes expression. For this purpose, another group of OVX rats was subcutaneously treated with corn oil (0,2 mL) or cypionate of estradiol (10 µg / 0,2 mL) for three consecutive days and was then euthanized at ZT1 in the next day. The treatment with estradiol reversed the OVX-induced increasing in *Per1*, *Bmal1*, *Cry1* e *Cry2* but it did not alter the mRNA levels of *Reverb-α* gene. We also evaluated whether ovariectomy or TR feeding alter the temporal pattern of leptin secretion once they

affected food intake. Serum leptin was determined by Elisa at ZT1 and ZT12. Leptin levels were lower at ZT12 in SHAM-AD rats however it did not change between ZT1 and ZT12 of SHAM-TR, OVX-AD and OVX-TR rats. Thus, both OVX and TR feeding abolished the temporal variation in leptin levels, what may explain their effects in the food intake. The expression of *PPar- $\alpha$*  e *TRB-3* genes, involved in lipid and glucose metabolism, respectively, was analyzed at ZT1 and ZT12. Neither OVX or TR feeding were capable of affecting the temporal pattern of these clock gene expression in the liver. Intraperitoneal glucose tolerance tests (IPGTT) were performed at ZT1 and ZT13 in NAÏVE (before OVX) and OVX rats. NAÏVE rats presented a better response at ZT13 compared to ZT1 as demonstrated by lower levels of glucose in the area under the curve. Different response over the time was not observed in OVX rats. Beyond abolishing temporal difference in the response to the IPTTG, compared to NAÏVE, OVX rats presented a worse response at ZT13. TR feeding reduced the glucose tolerance of OVX rats. So, we concluded that ovarian hormones contribute to the maintenance of clock genes mRNA levels in liver in a time specific way, without changing, however, the response of the clock liver to TR feeding. Estradiol seems to be the responsible for this maintenance. Ovarian hormones are also important to the glucose homeostasis as ovariectomy abolished the temporal response to ipTTG and it caused a worse response in IPTTG compared to NAÏVE at ZT13. Besides, the lack of ovarian hormones together with TR feeding resulted in a lower glucose tolerance. These results may contribute to the understanding of metabolic alterations caused by the decrease or absence of ovarian hormones like the increase in body weight gain and the impairment in the glucose metabolism commonly observed during menopause.

## 1. JUSTIFICATIVA

O horário da alimentação tem sido descrito como um importante fator de saúde. Estudos com humanos apontam que indivíduos que ingerem maiores quantidades de calorias no início do dia apresentam melhores respostas metabólicas do que aqueles que concentram a ingestão de calorias em períodos mais tardios (Jakubowicz et al., 2013). Há evidências de que as respostas metabólicas ao horário da alimentação sejam mediadas pelo relógio biológico (Zarrinpar et al., 2016). Estudos com roedores apontam efeitos deletérios ao metabolismo tais como resistência à insulina, obesidade e aumento do processo inflamatório quando os animais são forçados a se alimentarem durante a fase luz, ou seja, fase de inatividade dos mesmos. Esses sintomas são acompanhados de um arraste na expressão dos genes de relógio hepático em relação aos animais que podem se alimentar livremente durante as vinte e quatro horas do dia (Mukherji et al., 2015). Por outro lado, quando roedores são submetidos à dieta rica em gordura apenas no decorrer da fase de escuridão, os impactos sobre o ganho de peso, metabolismo de carboidratos e lipídeos são significativamente atenuados (Hatori et al., 2012). Os estudos disponíveis nessa área, no entanto, se limitam a avaliar os impactos da alimentação em tempo restrito em roedores machos. Contudo os esteroides ovarianos, em especial o estradiol, sabidamente participam do controle da ingestão alimentar e do metabolismo energético haja visto que mulheres na menopausa e ratas ovariectomizadas apresentam ganho de peso que é revertido após tratamento de reposição com estradiol (Butera, 2010; López & Tena-Sempere, 2015). Com o aumento da expectativa de vida observado nos últimos anos na população brasileira, as mulheres estão vivenciando, por períodos mais longos, os sintomas decorrentes da menopausa. Derivou disso, nosso interesse em estudar se a alimentação em horário restrito se configura como uma ferramenta de sincronização do relógio biológico do fígado de fêmeas com implicações no ganho de peso e no metabolismo energético.

## 2. INTRODUÇÃO

Os impactos do horário da alimentação sobre o ganho de peso e metabolismo energético tem sido amplamente investigados. Os estudos indicam que além da composição nutricional da dieta, também o horário na qual ela é consumida pode influenciar as respostas metabólicas. Um exemplo claro dessa relação é que trabalhadores em turnos noturnos apresentam, independentemente da ingestão calórica, tendência para desenvolvimento de obesidade (Lowden et al., 2010; Sun et al., 2018). De maneira oposta, indivíduos em protocolo de restrição calórica que consomem a maior parte de suas calorias nas primeiras horas do dia, apresentam maior perda de peso e de circunferência de cintura, bem como melhores índices de glicemia, insulina e triglicérides do que aqueles que consomem mais calorias próximo do anoitecer (Garaulet et al., 2013; Jakubowicz et al., 2013). Restringir a alimentação às primeiras horas do dia também é capaz de promover melhora na sensibilidade à insulina e no controle da pressão arterial em indivíduos pré-diabéticos ainda que não seja observada perda de peso (Sutton et al., 2018). As respostas metabólicas obtidas nos estudos com esse tipo de protocolo alimentar podem estar relacionadas, em partes, com o relógio biológico uma vez que são observadas diferenças na expressão de genes de relógio no sangue de indivíduos com alimentação restrita às 8 primeiras horas do dia em comparação àqueles com jejum restrito apenas ao período noturno (Jamshed et al., 2019).

Essa mesma relação entre horário da alimentação e respostas metabólicas é observada em modelos animais. Em um trabalho muito elegante, foi demonstrado que camundongos machos submetidos à uma dieta *ad libitum* rica em gordura ganharam mais peso e apresentaram alterações no metabolismo glicídico e lipídico de maneira mais severa que aqueles que se alimentaram exclusivamente durante a fase de escuridão, que é a fase de atividade dos mesmos. Esse quadro foi acompanhado de alterações na expressão de genes de relógio (Hatori et al., 2012). Em contrapartida, outros inúmeros estudos apontam efeitos deletérios da alimentação durante a fase de luz ou inatividade em ratos e camundongos, com alterações na secreção de leptina, insulina, consumo de oxigênio e expressão de genes de relógio em tecidos periféricos (Opperhuizen et al., 2016; Reznick et al., 2013),

Camundongos expostos, a cada cinco dias, à dieta rica em gordura durante a fase de luz apresentam alterações no comportamento circadiano bem como na expressão dos genes de relógio no baço, concomitantemente com aumento do processo inflamatório no tecido adiposo, aumento de ganho de peso, resistência à insulina e intolerância à glicose sem alteração da ingestão alimentar (Kim et al., 2018). Quando comparados com camundongos alimentados exclusivamente durante a fase de escuridão, animais com acesso à dieta apenas na fase de luz apresentam maior ingestão calórica diária, maior ganho de peso, alteração de amplitude e fase na expressão de genes de relógio em tecidos metabólicos e perda da oscilação circadiana de cortisol (Bray et al., 2013)

Foi demonstrado que o relógio hepático de camundongos machos e fêmeas responde de maneira diferente à exposição à dieta rica em gordura. Em machos, ela é capaz de promover uma mudança de fase na expressão hepática do gene *Per2*, o que não ocorre nas fêmeas. Do mesmo modo, a dieta rica em gordura promove uma redução da amplitude de atividade locomotora de machos, efeito não observado em fêmeas. Quando os animais são submetidos à cirurgia de ovariectomia, no entanto, a dieta rica em gordura altera a fase de expressão hepática de *Per2*, assim como a amplitude de atividade locomotora uma vez que os animais passam a realizar maior número de refeições ao longo da fase clara. Nesse estudo concluíram, portanto, que os hormônios ovarianos protegem as fêmeas dos efeitos da dieta rica em gordura sobre os ritmos diários de expressão gênica hepática e de comportamento alimentar (Palmisano et al., 2017).

Os dados disponíveis até então apontam que em um modelo de obesidade pós menopausa no qual camundongos fêmeas ovariectomizadas receberam dieta rica em gordura, disponibilizar a dieta por apenas oito horas durante a fase de escuridão promoveu perda de peso, melhora na resistência à insulina, redução da esteatose hepática, redução de gliconeogênese e aumento da cetogênese e incremento no grau de atividade física (Chung et al., 2016).

O efeito protetor do estradiol em camundongos foi demonstrado também em um estudo que utilizou um protocolo de *jet lag* que, sabidamente, ocasiona uma dessincronização de relógios periféricos. Nesse protocolo, o ciclo de luz se alterna entre 10 h de luz e 10 horas de escuridão com ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Fêmeas ovariectomizadas expostas a esse desafio fótico apresentaram acúmulo de gordura visceral, resistência à insulina e

alteração no perfil de expressão gênica no tecido adiposo branco visceral. Os animais ovariectomizados e tratados com estradiol tiveram estes efeitos revertidos (Zhu et al., 2015).

Uma vez que os hormônios ovarianos possuem a característica de proteger contra disfunções do metabolismo energético e contra o surgimento de doenças cardiovasculares, por exemplo, e sabendo que o estradiol participa ativamente do controle da ingestão alimentar, estudamos se esses hormônios teriam alguma influência na resposta do relógio biológico hepático à um protocolo de alimentação em tempo restrito.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 SISTEMA CIRCADIANO

Os organismos vivos, desde os unicelulares aos mais complexos como os mamíferos, desenvolveram, ao longo do tempo, mecanismos para se organizarem temporalmente afim de melhor se adaptarem ao ambiente em que vivem, propiciando maiores chances de sobrevivência (Albers et al., 1981; Roenneberg & Merrow, 2002; Sancar & Brunner, 2014). Esta organização temporal traduz-se em ritmos endógenos que conferem aos organismos capacidade de se anteciparem aos eventos externos como alterações de temperatura e luminosidade, o que pode ser exemplificado pelo fato de que nas plantas ocorre uma indução na expressão de genes fotossintéticos algumas horas antes do nascer do sol para otimizar o processo de fotossíntese. Em humanos, oscilações diárias como as de temperatura interna, frequência cardíaca e secreção hormonal também são ritmos circadianos (Portaluppi et al., 1996; Rabinowitz, 1996; Roenneberg & Merrow, 2002).

Ritmos circadianos acontecem em decorrência do funcionamento dos relógios biológicos em virtualmente todas as células do organismo. Estes relógios consistem de um conjunto de proteínas que se autorregulam por meio de alças de retroalimentação, uma positiva atuante durante a noite subjetiva e, uma negativa, atuante durante o dia subjetivo. A alça positiva é constituída pelas proteínas CLOCK (*circadian locomotor output cycles kaput*) e BMAL1 (*brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like 1*). Esses fatores de transcrição formam um heterodímero que se liga nos elementos promotores E-box para ativar os genes *periods* (Per1-3) e *cryptochrome* (Cry1/2) da alça negativa, bem como inúmeros outros genes controlados pelo relógio (CCG). Durante a noite, as proteínas PER e CRY se acumulam no citoplasma e translocam para o núcleo onde inibem a atividade do heterodímero CLOCK:BMAL1, e, conseqüentemente, sua própria transcrição. À medida que PER e CRY são degradados e a manhã se aproxima, a inibição sobre CLOCK:BMAL1 cessa e um novo ciclo se inicia. Uma alça assessória complementar composta pelos receptores nucleares REV-ERB $\alpha$ /s and ROR $\alpha$ /s auxilia o processo regulatório inibindo e estimulando, respectivamente a

transcrição de *Bmal1* (Ko & Takahashi, 2006; Schibler et al., 2003; R. Zhang et al., 2014).

Uma importante propriedade dos relógios biológicos consiste no fato de que as oscilações circadianas são auto sustentadas, ou seja, quando em condições constantes, persistem por aproximadamente 24 horas. Além disso, eles podem ser sincronizados por pistas ambientais rítmicas tais como luz, temperatura e disponibilidade de alimentos (Sancar & Brunner, 2014). As diferentes pistas ambientais são denominadas *zeitgebers* (ZT), uma palavra do idioma alemão que significa doadores de tempo (Aschoff & Pohl, 1978) e na ausência das mesmas, em especial em escuro constante, o relógio biológico assume seu período próprio que pode não ser de exatamente 24 horas. A essa condição dá-se o nome de livre curso ou *free-running* (Pittendrigh, 1993).

Em mamíferos os relógios biológicos organizam-se de maneira hierárquica em um relógio central, localizado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo (NSQ) e em relógios periféricos, presentes nos demais órgãos tais como pulmão, útero, rins, fígado e baço. O relógio central é o responsável por transmitir informações sobre as condições do meio externo aos relógios periféricos e, desse modo, manter todo o organismo sincronizado. Essa comunicação acontece por vias humorais e hormonais. A principal pista temporal externa para a sincronização do relógio central é a luz. Os sinais da luminosidade são conduzidos diretamente da retina para o NSQ através do trato retino-hipotalâmico. O NSQ de ratos é dividido em duas porções, a ventrolateral e a dorsomedial, sendo que neurônios dessa região estão envolvidos com a sincronização do relógio, possivelmente por serem os responsáveis por receberem as informações fóticas. Já neurônios da região ventral são responsáveis por gerar o sinal de saída do NSQ e, possivelmente, iniciar os ritmos circadianos (Hamada et al., 2001). Uma importante diferença entre o relógio central e os relógios periféricos é que, o central quando em cultura, é capaz de manter sua ritmicidade enquanto que os relógios periféricos a perdem em poucos dias (Yamazaki et al., 2000). Esta diferença enfatiza a existência de uma hierarquia na qual os relógios periféricos necessitam de um sinal do relógio central para manter sua ritmicidade (Yamazaki et al., 2000).

Além dos ciclos de luminosidade e escuridão impostos pelo movimento de rotação da Terra em torno do seu próprio eixo, pistas endógenas também são



capazes de auxiliar na sincronização dos relógios periféricos como o hormônio cortisol (Balsalobre et al., 2000; Terazono et al., 2003). Em situações normais, a secreção de cortisol está aumentada no início da fase de atividade como uma maneira de preparar os processos fisiológicos e comportamentais do organismo para o período que se sucede (Moore & Eichler, 1972).

Por outro lado, vários hormônios, tais como leptina, insulina, glucagon e o próprio cortisol apresentam um padrão rítmico de secreção (Buijs & Kalsbeek, 2001). Lesões no NSQ eliminam o ritmo de secreção de leptina, e, cultura de adipócitos apresentam valores rítmicos de RNA mensageiro para leptina, o que sugere um controle circadiano de secreção por relógios periféricos (Kalsbeek et al., 2001; Schibler et al., 2003). Além da regulação circadiana, o volume de tecido adiposo, o estado alimentado ou de jejum são fatores que sabidamente influenciam os valores circulantes de leptina no decorrer do ciclo de luz e escuridão. Situações de jejum prolongado abolem o ritmo de secreção de leptina, ao contrário de condições de alimentação contínua onde o ritmo persiste (Elimam & Marcus, 2002; Gavrilina et al., 2003; Simon et al., 1998). No que se refere à insulina, há evidências de uma melhora na sensibilidade à mesma e na tolerância à glicose no início da fase de escuridão (la Fleur et al., 2001) e uma menor sensibilidade durante o dia subjetivo de camundongos (Shi et al., 2013). Outros achados que demonstram a participação do relógio biológico no controle das concentrações circulantes de insulina são provenientes de estudos *in vitro* que demonstram um padrão circadiano de secreção de insulina por células pancreáticas e também estudos em animais mutantes para *Clock $\Delta$ 19*, com deleção de *Bmal1* ou com lesões no NSQ, nestes animais, a glicemia e insulina são afetados negativamente (Mühlbauer et al., 2009; Peschke & Peschke, 1998; Rudic et al., 2004).

A alimentação tem sido descrita como uma pista importante para a sincronização dos relógios periféricos e alguns estudos demonstram que quando ofertada durante a fase de luz, é capaz de causar um arraste na expressão dos genes de relógio no fígado, principal relógio periférico a responder à nova rotina alimentar (Damiola et al., 2000; Hara et al., 2001; R. C. Salgado-Delgado et al., 2013). De maneira interessante, a alimentação em tempo restrito à fase de luz em camundongos nocautes para *Cry1* e *Cry2* foi capaz de reestabelecer a expressão rítmica de inúmeros genes expressos no fígado desses animais

(Vollmers et al., 2009). Por outro lado, em protocolos nos quais são utilizados dietas ricas em gordura com consequente ganho de peso, resistência à insulina e outras desordens metabólicas, a alimentação restrita à fase de escuridão exerce um efeito protetor o que reafirma a importância do relógio biológico para a homeostasia energética (de Goede et al., 2019; Hatori et al., 2012).

### 3.2 RELÓGIO BIOLÓGICO E METABOLISMO

Os estudos demonstram que diferentes componentes que fazem parte do metabolismo de carboidratos tais como transportadores de glicose, receptor de glucagon além de enzimas chave para síntese de triglicerídeos e ácidos graxos possuem padrão circadiano de expressão (Panda et al., 2002; Reinke & Asher, 2016). Sabe-se, também, que camundongos nocaute para *Bmal1* apresentam problemas no metabolismo da glicose com redução da gliconeogênese e intolerância à glicose, enquanto que camundongos mutantes para *Clock* são obesos, hiperglicêmicos e hiperlipidêmicos (Marcheva et al., 2010; Rudic et al., 2004; Turek et al., 2005). Situações que ocasionam uma perturbação na sincronização do relógio biológico como ocorre com humanos submetidos ao trabalho em turnos predispõem à obesidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares, o que reforça a intrínseca relação entre metabolismo e relógio biológico (Parsons et al., 2015; Wong et al., 2015).

De maneira interessante, o *status* metabólico celular interage com o relógio biológico haja visto que as formas reduzidas do cofactor NADH aumentam a atividade do heterodímero CLOCK/BMAL1 enquanto as formas oxidadas NAD<sup>+</sup> inibem essa mesma atividade. A deacetilase sirtuina 1 (SIRT1) dependente de NAD<sup>+</sup>, que tem sua ação induzida pelos baixos valores de nutrientes, também se liga a CLOCK/BMAL1 para regular a expressão dos genes de relógio (Huang et al., 2011). Também a proteína co-ativadora PGC-1 $\alpha$ , importante regulador de transcrição em processos metabólicos, é capaz de induzir a expressão de *Bmal1* e *Reverb- $\alpha$*  através da co-ativação do receptor nuclear órfão *ROR $\alpha/\beta$* , de maneira que, camundongos que não expressam PGC-1 $\alpha$  apresentam ritmo anormal de taxa metabólica basal (C. Liu et al., 2007). Outro achado importante é o de que o PPAR $\alpha$  (receptor peroxissomo proliferador ativado do tipo alfa) que regula a expressão de inúmeros genes relacionados

com o metabolismo de colesterol e lipídeos, interfere diretamente na alça de controle do relógio biológico ao se ligar em um elemento responsivo localizado no promotor de *Bmal1*. O *Bmal1*, por sua vez também é reconhecido como um regulador da expressão do gene *PPAR $\alpha$*  (Canaple et al., 2006; Inoue et al., 2005).

### 3.3 PAPEL DOS HORMÔNIOS OVARIANOS NO METABOLISMO

Os hormônios ovarianos participam de maneira significativa do metabolismo energético das fêmeas. Em particular, sabe-se que o estradiol influencia os processos de lipólise e lipogênese nos tecidos adiposos visceral e subcutâneo. Mulheres na pós-menopausa apresentam propensão a aumento no armazenamento de gordura no tecido adiposo subcutâneo em relação àquelas na pré-menopausa devido a alterações nos fatores de armazenamento de ácidos graxos. Já mulheres submetidas a terapia de reposição com estrógenos não apresentam essa característica (Björkelund et al., 1996; Gambacciani et al., 1997; Homma et al., 2000). Esse papel dos estrógenos também é observado nos roedores. Ratas ovariectomizadas, situação na qual as concentrações de estradiol estão reduzidas, apresentam um maior ganho de peso corporal devido a um aumento na ingestão alimentar e a alterações no metabolismo energético. A terapia de reposição de estradiol reverte esse quadro (Asarian & Geary, 2002; Gray & Wade, 1981). No decorrer do ciclo estral as concentrações circulantes de estradiol variam e isso determina, entre outros fatores, oscilações no padrão de ingestão alimentar, com redução da mesma coincidindo com concentrações aumentadas de estradiol (Morin & Fleming, 1978; Petersen, 1976). Assim, a redução da ingestão alimentar é um dos mecanismos mais prováveis de ação do estradiol sobre o ganho de peso. Há indícios de que este hormônio promova um incremento na liberação de peptídeos anorexígenos tais como o transcrito regulado por anfetamina e cocaína (CART) e o hormônio estimulante de melanócitos do tipo alfa ( $\alpha$ -MSH) concomitantemente com uma redução de peptídeos orexígenos como o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao agouti (AgRP), todos liberados por neurônios situados no núcleo arqueado do hipotálamo (Rebouças et al., 2016; Santollo & Daniels, 2015).

Os estudos apontam que o receptor de estrógeno do tipo alfa (ER- $\alpha$ ) seria o responsável pelas ações centrais do estradiol tanto no núcleo arqueado, como no hipotálamo ventromedial, ambos envolvidos o com o controle da ingestão alimentar (Mauvais-Jarvis et al., 2013; Roepke, 2009). Em camundongos, a deleção do receptor do tipo alfa em neurônios que expressam o pré-hormônio proopiomelanocortina (POMC) resultou em metabolismo reduzido e obesidade visceral (Xu et al., 2011). A expressão de ER $\alpha$  em neurônios POMC pode explicar como o estradiol facilita a secreção de  $\alpha$ -MSH que age nos receptores de melanocortina dos tipos 3 e 4 nos núcleos lateral e paraventricular do hipotálamo, ocasionando um efeito catabólico que culmina em perda de peso e aumento de gasto energético (Elmqvist et al., 1998). Ademais, camundongos macho e fêmea nocautes para o receptor de estrógeno do tipo alfa apresentaram ganho de peso secundário à redução do gasto energético (Ribas et al., 2010). Recentemente, um estudo com camundongos com deleção dos receptores do tipo alfa ( $\alpha$ KO) e do tipo beta ( $\beta$ KO), demonstrou que animais  $\alpha$ KO intactos são mais pesados e gastam menos energia que os  $\beta$ KO e selvagens, todavia, a ovariectomia nos animais  $\alpha$ KO reduz a adiposidade e o tamanho dos adipócitos. Já a remoção os ovários das fêmeas  $\beta$ KO ocasiona aumento de peso e do tamanho dos adipócitos. Esses resultados levantaram a hipótese de que após quedas bruscas de estradiol, como no caso de ovariectomia, o receptor do tipo beta seria o responsável por mediar efeitos de proteção metabólica (Zidon, 2020).

Uma outra proposta de mecanismo de ação do estradiol seria a de que o mesmo promoveria um aumento da sensibilidade à leptina no hipotálamo uma vez que receptores de estrógeno do tipo alfa (ER- $\alpha$ ) estão colocalizados com receptores longos de leptina nessa região cerebral (Clegg et al., 2006; Rocha et al., 2004).

### 3.4 PAPEL DOS HORMÔNIOS OVARIANOS NO RELÓGIO BIOLÓGICO

Os hormônios ovarianos, em especial o estradiol, são capazes de alterar o ritmo circadiano de atividade locomotora de roedores haja visto que o período de maior intensidade desse parâmetro ocorre durante o proestro, quando os concentrações sanguíneas de estradiol estão aumentados (Wollnik & Turek,

1988). No mesmo sentido, a ovariectomia reduz a atividade locomotora na roda de ratos e camundongos e o tratamento com estradiol reestabelece a atividade a níveis normais. Além disso, o estradiol promove um avanço no horário de início (*onset*) de atividade, ou seja, e consolida a atividade durante a fase de escuridão (Blattner & Mahoney, 2012; Brockman et al., 2011; Ogawa et al., 2003). Fêmeas nocautes para aromatase – enzima que converte testosterona em estradiol – exibem menor atividade locomotora espontânea e aumento de atividade na fase de luz quando comparadas com a linhagem selvagem, sugerindo que a ausência de estradiol durante o desenvolvimento modifica a expressão do ritmo diário de atividade (Royston et al., 2014).

Sobre a maquinaria molecular do relógio biológico, são observadas alterações na expressão dos genes de relógio no fígado, útero e ovário no decorrer do ciclo estral em função das oscilações das concentrações sanguíneas de estradiol (Nakamura et al., 2010; Yoo et al., 2004). Em ratas ovariectomizadas, a reposição com estradiol aumenta a expressão do gene *Cry1* (Nakamura et al., 2001) e também a expressão de c-fos no NSQ (Kawakami et al., 2018).

Em humanos também há indícios da influência do estradiol sobre o ritmo circadiano, uma vez que são observadas diferenças no padrão de secreção de melatonina entre a fase lútea e folicular do ciclo menstrual de mulheres com implicação no perfil circadiano de temperatura corporal (Baker & Driver, 2007; Cagnacci et al., 1996).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da ovariectomia sobre as repostas de sincronização do relógio hepático à alimentação em horário restrito e sobre parâmetros metabólicos.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar os efeitos da alimentação em horário restrito (Time restricted, TR) sobre o ganho de peso corporal e sobre a ingestão alimentar de ratas ovariectomizadas (Grupo: OVX) ou submetidas à cirurgia fictícia de remoção dos ovários (Grupo: SHAM).
- 2) Avaliar os efeitos da alimentação em horário restrito sobre a variação temporal da expressão dos genes de relógio (*Per1*, *Bmal1*, *Reverb- $\alpha$* , *Cry1* e *Cry2*) no fígado de ratas SHAM e OVX.
- 3) Avaliar os efeitos da alimentação TR sobre as concentrações séricas de leptina em ratas SHAM e OVX.
- 4) Avaliar os efeitos da alimentação TR sobre a expressão de genes envolvidos com o metabolismo da glicose (TRB-3) e de lipídeos (Ppar- $\alpha$ ) no fígado de ratas SHAM e OVX.
- 5) Avaliar os efeitos da alimentação TR sobre a tolerância à glicose de ratas SHAM e OVX.
- 6) Avaliar os efeitos da reposição de estradiol sobre a expressão de genes de relógio no fígado de ratas ovariectomizadas.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos com livre acesso à ração e água, em um ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7:00 h (ZT0) e apagadas às 19:00 h (ZT12), em sala com temperatura ambiente de  $24^{\circ} \pm 2^{\circ}C$ . A divisão dos animais nos diferentes grupos experimentais foi realizada de maneira aleatória e os procedimentos na fase escura do fotoperíodo foram realizados sob luz vermelha de intensidade inferior ou igual a 3 lux. Anteriormente ao início dos protocolos experimentais foram realizados esfregaços vaginais durante duas semanas a fim de averiguar a regularidade do ciclo estral. Animais que não apresentaram ciclos estrais regulares foram desprezados. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo nº117/2018).

### 5.2 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

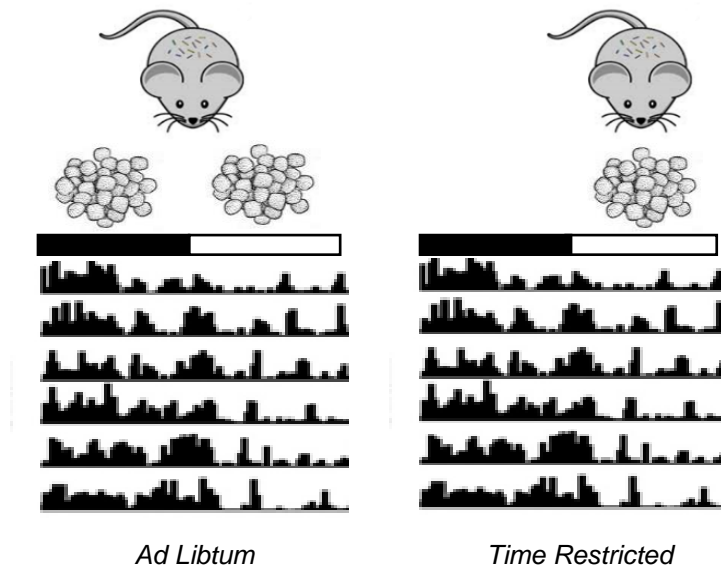
#### 5.2.1 Delineamento Experimental 1

Ratas após uma semana de cirurgia para remoção dos ovários, ou seja, ovariectomizadas (OVX) e ratas operadas apenas para exposição dos ovários (SHAM) foram alocadas em gaiolas individuais e divididas nos seguintes grupos experimentais:

- ratas SHAM *ad libitum* (**SHAM- AD**),
- ratas SHAM com acesso à dieta padrão restrito às 12 horas de luz (*time restricted* - TR) (**SHAM-TR**),
- ratas OVX *ad libitum* (**OVX-AD**),
- ratas OVX com acesso à dieta padrão restrita às 12 horas de luz (*time restricted* - TR) (**OVX-TR**)

Este protocolo experimental de diferentes regimes alimentares em fêmeas teve duração de 21 dias ao final dos quais os animais foram eutanasiados por decapitação para colheita de sangue e tecidos para posteriores análises de expressão gênica e dosagem de leptina. Os animais foram eutanasiados às 8:00

h (ZT1), às 13:00 h (ZT6), às 19:00 h (ZT12) e a 01:00 h (ZT18), sendo que dois horários abrangeram a fase de luz e dois horários, a fase de escuridão do fotoperíodo.



**Figura 1.** Desenho esquemático dos protocolos alimentares de dieta *ad libitum* ou em tempo restrito à fase de luz (TR). As linhas ilustram a atividade locomotora das ratas no período de 24 horas (actograma). A disponibilidade de alimento é representada pela ração. As barras brancas na parte superior do actograma representam a fase de luz e as barras pretas, a fase de escuridão do fotoperíodo.

*Experimento 1. Avaliação do ganho de peso corporal, da ingestão alimentar, da expressão gênica e concentrações plasmáticas de leptina*

Após uma semana de aclimação no biotério, os animais foram aleatoriamente submetidos à cirurgia de ovariectomia ou SHAM. Decorridos oito dias das cirurgias, os animais foram acondicionados em caixas individuais e iniciou-se o protocolo de alimentação em tempo restrito. Tanto os animais do grupo SHAM quanto OVX tiveram acesso à dieta padrão Nuvilab® Quimtia por doze horas, das 07:00 h às 19:00 h durante vinte e um dias. Um outro grupo de animais SHAM e OVX teve livre acesso à ração. O consumo de ração foi mensurado em todos os grupos no ZT0 e ZT12. O peso corporal foi aferido três vezes por semana em horários alternados para que a manipulação não se tornasse uma pista ambiental para o relógio biológico dos animais.



Ao final dos 21 dias de exposição à alimentação TR ou AD, os animais foram eutanasiados por decapitação às 8:00 h (ZT1), às 13:00 h (ZT6), às 19:00 (ZT12) e à 01:00 h (ZT18) para remoção do fígado e do sangue. O fígado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C e o plasma armazenado a -20 °C. A expressão dos genes de relógio *Per1*, *Bmal1*, *Reverb- $\alpha$* , *Cry1* e *Cry2* foi avaliada no fígado de animais eutanasiados no ZT1, ZT6, ZT12 e ZT18. As concentrações de leptina plasmáticas dos animais eutanasiados no ZT1 e ZT12 foram determinadas (Figura 2A).

#### *Experimento 2. Avaliação da resposta ao teste de tolerância à glicose*

Ratas foram aclimatados por duas semanas ao estímulo de manipulação da cauda para colheita de sangue. Na véspera do primeiro teste de tolerância à glicose, os animais foram submetidos a um jejum de 12h que teve início às 20h e o teste de tolerância à glicose foi realizado no ZT1 do dia seguinte. Nesse mesmo dia, um outro grupo de ratas foi mantido em jejum, também por 12 horas, das 8:00 às 20:00 h para realização do teste na fase de escuridão. No dia seguinte aos testes, as ratas foram submetidas às cirurgias de ovariectomia ou SHAM. Após 8 dias realizou-se outro teste de tolerância à glicose nos ZT1 e ZT13. No mesmo dia deu-se início ao protocolo de alimentação TR ou AD e, ao final dos 21 dias de protocolo um último teste de tolerância à glicose foi realizado nas ratas OVX-AD e OVX-TR. As ratas foram eutanasiadas por decapitação no dia seguinte (Figura 2B).

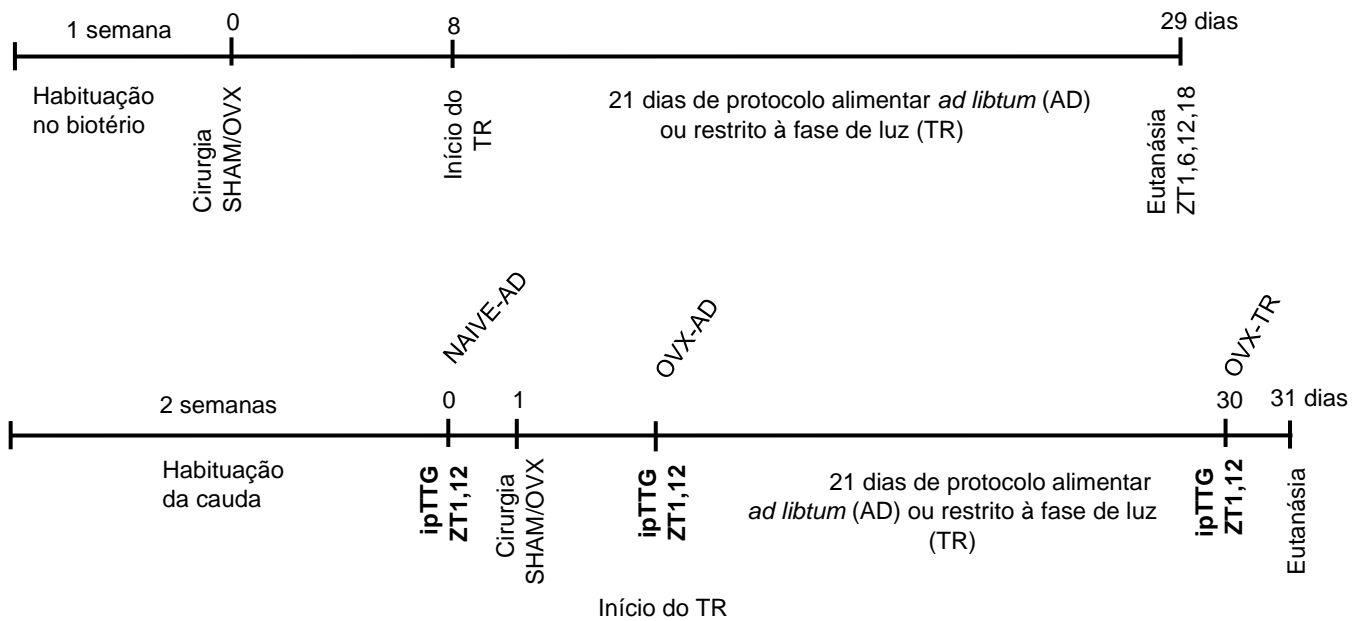
#### 5.2.2 Delineamento Experimental 2

Ratas após uma semana de cirurgia para remoção dos ovários, ou seja, ovariectomizadas (OVX) foram divididas em dois grupos experimentais:

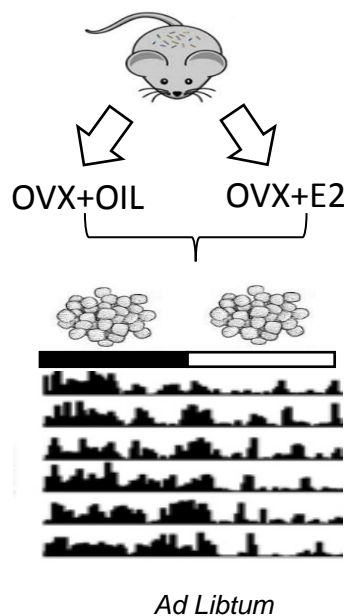
- ratas OVX tratadas com óleo (**OVX-OIL**),
- ratas OVX tratadas com cipionato de estradiol (**OVX-E2**)

Nesse protocolo, as ratas foram mantidas em regime alimentar *ad libitum* e receberam, em três manhãs consecutivas, uma injeção subcutânea de cipionato de E2 (10  $\mu$ g/0,2mL) ou 0,2 mL de óleo de milho na pata traseira. Os animais foram eutanasiados no quarto dia por decapitação no ZT1. O fígado foi removido, congelado em nitrogênio líquido e armazenado no freezer -80° C para posterior

análise da expressão dos genes de relógio *Per1*, *Bmal1*, *Reverb- $\alpha$* , *Cry1* e *Cry2* por qRT-PCR.



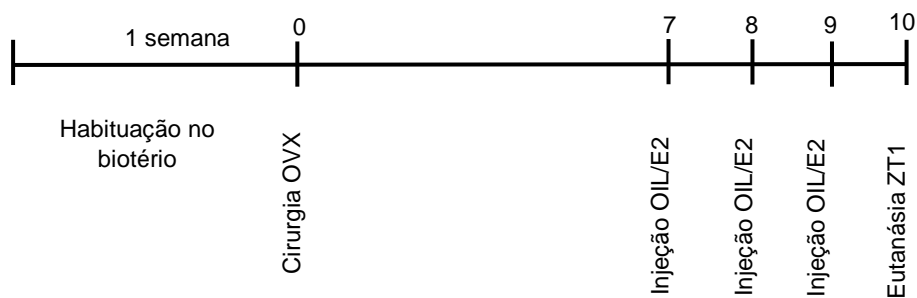
**Figura 2.** Linha do tempo dos experimentos realizados durante o protocolo de dieta em tempo restrito à fase de luz (TR). No painel A está descrito o experimento para colheita de material para PCR em tempo real e dosagem de leptina. Painel B, linha do tempo para realização dos testes de tolerância à glicose (ipTTG).



**Figura 3.** Desenho esquemático do tratamento hormonal e do protocolo alimentar. As linhas ilustram a atividade locomotora das ratas no período de 24 horas (actograma). A disponibilidade de alimento é representada pela ração. As barras preta e branca na parte superior do actograma representam, respectivamente, a fase de escuridão e de luz do fotoperíodo. Ratas ovariectomizadas e mantidas em regime alimentar *ad libitum* foram tratadas com veículo (OVX+OIL) ou estradiol (OVX+E2).

### *Experimento 3. Expressão dos genes de relógio em ratas tratadas com óleo ou estradiol*

Uma vez que os experimentos realizados no delineamento experimental 1 apontaram um efeito da ovariectomia sobre a expressão dos genes de relógio no fígado das ratas, optou-se por averiguar se o tratamento de reposição de estradiol seria capaz de reestabelecer a expressão a patamares semelhantes aos do grupo SHAM. Assim, após aclimação de uma semana no biotério, foi realizada a cirurgia de ovariectomia. Decorrida uma semana, as ratas foram tratadas, por três manhãs consecutivas, com injeções subcutâneas de óleo de milho ou cipionato de estradiol e eutanasiadas no ZT1 do quarto dia para colheita do fígado. A expressão dos genes *Per1*, *Bmal1*, *Reverb- $\alpha$* , *Cry1* e *Cry2* desses animais foi comparada com a do grupo SHAM-AD proveniente do delineamento experimental 1 (Figura 4).



**Figura 4.** Linha do tempo do experimento realizado durante o protocolo de OVX seguido de tratamento de reposição de estradiol.

### 5.3 OVARIECTOMIA

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, no caso do grupo SHAM e exposição e retirada dos ovários no grupo ovariectomizado (OVX). 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).

#### 5.4 DOSAGEM DE LEPTINA

A leptina sérica foi dosada no sangue dos animais por Elisa (Kit Quantikine® Elisa Mouse-Rat Leptin Immunoassay R&D Systems, Inc. USA & Canada), seguindo as instruções do fabricante. Foi preparada uma curva de diluição com padrão fornecido pelo fabricante e as amostras de plasma foram diluídas 5x em solução calibradora advinda do kit. Para a realização do ensaio foi adicionado à cada poço 50µL do diluente à base de proteína e 50µL de solução padrão, controle ou amostra. Após leves batidinhas, a placa foi coberta com adesivo e incubada por 2 horas. A seguir, o conteúdo foi aspirado e foram realizadas 5 lavagens, cada uma com 400 µL de tampão de lavagem por poço. A placa foi invertida em papel toalha para secagem. Adicionou-se 100µL de anticorpo conjugado a cada poço seguido de uma segunda incubação de duas horas de duração. Ao final, o conteúdo foi aspirado e adicionou-se aos poços 400 µL de tampão de lavagem, procedimento repetido por 5 vezes. A seguir, adicionou-se 100 µL de solução de substrato em cada poço e seguiu-se incubação por 30 minutos com a placa mantida protegida da luz. Na sequência adicionou-se aos poços 100 µL de *stop solution* e após leves batidinhas para garantir total mistura do conteúdo, a densidade óptica foi lida no espectrofotômetro Epoch (Bio Tek Instruments, Inc, USA) nos comprimentos de onda de 570 nm e 450 nm. O resultado foi obtido pela subtração da leitura 450 nm pelos valores da leitura de 570 nm. Esses valores foram interpolados com utilização do programa GraphPad Prism 6.0 que também foi utilizado para confecção dos gráficos.

#### 5.5 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

As ratas foram aclimatadas durante duas semanas à manipulação da cauda para colheita de sangue. Nesse procedimento denominado “*milking*,” o experimentador segurava a base da cauda com uma das mãos e com a outra deslizava no restante da mesma exercendo uma leve pressão em direção à extremidade com intuito de aumentar o fluxo sanguíneo naquela região. Para a realização do teste, foi realizado um jejum prévio de 12 h após o qual os animais receberam uma injeção intraperitoneal de D-glicose a 30% na dose de 1,5g/kg. Foi utilizada solução de iodo para assepsia da cauda anteriormente à secção da

mesma para a colheita de sangue. A glicemia foi aferida no tempo zero, ou seja, antes da injeção da solução de glicose e após 15, 30, 60 e 120 min da injeção. O valor da glicemia foi aferido com um glicosímetro Accu- Chek Performa ® da marca Roche.

## 5.6 EXTRAÇÃO DE RNA, REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE E PCR QUANTITATIVO EM TEMPO-REAL (QPCR)

### 5.6.1 Extração de RNA

O RNA total do fígado foi extraído seguindo as instruções do TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, E.U.A.). Foi utilizado 70 a 80 mg de amostras que haviam sido congeladas e armazenadas no freezer -80 °C. Após a pesagem, os tecidos foram homogeneizados com 1 mL de TRI Reagent® em tubo livre de DNase/RNase de 2 mL, previamente autoclavados. Após 5 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 200 µL de 1-Bromo-3-cloropropano (Aldrich, Japão), esta solução foi agitada em vórtex por 15 segundos e mantida por 10 minutos em temperatura ambiente. Realizou-se uma centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm à 4 °C e o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um tubo de 1,5 mL livre de DNase/RNase autoclavado, no qual adicionou-se 650 µL de isopropanol, seguida de uma suave mistura do conteúdo. Após 10 minutos em temperatura ambiente, seguiu-se outra centrifugação de 12.000 rpm à 4 °C por 35 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 1,3 mL de etanol 75% ao precipitado seguido de vortexização por 15 segundos e centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm à 4 °C. Este procedimento foi realizado 2 vezes. Colocou-se as amostras *overnight* a - 80 °C seguindo de centrifugação a 12.000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi descartado e, para secar o *pellet*, os tubos foram deixados por 5 a 10 minutos abertos e invertidos. O RNA foi ressuscitado em 80 µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (H<sub>2</sub>O DEPC, Life Technologies, E.U.A.) e tratado com DNase (kit turbo-DNA-free™, Life Technologies, E.U.A.).

Para o tratamento com DNase, as amostras foram diluídas para ter uma concentração média de 0,5 µg de RNA em um volume final de 20 µL. Foi adicionado 10% desse volume de tampão 10x Turbo DNase I e 1µL de Turbo Dnase DNase I (Ambion). A seguir, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos, ao final dos quais foi acrescentado 10% do volume de reagente de

inativação, seguido de vortexização por 10 segundos, com incubação de 2 minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente, houve centrifugação a 12.000 rpm à 4 °C por 2 minutos, o sobrenadante foi retirado e armazenado à -80 °C em tubos de 500 µL. As concentrações de RNA foram determinadas por leitura da absorbância a 260 nm em nano-espectrofotômetro (Nanodrop, E.U.A).

#### 5.6.2 Transcrição reversa

A reação de transcriptase reversa foi realizada em microtubos livres de DNase/RNase de 200 µL previamente autoclavados. A reação foi realizada utilizando-se 1 µg de RNA total. Utilizou-se 1 µL de random primers (100 ng/µL, Life Technologies), 1 µL de dNTP (10 mM, Life Technologies) e H<sub>2</sub>O DEPC para um volume final de 13,75 µL. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65 °C e à 4 °C por 1 minuto. Após incubação foi adicionada à solução 4 µL de tampão de PCR 5X, 1 µL de DTT (0,1M), 1 µL de inibidor de ribonuclease (40 U/µL, Life Technologies) e 0,25 µL da enzima Superscript III RT (200 U/ µL, SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Life Technologies), totalizando um volume de 20 µL por reação. Posteriormente as amostras foram incubadas à 25 °C por 5 minutos; 50 °C por 50 minutos e 70 °C por 15 minutos. O cDNA resultante do processo foi armazenado à -20 °C e foi utilizado nas reações subsequentes de qPCR.

#### 5.6.3 qQRT-PCR

O qQRT-PCR foi realizado em placas de 96 poços, utilizando iTaq™ universal SYBR® Green supermix (BioRad, E.U.A). Os ensaios foram realizados em um termociclador CFX96 (Bio-rad Laboratories Hercules – Califórnia - E.U.A.) e para selecionar o ciclo de temperatura, seguiu-se as instruções do fabricante do Supermix: 1 ciclo a 95 °C por 30 segundos seguido por 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C e, 30 segundos a 60 °C. Com posterior análise da curva de Melt.

Foram utilizados pares de primers específicos para a espécie, que foram produzidos com base nas sequências obtidas a partir do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>), desenhados e sintetizados pela empresa IDT (Coralville, IA, EUA) (Tabela 1). O RNA ribossômico 18S foi usado como

normalizador dos ensaios, com primers desenhados em região altamente conservada. As soluções para cada gene continham: os primers anti-senso e senso (300nM para os genes de interesse e 50nM para o 18S), o iTaq™ universal SYBR® Green supermix e água livre de nuclease (Nuclease-Free Water, Ambion, E.U.A).

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

**Tabela 1.** Sequência dos primers utilizados nas reações de PCR em tempo real

<b>18s</b>	Forward: 5' - CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA - 3'
	Reverse: 5' - GCT GGA ATT ACC GCG GCT - 3'
<b>Per1 (NM_001034125.1)</b>	Forward: 5'- ATG CAG AAA CAA CAG CCA CGG TTC - 3'
	Reverse: 5' - TGG CCA GGA TCT TGA ACA CTG CTA - 3'
<b>RevErba (NM_001113422)</b>	Forward: 5'- ACA GCT GAC ACC ACC CAG ATC - 3'
	Reverse: 5 - 'CAT GGG CAT AGG TGA AGA TTT CT - 3'
<b>Bmal1 (NM_024362.2)</b>	Forward: 5' - AGG CCT TCA CTG GAA TGG TGC TAT - 3'
	Reverse: 5'- TGA CTG GCC TGG AAC IPTTG CTA CAT - 3'
<b>Cry1 (NM_198750.2)</b>	Forward: 5' - CCT TCT AAT CCT AAT GGG AAC G - 3'
	Reverse: 5' - ACC ACT TCC IPTTG AGA GCA GTT T - 3'
<b>Cry2 (NM_133405.2)</b>	Forward: 5'-TTC CCA AGG CTT TTC AAG GAA T - 3'
	Reverse: 5'- GCC ATC TTC ATA ATG GCT GCA T - 3'
<b>Ppar-<math>\alpha</math> (NM_013196.1)</b>	Forward: 5'- TAC CAC TAT GGAGTC CAC GCA GCA TGT - 3'
	Reverse: 5' - TTG CAG CTT CGA TCA CAC TTG TCG - 3'
<b>TRB-3 (NM_144755.2)</b>	Forward: 5'-TGC GTC GCT TTG TCT TCA GCA ACT-3'
	Reverse: 5'- ATC CAG TCA TCA CGC AGG CAT CTT-3'

## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foram utilizados os programas SigmaPlot versão 11.0 (San Jose, CA, EUA) e GraphPadPrism versão 6.0 (San Diego, CA, EUA) sendo esse utilizado para a confecção dos gráficos. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro-padrão da média. O intervalo de confiança foi de 0,05 e o teste de normalidade utilizado foi o Shapiro-Wilk.

A comparação entre os resultados de massa corporal e ingestão alimentar entre os diferentes grupos e tempos estudados foi realizada por ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida do teste de Tukey. O delta de peso foi calculado pela diferença entre massa corporal final e inicial.

Os dados de ingestão alimentar total foram analisados por ANOVA de uma via seguida de Tukey. As análises dos dados de leptina e de expressão dos genes de relógio foram realizadas por ANOVA de duas vias seguida de Tukey.



Os dados de expressão de genes de metabolismo foram analisados por teste t de Student para diferenças entre os grupos no mesmo horário (ZT). Os valores de variação glicêmica no teste de tolerância à glicose foram avaliados por ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida de Bonferroni e a área sobre a curva, por teste t de Student.

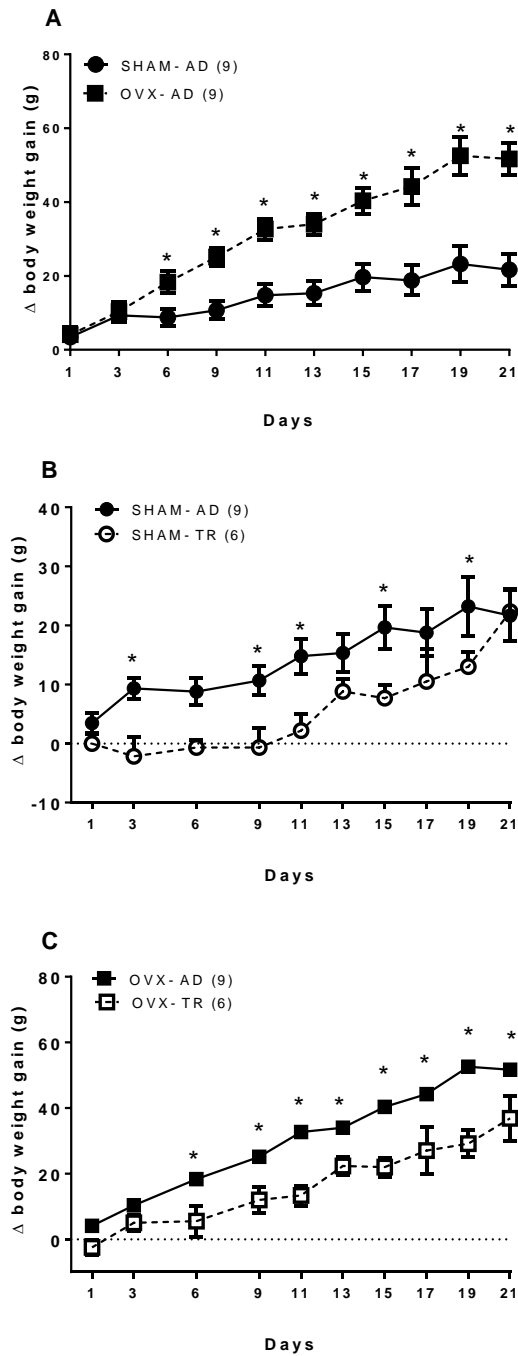
As diferenças na expressão gênica entre os grupos SHAM e OVX tratados com óleo ou estradiol foram avaliadas por ANOVA de uma via seguida de Tukey.

Para avaliar se as variações temporais encontradas na expressão dos genes de relógio *Per1*, *Bmal1*, *Reverb- $\alpha$* , *Cry1* e *Cry2* ajustam-se a uma curva cossenoidal utilizou-se o software CircWave 1.4 (Netherland, 2007). Este software constrói curvas de Fourier baseada em harmônicas nas quais os dados melhor se ajustam.

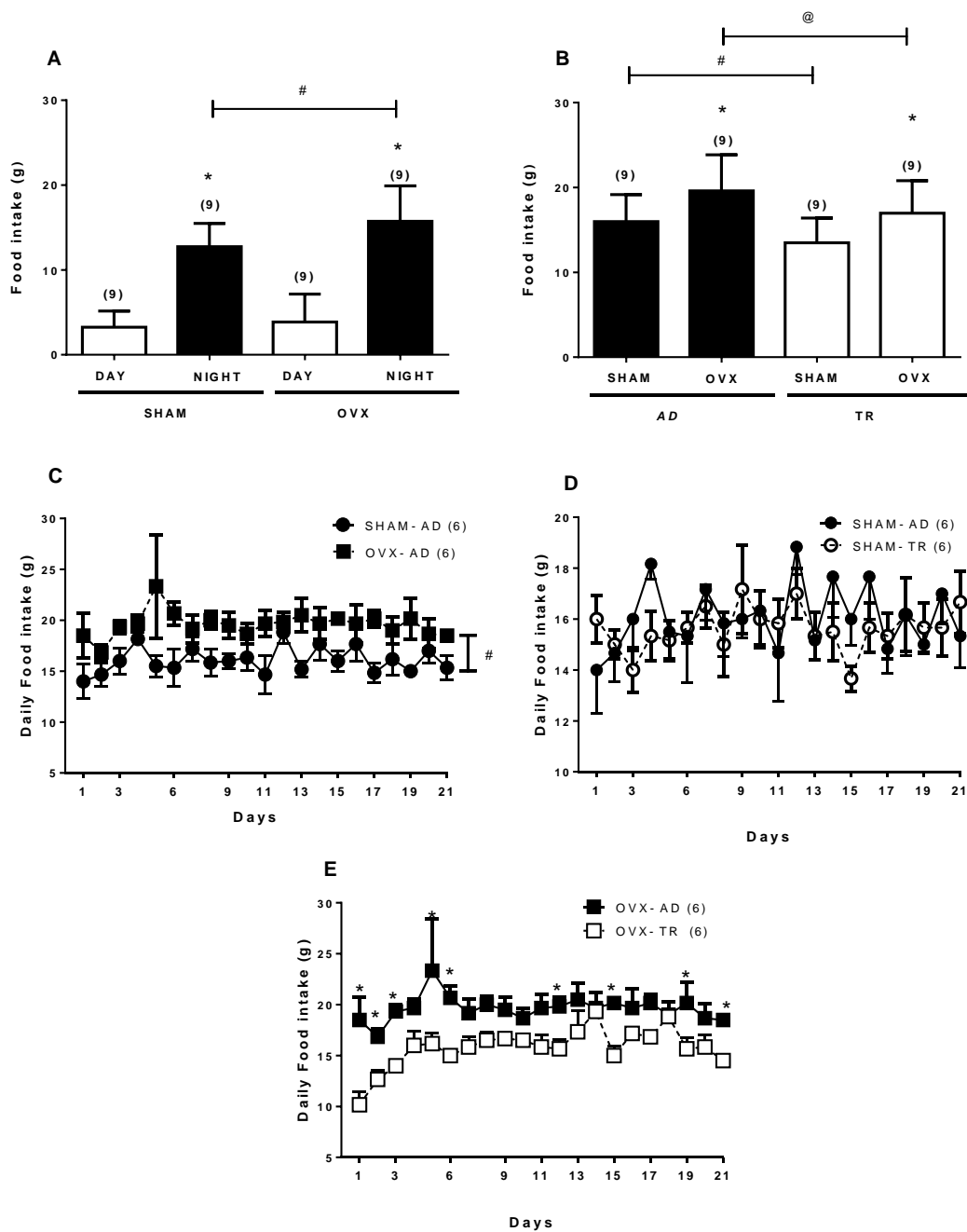
## 7. RESULTADOS

A ovariectomia em regime AD promoveu um aumento na massa corporal das ratas em comparação às aquelas do grupo SHAM-AD (**Figura 5 A**). Os animais SHAM-TR ganharam menos massa corporal do que os animais SHAM-AD sem que houvesse uma diferença na ingestão alimentar dia a dia (**Figura 5 B e Figura 6 D**). A alimentação em tempo restrito no grupo OVX promoveu uma atenuação do ganho de peso corporal em comparação ao grupo OVX-AD, com uma consequente diminuição da ingestão alimentar no decorrer dos dias (**Figura 5 C e Figura 6 E**).

O perfil de ingestão alimentar dos animais SHAM e OVX em regime AD foi avaliado no início da fase de luz e no início da fase de escuridão para refletir, respectivamente, a ingestão durante o dia e durante a noite (**Figura 6 A**). Observou-se que mesmo mantendo o padrão circadiano de comportamento alimentar, ou seja, maior ingestão durante a fase de escuridão ou à noite, o grupo OVX apresentou uma maior ingestão do que o grupo SHAM durante à noite (**Figura 6 A**). A análise do consumo alimentar total acompanhado durante os 21 dias de experimento, demonstrou que os animais OVX apresentam maior ingestão alimentar em relação ao grupo SHAM, independentemente do protocolo alimentar, ou seja, AD ou TR (**Figura 6 B**). Por outro lado, a comparação entre os grupos nos diferentes protocolos demonstrou que os animais AD apresentaram maior ingestão acumulada do que os animais do grupo TR tanto dos grupos SHAM quanto OVX (**Figura 6 B**). A análise do consumo alimentar revelou que, apesar de a ovariectomia ter efeito sobre a ingestão alimentar total (**Figura 6 B**), não há diferença entre os grupos SHAM e OVX a cada dia de experimento (**Figura 6 C**).



**Figura 5. Variação do ganho de peso corporal de ratas SHAM e OVX em regime alimentar *ad libitum* (AD) e restrita à fase de luz (TR). Dados são expressos como média  $\pm$  SEM. Ganho de peso corporal no decorrer dos 21 dias de protocolo alimentar dos grupos SHAM-AD vs OVX-AD (Painel A), SHAM-AD vs SHAM-TR (Painel B) e OVX-AD vs OVX-TR (Painel C). ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida de Tukey: \*,  $p < 0,05$  para diferenças entre SHAM vs OVX no Painel A e entre AD vs TR nos painéis B e C.**



**Figura 6. Ingestão alimentar de ratas SHAM e OVX em regime alimentar *ad libitum* (AD) e restrito à fase de luz (TR).** Dados são expressos como média  $\pm$  SEM. Painel A. Ingestão alimentar de ratas SHAM e OVX durante o dia e a noite. ANOVA de uma via seguida de Tukey. \*,  $p < 0,05$  para diferenças entre *day* e *night* dentro dos grupos SHAM e OVX, #,  $p < 0,05$  entre os grupos na fase da noite. Painel B. Ingestão alimentar de ratas SHAM e OVX em regime alimentar AD ou TR. ANOVA de uma via seguida de Tukey. \*,  $p < 0,05$  para diferenças entre SHAM vs OVX no mesmo protocolo alimentar, #  $p < 0,05$  para diferenças entre os grupos SHAM, @  $p < 0,05$  para diferenças entre os grupos OVX. Ingestão alimentar no decorrer dos 21 dias de protocolo experimental dos grupos SHAM-AD vs OVX-AD (Painel C), SHAM-AD vs SHAM-TR (Painel D) e OVX-AD vs OVX-TR (Painel E). ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida de Tukey. \*  $p < 0,05$  para diferença entre os grupos ao longo do tempo. #,  $p < 0,05$  entre os tratamentos.

Em relação a expressão dos genes de relógio, avaliou-se, nos diferentes horários, tanto o efeito da ovariectomia quanto o efeito da alimentação em horário restrito.

O grupo SHAM-AD apresentou um pico na expressão de *Per1* no ZT12 e esta resposta também foi observada no grupo OVX-AD (**Figura 7 A**). Por outro lado, a ovariectomia ocasionou um aumento na expressão de *Per1* no ZT1 (**Figura 7 A**). A alimentação em tempo restrito à fase de luz aboliu o pico de expressão de *Per1* no ZT 12 em ambos os grupos, SHAM e OVX (**Figura 7 B e C**), no entanto, não foi capaz de reverter o aumento na expressão de *Per1* induzida pela ovariectomia no ZT1 (**Figura 7 C**).

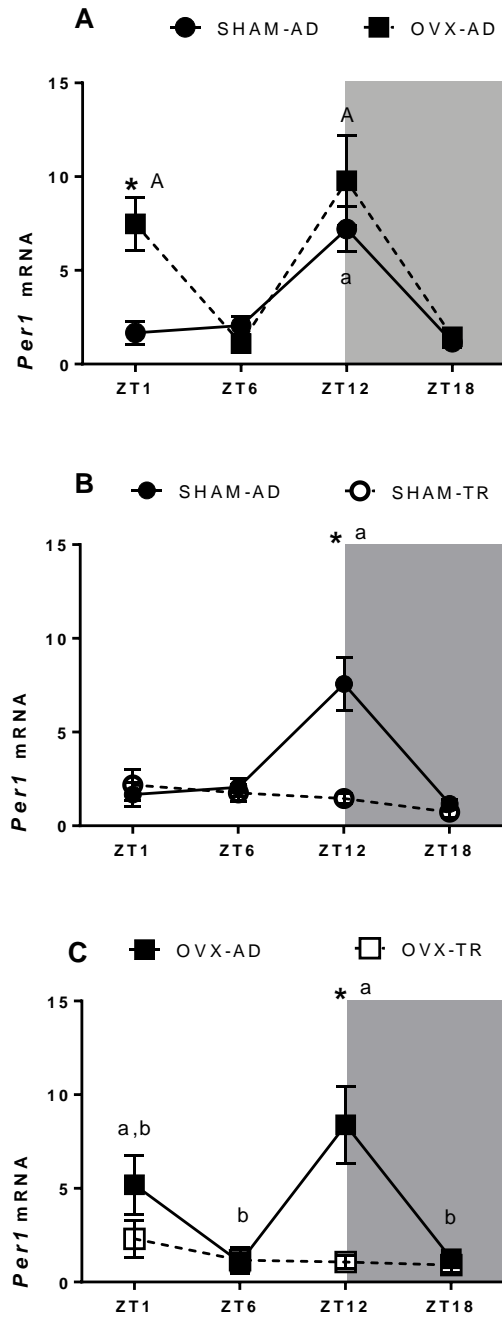
A expressão de *Bmal1* foi maior no ZT1 em comparação aos demais ZTs nos grupos SHAM-AD e OVX-AD (**Figura 8 A**). Quando comparados entre esses dois grupos, a quantidade relativa de mRNA de *Bmal1* foi maior no ZT1 no grupo OVX-AD (**Figura 8 A**). Restringir a alimentação à fase de luz reduziu a expressão de *Bmal1* no ZT1 em ambos os grupos SHAM e OVX, anulando a diferença de expressão nos diferentes horários do dia no grupo SHAM-TR (**Figura 8 B e C**).

A expressão do gene *Reverb- $\alpha$*  no grupo SHAM-AD foi maior no ZT6 quando comparado aos demais ZTs (**Figura 9 A**). Já o grupo OVX apresentou maior expressão de *Reverb- $\alpha$*  no ZT6 e ZT12 quando comparado aos demais ZTs (**Figura 9 A**). No ZT6, a expressão de *Reverb- $\alpha$*  no grupo SHAM AD foi maior do que os valores encontrados no grupo OVX-AD (**Figura 9 A**). A alimentação em tempo restrito no grupo SHAM aboliu as variações temporais observadas para a expressão de *Reverb- $\alpha$*  (**Figura 9 B**). No grupo SHAM-TR, os valores de expressão mostraram-se menores no ZT6 e no ZT12 e maiores no ZT18 em comparação ao grupo SHAM-AD (**Figura 9 B**). A resposta à TR não foi afetada pela OVX, dessa forma, observou-se valores reduzidos na expressão de *Reverb- $\alpha$*  nos ZT6 e ZT12 e aumentados no ZT18 no grupo OVX-TR quando comparados ao grupo OVX-AD (**Figura 9 C**).

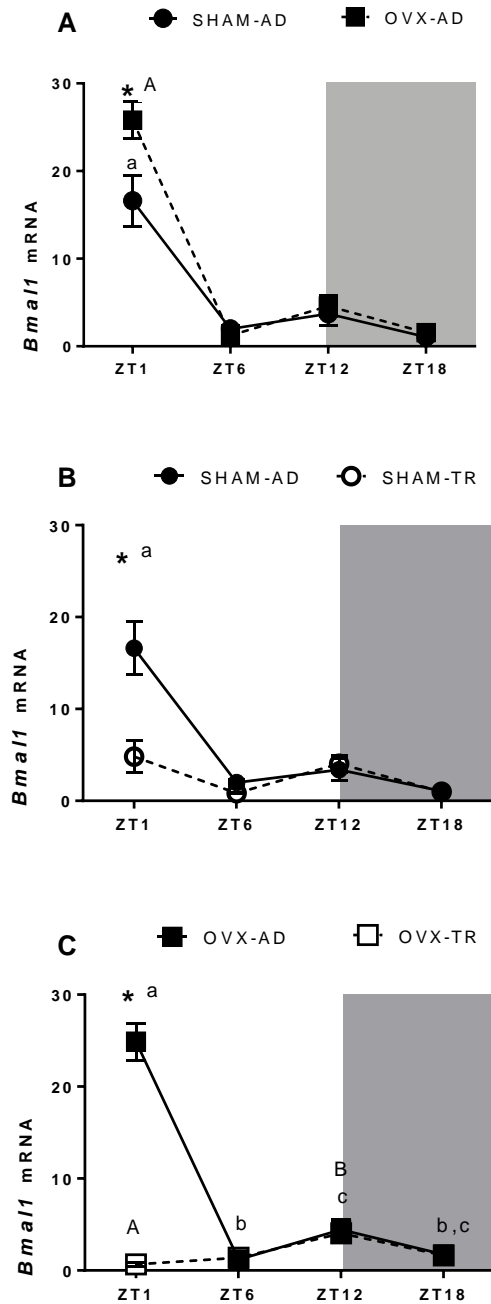
Em ambos os grupos, SHAM-AD e OVX-AD, a expressão de *Cry1* foi maior no ZT1 em comparação aos demais horários estudados. Por outro lado, o grupo OVX-AD apresentou valores de RNAm aumentados de *Cry1* quando comparados com o SHAM-AD neste horário (**Figura 10 A**). O efeito da alimentação em tempo restrito foi semelhante nos grupos SHAM e OVX. Desta

forma, a expressão de *Cry1* se manteve constante nos quatro pontos avaliados tanto no grupo SHAM-TR quanto no OVX-TR (**Figura 10 B e C**).

O perfil de expressão do gene *Cry2* foi similar ao apresentado pelo gene *Cry1*. Assim, o maior valor de expressão foi encontrado no ZT1 em relação aos demais ZTs para ambos os grupos SHAM-AD e OVX-AD (**Figura 11 A**). Entretanto, a comparação entre SHAM-AD e OVX-AD mostrou que a ovariectomia aumentou a expressão deste gene neste horário (**Figura 11 A**). A alimentação em horário restrito aboliu as diferenças temporais em ambos os grupos SHAM e OVX (**Figura 11 B e C**).

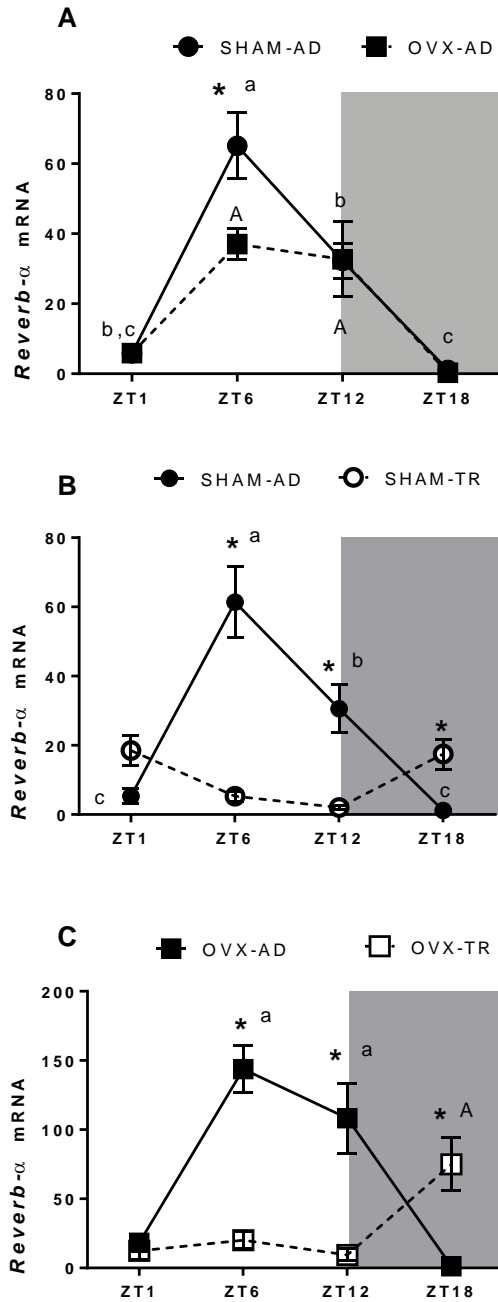


**Figura 7. Expressão de *Per1* no fígado de ratas SHAM e OVX em regime alimentar *ad libitum* (AD) ou restrito à fase de luz (TR).** Dados são expressos como média  $\pm$ SEM. (n= 3-6). ANOVA de duas vias seguida de Tukey. Painel A. Efeito da ovariectomia sobre a expressão de *Per1*. \*p < 0,05 para diferenças entre tratamentos no mesmo ZT. a, p < 0,05 vs ZT1, ZT6, ZT18 no grupo SHAM AD, A, p < 0,05 vs ZT6 e ZT18 no grupo OVX AD. Painel B. Efeito da alimentação TR sobre a expressão de *Per1* no grupo SHAM. \*p < 0,05 diferenças entre tratamentos no mesmo ZT. a, p < 0,05 vs ZT1, ZT6 e ZT18 no grupo SHAM AD. Painel C. Efeito da alimentação TR sobre a expressão de *Per1* no grupo OVX. \*p < 0,05 diferenças entre tratamentos no mesmo ZT. Letras minúsculas, p < 0,05 para diferenças entre ZTs no grupo OVX-AD. A barra cinza indica a fase de escuridão do fotoperíodo. Painel A, expressão gênica normalizada pelo grupo SHAM-AD ZT18. Painel B, normalizada pelo SHAM-AD ZT18 e Painel C, normalizada pelo OVX-AD ZT6.

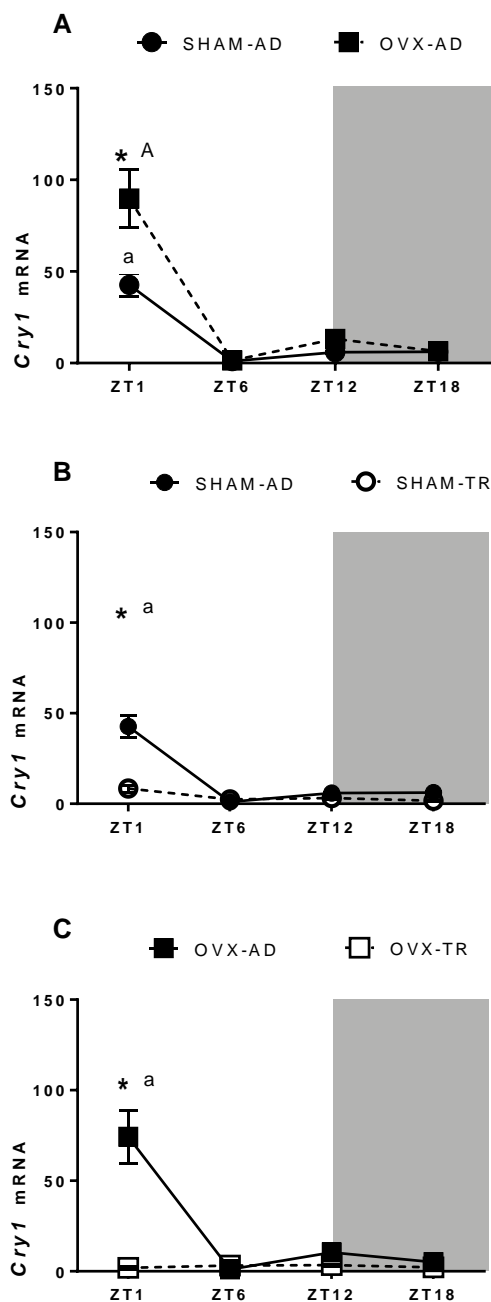


**Figura 8. Expressão de *Bmal1* no fígado de ratas SHAM e OVX em regime alimentar ad libitum (AD) ou restrito à fase de luz (TR).** Dados são expressos como média  $\pm$ SEM. (n= 3-6). ANOVA de duas vias seguida de Tukey. Painel A. Efeito da ovariectomia sobre a expressão de *Bmal1*. \* $p < 0,05$  para diferenças entre tratamentos no mesmo ZT. a,  $p < 0,05$  vs ZT6, ZT12 e ZT18 no grupo SHAM-AD. A,  $p < 0,05$  vs ZT6, ZT12 e ZT18 no grupo OVX AD. Painel B. Efeito da alimentação TR sobre a expressão de *Bmal1* no grupo SHAM. \* $p < 0,05$  para diferenças entre tratamentos no mesmo ZT. a,  $p < 0,05$  vs ZT6, ZT12 e ZT18 no grupo SHAM-AD. Painel C. Efeito da alimentação TR sobre a expressão de *Bmal1* no grupo OVX. \* $p < 0,05$  para diferença entre tratamentos no mesmo ZT. Letras minúsculas,  $p < 0,05$  para diferenças entre ZTs no grupo OVX-AD e letras maiúsculas,  $p < 0,05$  para diferenças entre ZTs nos grupos OVX-TR. A barra cinza indica a fase de escuridão do fotoperíodo. Painel A, expressão gênica normalizada pelo grupo SHAM-AD ZT18. Painel B, normalizada pelo SHAM-AD ZT18 e Painel C, normalizada pelo OVX-AD ZT6.

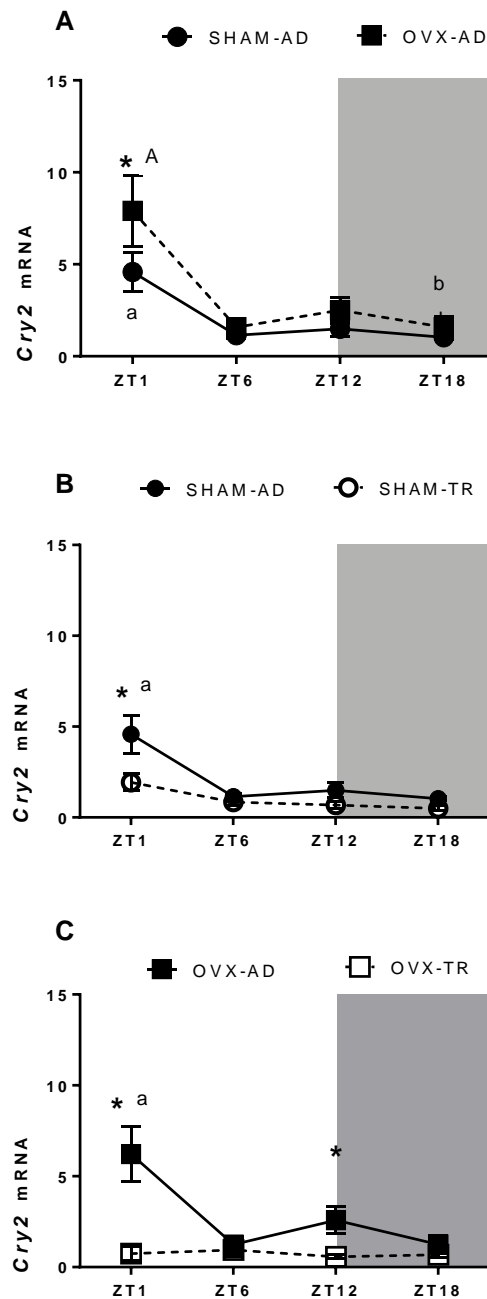




**Figura 9. Expressão de *Reverb-α* no fígado de ratas SHAM e OVX em regime alimentar ad libitum (AD) ou restrito à fase de luz (TR).** Dados são expressos como média  $\pm$ SEM. (n= 3-6). ANOVA de duas vias seguida de Tukey. Painel A. Efeito da ovariectomia sobre a expressão de *Reverb-α*. \* $p < 0,05$  para diferenças entre tratamentos no mesmo ZT. Letras minúsculas,  $p < 0,05$  para diferenças entre ZTs no grupo SHAM-AD. A,  $p < 0,05$  vs ZT1 e ZT18 no grupo OVX-AD. Painel B. Efeito da alimentação TR sobre a expressão de *Reverb-α* no grupo SHAM. \* $p < 0,05$  para diferenças entre tratamentos no mesmo ZT. Letras minúsculas,  $p < 0,05$  para diferenças entre ZTs no grupo SHAM-AD. Painel C. Efeito da alimentação TR sobre a expressão de *Reverb-α* no grupo OVX. \* $p < 0,05$  para diferença entre tratamentos no mesmo ZT. Letras minúsculas,  $p < 0,05$  para diferenças entre ZTs no grupo OVX-AD. A,  $p < 0,05$  vs ZT1, ZT6 e ZT12 no grupo OVX-TR. A barra cinza indica a fase de escuridão do fotoperíodo. Painel A, expressão gênica normalizada pelo grupo SHAM-AD ZT18. Painel B, normalizada pelo SHAM-AD ZT18 e Painel C, normalizada pelo OVX-AD ZT18.



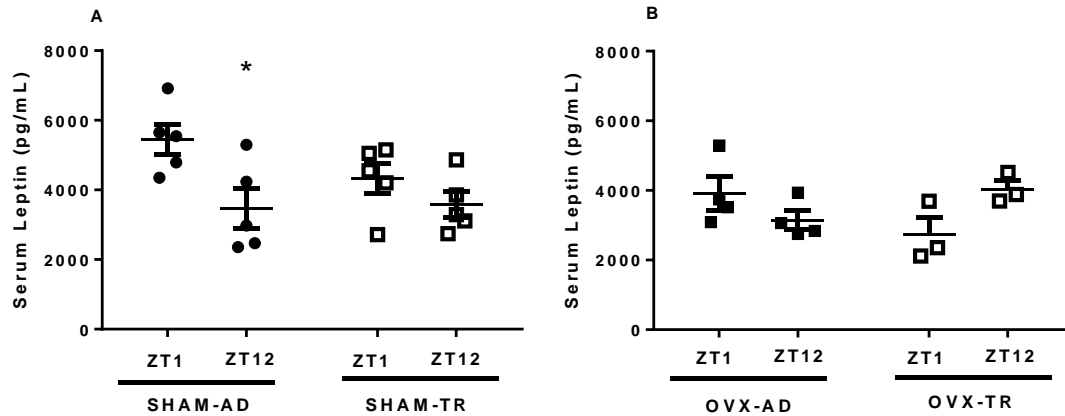
**Figura 10 . Expressão de *Cry1* no fígado de ratas SHAM e OVX em regime alimentar ad libitum (AD) ou restrito à fase de luz (TR).** Dados são expressos como média  $\pm$ SEM. (n= 3-6). ANOVA de duas vias seguida de Tukey. Painel A, efeito da ovariectomia sobre a expressão de *Cry1*. \*p <0,05 para diferenças entre tratamentos no mesmo ZT. a, p<0,05 vs ZT6, ZT12 e ZT18 no grupo SHAM-AD. A, p<0,05 vs ZT6, ZT12 e ZT18 no grupo OVX-AD. Painel B. Efeito da alimentação TR sobre a expressão de *Cry1* no grupo SHAM. \*p <0,05 para diferenças entre tratamentos no mesmo ZT. a, p<0,05 vs ZT6, ZT12 e ZT18 no grupo SHAM-AD. Painel C. Efeito da alimentação TR sobre a expressão de *Cry1* no grupo OVX. \*p<0,05 para diferença entre tratamentos no mesmo ZT. a, p<0,05 vs ZT6, ZT12 e ZT18 no grupo OVX AD. A barra cinza indica a fase de escuridão do fotoperíodo. Painel A, expressão gênica normalizada pelo grupo SHAM-AD ZT6. Painel B, normalizada pelo SHAM-AD ZT6 e Painel C, normalizada pelo OVX-AD ZT6.



**Figura 11. Expressão de Cry2 no fígado de ratas SHAM e OVX em regime alimentar ad (AD) ou restrito à fase de luz (TR).** Dados são expressos como média  $\pm$ SEM. (n= 3-6). ANOVA de duas vias seguida de Tukey. Painel A. Efeito da ovariectomia sobre a expressão de Cry2. \*p <0,05 para diferenças entre tratamentos no mesmo ZT. Letras minúsculas, p<0,05 para diferenças entre ZTs no grupo SHAM-AD. A, p<0,05 vs ZT6, ZT12 e ZT18 no grupo OVX-AD. Painel B. Efeito da alimentação TR sobre a expressão de Cry2 no grupo SHAM. \*p <0,05 para diferenças entre tratamentos no mesmo ZT. a, p<0,05 vs ZT6, ZT12 e ZT18 no grupo SHAM-AD. Painel C. Efeito da alimentação TR sobre a expressão de Cry2 no grupo OVX. \*p<0,05 para diferença entre tratamentos no mesmo ZT. a, p<0,05 vs ZT6, ZT12 e ZT18 no grupo OVX-AD. A barra cinza indica a fase de escuridão do fotoperíodo. Painel A, expressão gênica normalizada pelo grupo SHAM-AD ZT18. Painel B, normalizada pelo SHAM-AD ZT18 e Painel C, normalizada pelo OVX-AD ZT18.

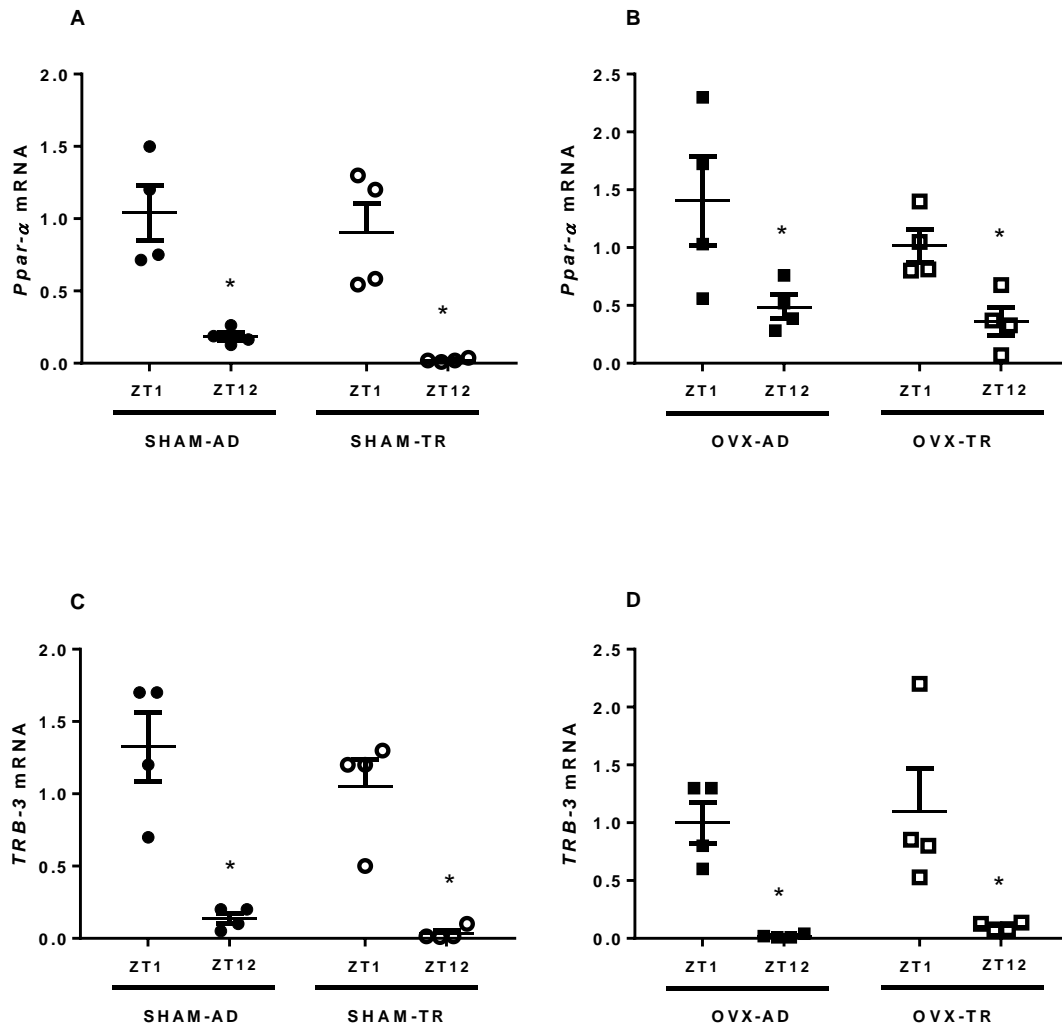
Para todos os valores de mRNA analisados nos diferentes horários onde foram detectadas diferenças entre os tempos, analisamos se o perfil da variação temporal se ajustou a uma curva cossenóide, através da análise de Fourier. A ovariectomia e a alimentação em tempo restrito, contudo, afetaram diferentemente o ajuste das variações temporais às curvas cossenóides. Para o gene *Per1*, adequaram-se à curva cossenóide os grupos SHAM-AD ( $r^2=0,43$  e  $F=6,52$ ) e OVX-TR ( $r^2=0,58$  e  $F=12,93$ ). A alimentação TR no grupo SHAM e a OVX no grupo AD, fizeram com que a diferença temporal de expressão fosse abolida ( $r^2=0$  e  $F=NaN$ ). Para os valores de mRNA do gene *Bmal1*, o grupo SHAM-TR não se ajustou à curva ( $r^2=0$  e  $F=NaN$ ), diferentemente dos grupos SHAM-AD ( $r^2=0,38$  e  $F=5,3$ ), OVX-AD ( $r^2=0,45$  e  $F=7,08$ ) e OVX-TR ( $r^2=0,57$  e  $F=12,95$ ). Referente ao gene *Reverb- $\alpha$* , todos os grupos se ajustaram a uma curva cossenóide; SHAM-AD ( $r^2=0,74$  e  $F=24,94$ ), OVX-AD ( $r^2=0,44$  e  $F=7,29$ ), SHAM-TR ( $r^2=0,51$  e  $F=9,70$ ) e OVX-TR ( $r^2=0,32$  e  $F=4,13$ ). Para o *Cry1*, o grupo SHAM-TR não se ajustou à curva ( $r^2=0$  e  $F=NaN$ ), diferentemente dos grupos SHAM-AD ( $r^2=0,50$  e  $F=8,79$ ), OVX-AD ( $r^2=0,33$  e  $F=4,22$ ), OVX-TR ( $r^2=0,29$  e  $F=3,82$ ). Por fim, referente ao gene *Cry2*, ajustaram-se à curva cossenóide os grupos SHAM-AD ( $r^2=0,31$  e  $F=4,10$ ) e OVX-AD ( $r^2=0,31$  e  $F=4,09$ ) e não se ajustaram, os grupos SHAM-TR e OVX-TR ( $r^2=0$  e  $F=NaN$ ).

Os valores circulantes de leptina foram diferentes nos ZT1 e ZT12 para o grupo SHAM-AD, sendo observados menores valores no ZT12. Esta diferença foi perdida quando os animais foram submetidos à alimentação restrita à fase de luz (SHAM-TR, **Figura 12 A**). A ovariectomia aboliu as diferenças temporais nos valores encontrados de leptina sérica no SHAM-AD (**Figura 12 B**) e não foram encontradas diferenças entre os ZTs analisados nos grupos OVX-AD e OVX-TR (**Figura 12 B**).



**Figura 12. Concentrações plasmáticas de leptina de ratas SHAM e OVX em regime alimentar ad libitum (AD) e restrito à fase de luz (TR).** Dados são expressos como média  $\pm$ SEM. (n= 5 grupo SHAM, n=4 grupo OVX). ANOVA de duas vias seguida de Tukey.  $p < 0,05$  para diferença entre ZTs no grupo SHAM-AD.

A expressão dos genes metabólicos foi avaliada em dois horários. Os ZT1 e ZT12 foram escolhidos por representarem o início das fases clara e escura, respectivamente. As análises demonstraram que em comparação ao grupo SHAM-AD, nem a ovariectomia nem a alimentação em horário restrito foram capazes de alterar a expressão gênica nos horários contemplados. Para os dois genes, nos quatro grupos (SHAM-AD, SHAM-TR, OVX-AD e OVX-TR), a expressão foi menor no ZT12 (**Figura 13**).



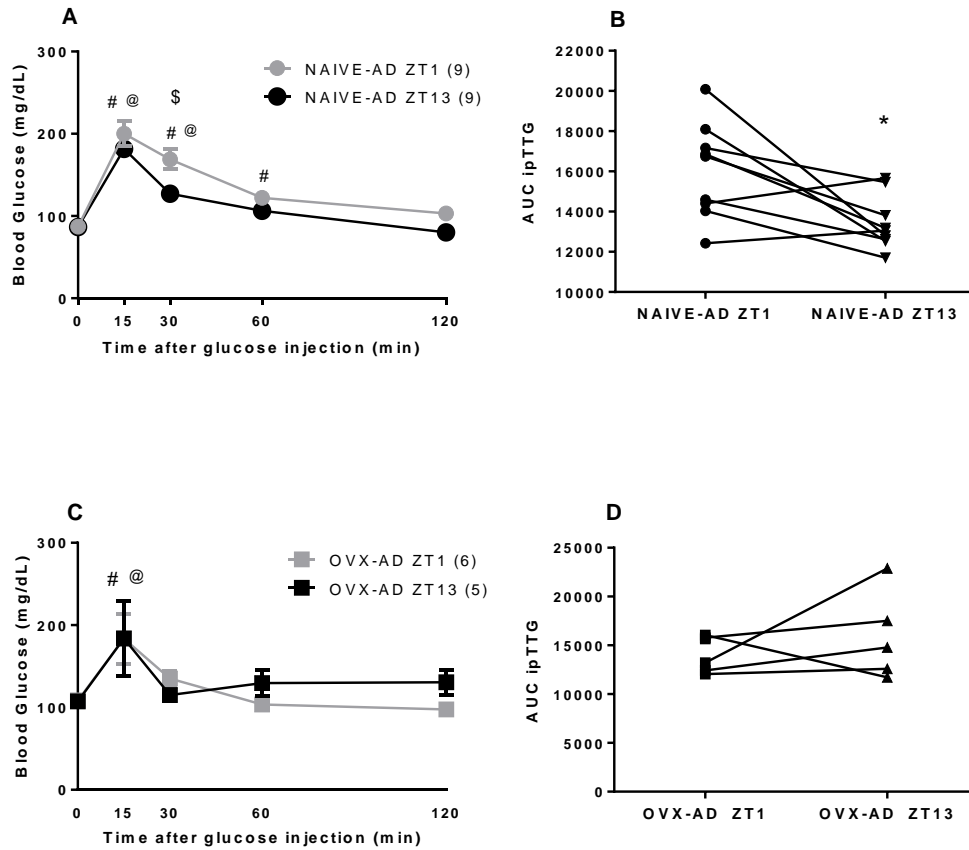
**Figura 13. Expressão hepática de genes metabólicos de ratas SHAM e OVX em regime alimentar ad libitum (AD) ou restrito à fase de luz (TR).** Dados são expressos como média  $\pm$ SEM. (n=4). Painéis A e B, expressão do gene Ppar- $\alpha$  nas ratas SHAM e OVX, respectivamente. Painéis C e D, expressão do gene TRB-3 nas ratas SHAM e OVX, respectivamente. Test t de Student.  $p < 0,05$  para diferença entre ZT1 x ZT12 no mesmo grupo.

O teste de tolerância à glicose realizado com as ratas em regime alimentar AD, anteriormente à cirurgia SHAM, denominadas NAIVE-AD, demonstrou que nos dois horários avaliados houve um pico glicêmico após a injeção da glicose intraperitoneal (**Figura 14 A**). O grupo NAIVE-AD avaliado no ZT13 retornou aos valores basais após 60 minutos enquanto o grupo NAIVE-AD avaliado no ZT1, o fez após 120 minutos do início do teste. Houve uma diferença na área sob a curva entre os grupos, com menores valores para os animais NAIVE-AD no ZT13 (**Figura 14 A e B**).

Um outro teste foi realizado com intuito de avaliar o efeito da ovariectomia sobre a tolerância à glicose nos diferentes horários. O mesmo foi realizado após 8 dias de OVX com os animais em regime alimentar AD (**Figura 14 C e D**). Os grupos apresentaram o pico glicêmico após a injeção intraperitoneal de glicose e ambos retornaram aos valores basais de glicemia após 30 minutos do início do teste. Não houve diferença na resposta nos diferentes horários (**Figura 14 C e D**). A ovariectomia extinguiu a melhor resposta apresentada pelos animais NAIVE desafiados à noite (**Figura 14 B e D**).

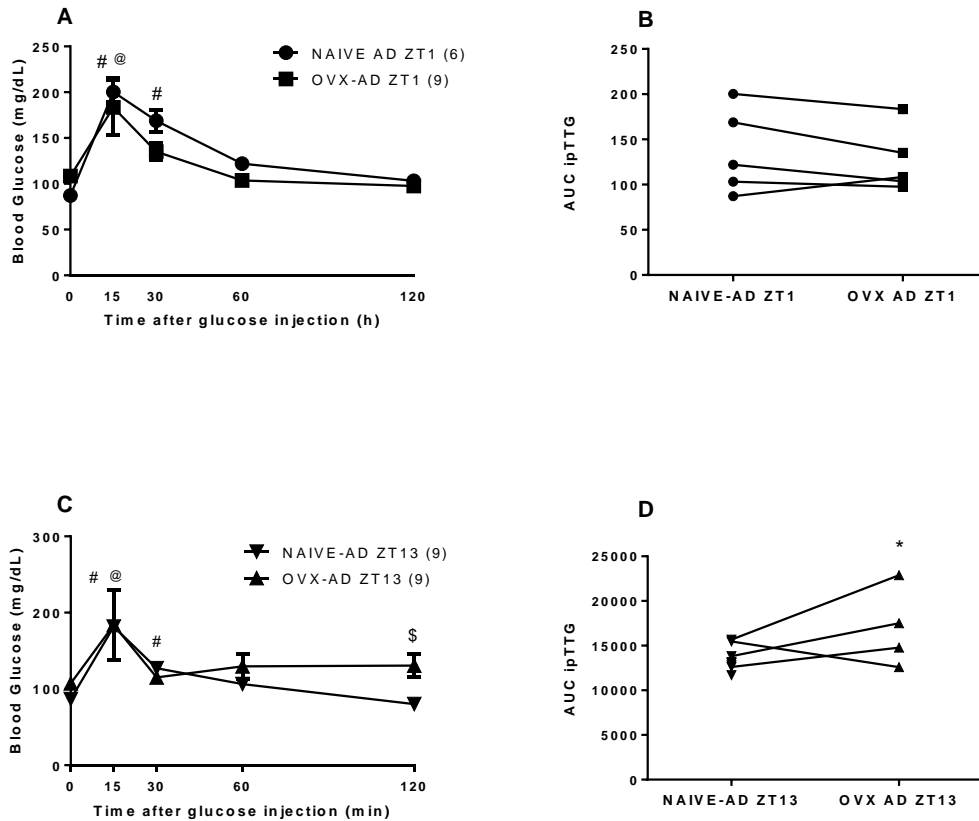
Foi realizada também a comparação da resposta ao teste de tolerância à glicose entre os grupos NAIVE e OVX nos ZT1 e ZT13. Os grupos responderam de maneira semelhante ao teste no ZT1, porém as ratas ovariectomizadas tiveram uma pior resposta no ZT13 (**Figura 15 A-D**). Em todos os grupos foi observado um pico glicêmico 15 minutos após a injeção de glicose, contudo, nos dois horários estudados os grupos OVX retornaram aos valores basais de glicemia após 30 minutos do início do teste enquanto que os animais NAIVE retornaram após 60 minutos (**Figura 15 A e C**). A análise de área sob a curva detectou diferença entre os grupos apenas no ZT13 (**Figura 15 B e D**).

Para avaliar se a dieta em tempo restrito seria capaz de alterar a resposta glicêmica, um último teste de tolerância à glicose foi realizado ao final do protocolo alimentar de vinte e um dias comparando-se animais OVX-AD com OVX-TR. O teste foi realizado no ZT1 afim de respeitar o jejum dos animais submetidos ao protocolo de TR. Conforme observado nos testes anteriores, os animais apresentaram um pico glicêmico após desafio de injeção com glicose e retornaram aos valores basais após 60 minutos da injeção. O grupo OVX-TR apresentou uma maior área sob a curva, portanto, uma resposta prejudicada ao teste em relação ao grupo OVX-AD (**Figura 16**).

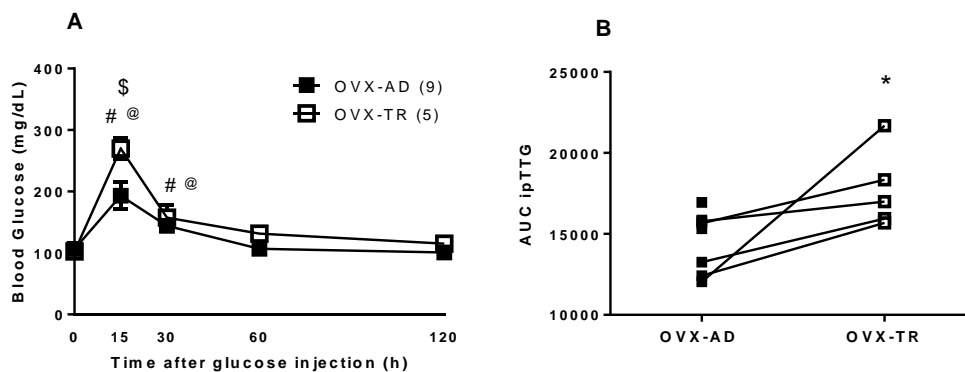


**Figura 14. Teste de tolerância à glicose em ratas NAIVE e ovariectomizadas (OVX) em regime alimentar *ad libitum* (AD) realizado às 08:00 (ZT1) e às 20:00 (ZT13).** Dados são expressos em média  $\pm$ SEM. ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida de Bonferroni #  $p < 0,05$  vs tempo 0 nos grupos ZT1. @  $p < 0,05$  versus tempo 0 nos grupos ZT13. \$  $p < 0,05$  para ZT1 vs ZT13 (Painéis A e C) Área sob a curva (AUC), Test T de Student \*  $p < 0,05$  para painéis B e D.



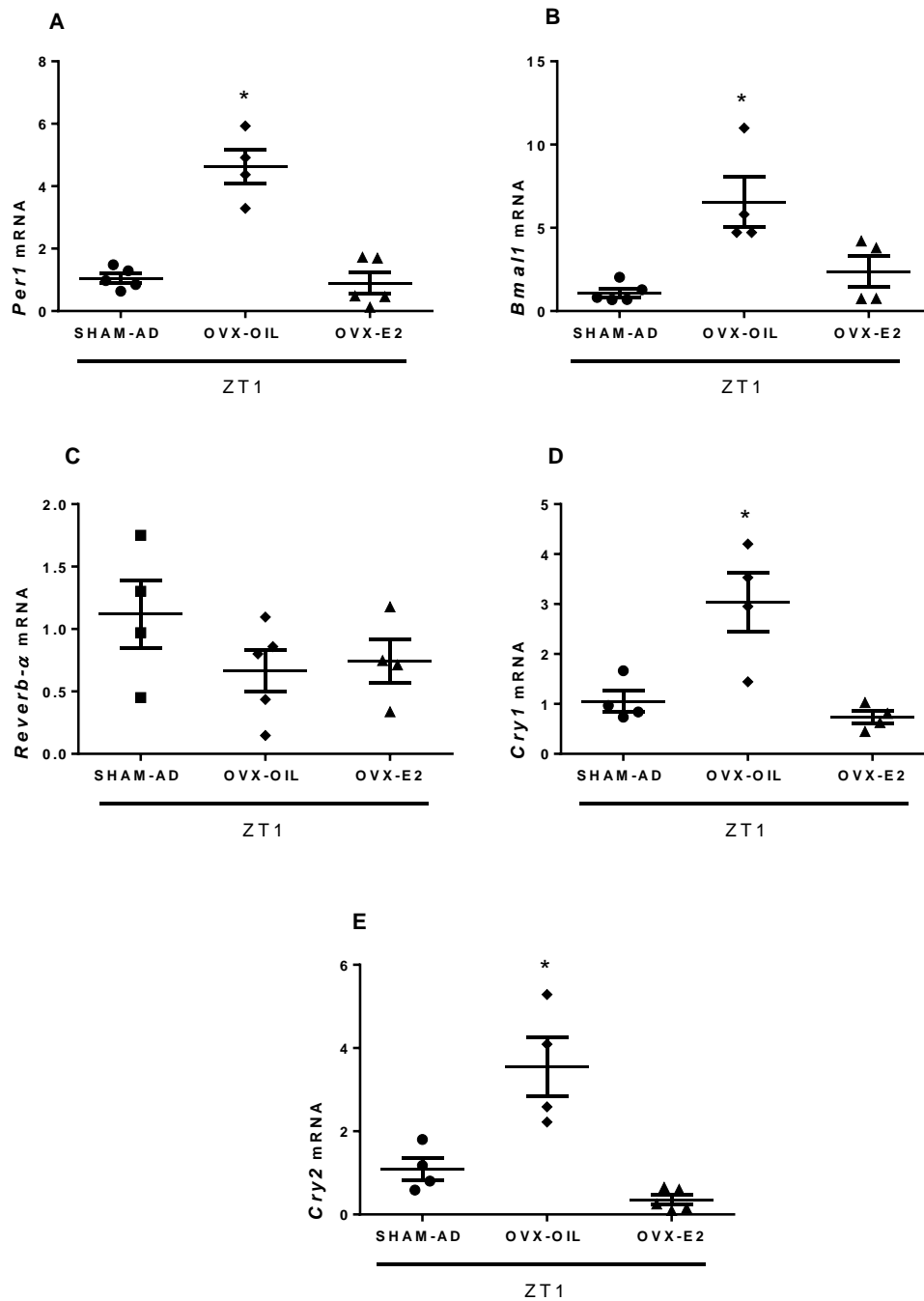


**Figura 15. Teste de tolerância à glicose em ratas NAIVE e ovariectomizadas (OVX) em regime alimentar *ad libitum* (AD) realizado às 8:00 (ZT1) e às 20:00 (ZT13).** Dados são expressos em média  $\pm$ SEM. ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida de Bonferroni #  $p < 0,05$  vs tempo 0 nos grupos NAIVE ZT1 e ZT13. @  $p < 0,05$  vs tempo 0 nos grupos OVX ZT1 e ZT13. \$  $p < 0,05$  para NAIVE vs OVX (Painéis A e C). Área sob a curva (AUC), Test T de Student (Painéis B e D).



**Figura 16. Teste de tolerância à glicose em ratas ovariectomizadas (OVX) em regime alimentar *ad libitum* (AD) e restrito à fase de luz (TR) realizado às 8:00 (ZT1).** Dados são expressos em média  $\pm$ SEM. ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida de Bonferroni #  $p < 0,05$  vs tempo 0 no grupo OVX-AD. @  $p < 0,05$  vs tempo 0 no grupo OVX-TR. \$  $p < 0,05$  para OVX-AD vs OVX-TR (Painel A). Área sob a curva (AUC), Test T de Student \* $p < 0,05$  para painel B.

A avaliação da expressão dos genes de relógio no fígado de ratas ovariectomizadas tratadas com óleo de milho ou estradiol foi realizada no ZT1, haja visto que a ovariectomia promoveu um aumento na expressão de quatro dos cinco genes de relógio estudados neste ZT, conforme observado no experimento 1 (Figuras 7-11 Painéis A). Em comparação ao grupo SHAM-AD, a ovariectomia (OVX-OIL) promoveu um aumento na expressão de *Per1*, *Bmal1* e *Cry1* e *Cry2* (**Figura 17 A, B, D e E**). O tratamento com cipionato de estradiol foi capaz de reduzir a expressão destes genes a valores semelhantes aos observados no grupo SHAM-AD (**Figura 17 A, B, D e E**). A ovariectomia ou o tratamento com estradiol não interferiram na expressão de *Reverb- $\alpha$*  (**Figura 17 C**).



**Figura 17. Expressão de genes de relógio em ratas SHAM e ovariectomizadas (OVX) tratadas com óleo e estradiol.** Dados são expressos em média  $\pm$ SEM. (n=4-5). ANOVA de uma via seguida de Tukey. Efeito do tratamento com óleo (OVX-OIL) ou estradiol (OVX-E2) sobre a expressão dos genes: *Per1* (Painel A), *Bmal1* (Painel B), *Revorb- $\alpha$*  (Painel C), *Cry1* (Painel D) e *Cry2* (Painel E). \* $p < 0,05$  vs SHAM-AD e OVX-E2.

## 8. DISCUSSÃO

A alimentação tem sido descrita na literatura como uma pista importante para a sincronização do relógio hepático (Damiola et al., 2000; Stokkan et al., 2001), no entanto, até o momento não temos conhecimento de estudos que relacionem a alimentação em horário restrito com o relógio hepático de fêmeas.

Em machos, a alimentação restrita à fase de luz, que corresponde ao período de inatividade, promove um arraste de até 12 horas na expressão dos genes de relógio no fígado (Damiola et al., 2000; Mukherji et al., 2015; Stokkan et al., 2001). O arraste é caracterizado pela sincronização autossustentada de um oscilador a um sinal, afim de ajustar sua fase às condições do ambiente (A. C. Liu et al., 2007). Isso significa que no caso da alimentação em tempo restrito, o perfil de expressão dos genes de relógio se altera com os picos de expressão acontecendo, por exemplo, de maneira antecipada. Em fêmeas, a expressão dos genes de relógio tanto no fígado quanto em outros tecidos, varia de acordo com o ciclo estral devido as oscilações nas concentrações circulantes de hormônios ovarianos (Nakamura et al., 2010). Tendo em vista que os hormônios ovarianos estão relacionados com metabolismo energético e ingestão alimentar (Geary & Asarian, 2006; Pantaleão et al., 2010; Witte et al., 2010), processos diretamente relacionados ao controle do ganho de peso, estudamos se os mesmos exerceriam alguma influência na resposta do relógio hepático à alimentação em horário restrito e se alterariam a expressão hepática dos genes de relógio em animais em regime alimentar *ad libitum*. No presente estudo, demonstramos pela primeira vez, que a ovariectomia alterou a expressão dos genes de relógio no fígado e que os hormônios ovarianos não interferiram na resposta do relógio hepático à alimentação em tempo restrito à fase de luz.

Em nosso trabalho, o perfil de expressão de *Per1* de animais SHAM-AD foi caracterizado por um pico no ZT12 enquanto que as expressões de *Bmal1* e *Cry1* tiveram um pico claro de expressão no ZT1. Esses achados vão de encontro aos observados em machos (Opperhuizen et al., 2016). Já a maior expressão de *Cry2* das fêmeas ocorreu no ZT1 diferentemente dos machos, em que o pico ocorre próximo ao ZT10 (Opperhuizen et al., 2016). Portanto, parece existir diferenças no perfil temporal de expressão dos genes de relógio entre machos e fêmeas. Para avaliar se hormônios ovarianos contribuem para estas diferenças, estudamos o perfil temporal de expressão destes genes após a

ovariectomia. A ovariectomia promoveu, em relação ao grupo SHAM-AD, um aumento na expressão dos genes *Per1*, *Bmal1*, *Cry1* e *Cry2* no ZT1. Este efeito foi revertido pelo tratamento agudo de reposição de estradiol. Assim, em comparação às ratas OVX+Óleo, ratas OVX+E2 apresentaram valores similares ao grupo SHAM-AD na expressão de *Per1*, *Bmal1*, *Cry1* e *Cry2* no ZT1. Por outro lado, o tratamento com estradiol não alterou a expressão do gene *Reverb- $\alpha$* . Semelhante ao observado em nosso trabalho, as concentrações plasmáticas de estradiol parecem mesmo ser importantes para a manutenção do perfil temporal dos genes de relógio no fígado. Estudos com explantes de fígado de ratas transgênicas que expressam o promotor do gene *Per1* sob controle da enzima luciferase mostraram um atraso na fase média da atividade transcricional de *Per1* em ratas ovariectomizadas (ZT0) em comparação ao proestro (ZT17) e estro (ZT18), bem como variações nos horários médios de expressão de *Per1* nas diferentes fases do ciclo estral (Murphy et al., 2013). No mesmo sentido, um outro estudo com ratas demonstrou que a amplitude de expressão de *Per1* no fígado foi menor no estro em comparação às outras fases do ciclo estral e que o horário de pico de expressão de *Bmal1* foi alterado entre o proestro e o diestro (Nakamura et al., 2010). Nossos dados, em conjunto com a literatura, apontam um papel decisivo do estradiol para a manutenção da expressão dos genes *Per1*, *Bmal1*, *Cry1* e *Cry2* no fígado de ratas. Esse efeito do estradiol mostrou-se ser horário do dia específico, além de ser gene-específico, uma vez que a expressão de *Reverb- $\alpha$*  não foi modificada pela ovariectomia nem pelo tratamento com estradiol neste horário. Por outro lado, a expressão de *Reverb- $\alpha$*  foi reduzida pela ovariectomia no ZT6. Não analisamos se o tratamento com estradiol é capaz de reverter esta resposta, contudo o tratamento com estradiol não alterou a expressão deste gene no ZT1, favorecendo a conclusão de que o estradiol seja, de fato, importante para a manutenção da maquinaria do relógio no fígado e que seu efeito depende do horário do dia.

O estradiol parece ser determinante para a expressão dos genes de relógio não só no fígado. Em ratas ovariectomizadas o tratamento com estradiol aumenta a expressão de *Cry1* e *Cry2* no córtex cerebral no ZT6 e reduz no núcleo supraquiasmático no ZT18 (Nakamura et al., 2001). No ZT19, a expressão de *Bmal1* e *Cry1* no tecido adiposo inguinal de camundongos ovariectomizadas é maior do que naquelas ovariectomizadas e tratadas com

estradiol. Já no tecido adiposo perigonadal, a expressão de *Per2* é maior no grupo tratado com estradiol no ZT13 (Zhu et al., 2015).

A alimentação em tempo restrito aboliu os picos de expressão dos genes *Per1*, *Bmal1*, *Reverb- $\alpha$* , *Cry1* e *Cry2* tanto no grupo SHAM quanto no grupo OVX. Para o *Reverb- $\alpha$*  em ambos os grupos, OVX-AD e SHAM-AD, a alimentação TR além de abolir o pico de expressão, ocorrido no ZT6, ocasionou um aumento de expressão no ZT18. Como os efeitos da TR foram os mesmos tanto no grupo SHAM quanto no OVX, conclui-se que os hormônios ovarianos não interferiram nessa resposta. Por outro lado, o fenótipo da resposta do relógio hepático à alimentação de fêmeas foi diferente daquele observado em machos, nos quais a alimentação TR impõe novos horários de pico de expressão ou mesmo uma inversão de perfil para genes como *Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Reverb- $\alpha$* , *Cry2* e *Dbp* (Bray et al., 2013; Hara et al., 2001; Satoh et al., 2006). Embora os hormônios ovarianos não tenham participação na resposta do relógio hepático à alimentação TR, nossos dados somados à literatura, apontam claramente uma diferença entre machos e fêmeas.

Demonstramos que a alimentação TR abole o pico de expressão hepática de *Per1* das ratas SHAM-AD e OVX-AD no ZT12. Este efeito foi semelhante ao observado em ratos e camundongos machos mesmo quando submetidos a diferentes protocolos no que se refere a tempo em horas de restrição alimentar (Opperhuizen et al., 2016; Satoh et al., 2006). Assim, tanto machos quanto fêmeas perdem o pico de expressão de *Per1* no ZT12 após a exposição à alimentação TR.

Nas ratas deste estudo, o pico de expressão de *Bmal1* nos animais SHAM-AD e OVX-AD foi observado no ZT1 e a alimentação em tempo restrito aboliu esse pico tanto nos animais SHAM quanto nos OVX. Essa redução de expressão ocasionou uma perda da variação temporal no grupo SHAM-TR, porém no grupo OVX-TR a expressão de *Bmal1* foi diferente entre os ZT1 e ZT12. De maneira parecida, em ratos machos sob regime alimentar *ad libitum*, o pico de *Bmal1* ocorre no ZT0 enquanto que para os animais alimentados durante a fase de luz, próximo ao ZT18 (Opperhuizen et al., 2016; Reznick et al., 2013). Do mesmo modo, em camundongos machos, a expressão de *Bmal1* do grupo alimentado durante a noite se mostrou aumentada no ZT1 e reduzida no grupo alimentado durante o dia (Ando et al., 2016; Yasumoto et al., 2016). A alimentação em tempo

restrito à fase de luz impacta, portanto, de maneira semelhante a expressão de *Bmal1* em machos e fêmeas no ZT1.

A expressão do gene *Reverb-α* das ratas SHAM-TR e OVX-TR foi reduzida nos ZT6 e ZT12 e aumentada no ZT18. A redução da expressão no ZT6 também foi observada em camundongos machos (Damiola et al., 2000; Yasumoto et al., 2016), o que sugere que a alimentação TR afeta a expressão de *Reverb-α* de machos e fêmeas, temporalmente, da mesma maneira.

No fígado das ratas, os genes *Cry1* e *Cry2* foram igualmente afetados pela alimentação TR que extinguiu o pico de expressão observado no ZT1 tanto no grupo SHAM quanto no OVX. A literatura aponta que a alimentação restrita à fase de luz em camundongos reduz a expressão hepática de *Cry1* no ZT1 e aumenta no ZT12 (Ando et al., 2016). Assim, nossos achados juntamente com os dados da literatura apontam que o perfil de expressão do gene *Cry1* frente à alimentação TR foi igualmente afetado no ZT1 entre machos e fêmeas. É importante salientar que, ainda que a alimentação TR tenha ocasionado alterações na expressão dos genes de relógio em horários semelhantes em machos e fêmeas, o impacto da alimentação TR no perfil de expressão dos genes de relógio entre machos e fêmeas foi diferente. Observamos em nosso estudo que a alimentação TR ocasionou, predominantemente, a abolição do pico de expressão dos genes. Já nos machos, a literatura demonstra que os genes *Bmal1*, *Cry1* e *Reverb-α* respondem à alimentação TR com mudanças nos horários de pico bem como com redução ou aumento de expressão nos diferentes ZTs. Fica clara, portanto, uma diferença sexual na resposta de sincronização hepática ao horário da alimentação.

No presente estudo, as ratas OVX-AD ganharam mais peso e tiveram maior ingestão alimentar em comparação às ratas SHAM-AD devido à redução das concentrações circulantes de estradiol. Já está bem estabelecido que os esteroides ovarianos participam de maneira importante na regulação do metabolismo energético e da ingestão alimentar, com repercussões na composição corporal e no ganho de peso (Butera, 2010; Eckel, 2000). Modelos de ovariectomia seguidos de reposição hormonal de estrógenos são capazes de reduzir o ganho de peso e adiposidade provenientes das quedas das concentrações plasmáticas de estradiol, o que sugere que esse hormônio seja, de fato, um dos responsáveis pelo controle do metabolismo energético (Asarian

& Geary, 2002)(López & Tena-Sempere, 2015) (Santollo & Eckel, 2008). Em humanos existem diferenças sexuais no padrão de acúmulo de gordura, com mulheres apresentando maior adiposidade subcutânea e homens, maior adiposidade visceral. Na menopausa, a redução das concentrações circulantes de estradiol contribui para uma redistribuição de gordura, com aumento de depósito visceral, que predispõe para doenças metabólicas (Jensen, 2008; Lovejoy et al., 2008; Toth et al., 2000). O estradiol atua de maneira importante em sítios hipotalâmicos relacionados com metabolismo energético e ingestão alimentar (Hart-Unger & Korach, 2011). Ele é capaz de promover uma redução da ingestão alimentar por meio da ação dos receptores de estrógeno do tipo alfa (ER $\alpha$ ) em neurônios POMC do núcleo arqueado e ao reduzir o RNA mensageiro e atividade do receptor do neuropeptídeo Y (NPY) que possui atividade orexígena (Obici, 2009; Xu et al., 2011). Assim, o ganho de peso e aumento de consumo alimentar observados nas ratas OVX-AD em nosso trabalho, podem ser justificados pela redução das concentrações plasmáticas de estradiol.

Observou-se que as ratas SHAM-AD apresentaram um maior consumo alimentar na fase de escuridão quando comparado à fase de luz, padrão alimentar que não foi alterado pela ovariectomia. Dessa forma, a ingestão alimentar das ratas OVX-AD não foi diferente daquela apresentada pelas ratas SHAM-AD. Esse achado é diferente do observado por outro grupo, cujos experimentos demonstram um efeito da ovariectomia em aumentar a ingestão alimentar somente durante a fase de luz em ratas da linhagem *Fisher* (Varma et al., 1999). Nossos resultados apontam que a ovariectomia, ao ocasionar um aumento da ingestão alimentar, ainda que na fase de escuridão, quando o horário da alimentação se alinha ao horário de atividade dos animais, é capaz de promover um aumento no ganho de peso.

O efeito da ovariectomia que observamos sobre o ganho de peso pode ser fortemente atribuído à diminuição da ingestão alimentar, uma vez que ratas ovariectomizadas que ingerem as mesmas quantidades de ração que as ratas com ovários intactos (*OVX-pair-feeding*), ganham peso de maneira semelhante às ratas intactas (Shimomura et al., 1989). Por outro lado, ratas *OVX-pair-feeding* alimentadas durante a fase de luz, apresentam maior ganho de peso corporal do que ratas com ovários intactos (Shimomura et al., 1989). Este efeito, embora apresentado de forma mais tardia (56 dias após o início do protocolo) também é



observado em ratas *OVX-pair-feeding* quando a oferta alimentar ocorre durante a fase de escuridão (Shimomura et al., 1989), indicando que tanto uma redução da ingestão alimentar quanto o horário da oferta de alimento podem contribuir para um menor ganho de peso corporal em ratas *OVX*.

Um outro aspecto a se considerar é o de que a ovariectomia pode promover um ganho de peso secundário a outros fatores que não só o aumento da ingestão alimentar, haja visto que um outro estudo demonstrou que ratas ovariectomizadas, mesmo tendo acesso a mesma quantidade de ração que as ratas com ovários intactos, ganham mais peso. Esse ganho de peso, todavia, é menor do que o apresentado por ratas ovariectomizadas em regime alimentar *ad libitum* (Kitson et al., 2015). Também em camundongas, a *OVX* promove aumento de adiposidade e diminuição do gasto energético sem, contudo, influenciar a ingestão calórica (Rogers et al., 2009).

No que se refere aos efeitos da alimentação *TR*, tanto ratas *SHAM* quanto *OVX* apresentaram menor consumo alimentar quando comparados àquelas em regime *AD*. Devido a essa ingestão reduzida, tanto ratas *SHAM* quanto *OVX* ganharam menos peso corporal durante o protocolo *TR*. Dessa forma, os hormônios ovarianos não interferiram com a redução do ganho de peso corporal induzido pela *TR* em ratas.

Por outro lado, parece haver diferenças sexuais na resposta induzida pela *TR* sobre o ganho de peso corporal e ingestão alimentar. Em machos, a alimentação durante a fase de luz promove redução da ingestão alimentar, similar aos nossos achados em fêmeas, contudo, foram observados tanto ganho de peso corporal (Oishi & Hashimoto, 2018; Ramirez-Plascencia et al., 2017) ou nenhuma alteração do mesmo acompanhado de um aumento de adiposidade (Oppenhuizen et al., 2016), o que sugere alterações metabólicas induzidas pelo horário da alimentação, que não dependem da ingestão alimentar. Isso fica claro, ao compararmos o efeito da alimentação com dieta padrão ofertada na fase de luz ou na fase de escuridão em ratos. Ratos alimentados durante a fase de luz apresentam maior adiposidade do que aqueles alimentados durante a fase de escuridão apesar de uma ingestão alimentar exatamente igual em quantidade e calorias entre as fases (Reznick et al., 2013). Esse dado reforça que não só a dieta, mas também o horário no qual a mesma é ofertada, interfere na resposta metabólica.

Tendo em vista um aumento no ganho de peso e no consumo alimentar apresentados pelas ratas ovariectomizadas e pelos efeitos da alimentação TR em reduzir esses parâmetros, avaliamos os efeitos tanto da ovariectomia quanto da alimentação TR sobre as concentrações circulantes de leptina no início da fase de luz (ZT1) e no início da fase de escuridão (ZT12).

A leptina é um hormônio relacionado com a saciedade e sua secreção varia de acordo com a massa de tecido adiposo e estado alimentar. Quando administrada periféricamente, ela promove redução da ingestão alimentar (Maffei et al., 1995). No presente trabalho, as concentrações plasmáticas de leptina das ratas SHAM-AD apresentaram uma redução no ZT12 em relação ao ZT1. Essa variação foi perdida nos demais grupos (SHAM-TR, OVX-AD e OVX-TR), indicando que tanto a depleção dos hormônios ovarianos quanto o horário da alimentação parecem ser importantes para a manutenção da variação temporal deste hormônio. De fato, já foi demonstrado que a leptina possui um padrão circadiano de secreção, sendo que, em roedores seu pico acontece tardiamente durante a fase de escuridão tanto em machos quanto em fêmeas (Ahrén, 2000; Landt et al., 1998; Saladin et al., 1995). Além disso, situações de jejum prologado abolem seu ritmo diário de secreção (Elimam & Marcus, 2002). Em nosso trabalho, apesar da escassez de horários nos quais concentrações plasmáticas de leptina foram dosadas, observamos que no grupo SHAM-AD, estas concentrações estiveram mais elevadas no ZT1, ou seja, logo após findar o período de maior ingestão, quando comparados ao ZT12, que marca o final da fase de repouso onde se observou menor ingestão alimentar. Já a remoção dos ovários resultou na perda dessa variação temporal. A partir destes resultados, aventamos a hipótese de que os hormônios ovarianos funcionem como um possível sinalizador para o relógio biológico com o objetivo de manter a secreção circadiana de leptina. De fato, a ovariectomia foi capaz de anular a variação temporal de secreção de leptina. Interessantemente, um estudo demonstrou que as concentrações plasmáticas de leptina perdem a variação circadiana em macacas na peri e pós menopausa, diferentemente dos machos velhos que mantêm oscilações no ritmo de leptina (Downs & Urbanski, 2006). Nossos resultados, somado a estas observações em macacos, indicam que os hormônios ovarianos são necessários para a manutenção da oscilação circadiana de secreção de leptina.

Outro dado importante é o de que as concentrações circulantes de leptina estão intimamente relacionadas com a ingestão alimentar de modo que, em humanos, um arraste de 5 horas no horário da alimentação promove, também, um arraste alterações no horário de aumento nas concentrações plasmáticas de leptina (Schoeller et al., 1997). Essa relação também é observada em camundongos com acesso à ração por 4 horas durante a fase de luz. Nesse protocolo, as concentrações circulantes de leptina apresentam um pico uma hora após a retirada da ração, coincidindo com o término da alimentação (Ahima et al., 1998). Nesse sentido, ao avaliarmos as concentrações séricas de leptina nos ZT1 e ZT12 das ratas em alimentação TR, esperávamos que ocorresse um arraste na secreção de leptina, o que significaria valores reduzidos no ZT1 em resposta às várias horas de jejum e valores mais elevados no ZT12 como consequência da ingestão alimentar durante a fase de luz. Todavia, o que observamos foi que a alimentação TR, tanto no grupo SHAM quanto OVX, ocasionou uma perda nesse padrão de secreção entre os dois horários estudados. Nossos achados são contrários ao observado em machos, onde animais com dieta padrão em regime *ad libitum* não apresentam oscilações nos valores de leptina no decorrer das 24 horas (Opperhuizen et al., 2016; Reznick et al., 2013) e ratos expostos à alimentação restrita à fase de luz, apresentam oscilações nas concentrações circulantes de leptina, estando as mesmas elevadas no final da fase de luz, no ZT9, e reduzidas no final da fase de escuridão (Opperhuizen et al., 2016). Embora nosso estudo não tenha mostrado um efeito da ovariectomia sobre a alteração da secreção promovida pela TR, os resultados encontrados em conjunto com os da literatura, apontam para uma diferença sexual nos efeitos da alimentação TR sobre as concentrações circulantes de leptina.

No que se refere ao metabolismo glicídico, sabe-se da importância do fígado como um órgão de controle glicêmico já que participa do balanço da quantidade de glicose que entra e que é removida da circulação (la Fleur et al., 2001). Os estrógenos, por sua vez, tem como um dos seus efeitos sobre o metabolismo, a redução da gliconeogênese e um aumento da síntese de glicogênio hepático, medidas que resultam em redução da glicose sanguínea (Bryzgalova et al., 2006). Já foi reportado que a atividade transcricional de ER- $\alpha$  no fígado varia durante o ciclo estral, sendo mais elevada durante o proestro

devido às concentrações circulantes aumentadas de estrógenos (Ciana et al., 2003) e ainda, que as concentrações sanguíneas de glicose oscilam de maneira circadiana (Poggiogalle et al., 2018). Nesse contexto, avaliamos a resposta de ratas NAIVE, ou seja, anteriormente às cirurgias SHAM e de ratas ovariectomizadas ao teste de tolerância à glicose (ipTTG) em dois horários, no ZT1 e ZT13. As ratas NAIVE apresentaram uma melhor resposta ao teste de tolerância à glicose quando desafiadas no ZT13 em comparação ao ZT1 conforme menores valores de área sob a curva no ZT13. Esse resultado é similar ao observado em ratos machos que apresentam menor incremento nos valores glicêmicos quando submetidos a um teste de tolerância à glicose no ZT14, início da fase escura, em relação ao ZT2 (la Fleur et al., 2001). Quando submetemos as ratas ovariectomizadas, ao ipTTG, todavia, elas apresentaram a mesma resposta nos dois ZTs, o que resultou na perda da diferença temporal. Comparamos, também, as respostas das ratas NAIVE e das ovariectomizadas ao ipTTG nos dois horários. Não houve diferença entre os grupos no ZT1, contudo, no ZT13 os animais OVX apresentaram uma pior resposta, com maior área sob a curva.

Na mesma direção de nossos achados, os estudos apontam que a ovariectomia em ratas promove aumento dos valores glicêmicos de jejum que está relacionado à resistência à insulina (Rogers et al., 2009; Weigt et al., 2015) e que camundongas ovariectomizadas e submetidos à dieta rica em gordura também demonstram piora na resposta ao ipTTG (Stubbins et al., 2012). Além disso, a reposição de estradiol favorece a sensibilidade à insulina devido a melhora em mecanismos de translocação de GLUT4 (Kawakami et al., 2018). Assim, nossos dados em conjunto com a literatura demonstram uma contribuição dos hormônios ovarianos para um adequado metabolismo da glicose.

Tendo em vista que em ratos o jejum durante a fase de inatividade pode prevenir a obesidade e a resistência à insulina (Chaix et al., 2014; Eckel-Mahan et al., 2013) e que no estudo em questão as ratas submetidas ao protocolo de TR alimentaram-se durante a fase de inatividade, realizamos um outro teste de tolerância à glicose para averiguar se esse parâmetro metabólico estaria alterado ao final dos 21 dias de alimentação TR. Com objetivo de respeitar o jejum imposto pelo protocolo de alimentação TR, o TTG foi realizado no ZT1 e observou-se que ratas OVX-TR apresentaram uma pior resposta ao teste em

relação às ratas OVX-AD. Essa piora da resposta no grupo com alimentação TR pode ser justificada por um possível desajuste metabólico em consequência da ingestão do alimento em horário considerado inadequado, já que os estudos indicam que indivíduos que trabalham em turnos ou animais submetidos a protocolos de trabalho diurno ou exposição à alimentação durante a fase de luz apresentam maiores chances de desenvolver ganho de peso, dessincronização do relógio periférico e resistência à insulina (Arble et al., 2009; Fonken et al., 2010; Manoogian & Panda, 2017; R. Salgado-Delgado et al., 2008). Além da piora no ipTTG, observamos em nosso trabalho que a alimentação TR alterou a expressão hepática de genes de relógio. Essas alterações podem se relacionar com a piora na resposta ao ipTTG porque a literatura aponta uma importante participação do relógio hepático no controle glicêmico. Um estudo demonstrou que valores de RNAm aumentados de *Cry1* no fígado na transição da fase de escuridão para a fase de luz estão relacionados com uma inibição das ações estimulatórias do glucagon sobre a gliconeogênese de modo que a super expressão de *Cry1* em animais *db/db* (deficientes de receptor de leptina) proporciona uma redução da glicemia de jejum e melhora da sensibilidade à insulina (E. E. Zhang et al., 2010). Além disso, animais nocautes para *Bmal1* no fígado não apresentam um aumento típico na glicemia de jejum no início da fase de atividade, o que é acompanhado de uma perturbação da expressão rítmica do transportador hepático de glicose, GLUT2 (Ando et al., 2016).

Em virtude das diferentes respostas ao ipTTG e da perda da secreção temporal de leptina impostos tanto pela ovariectomia quanto pela alimentação TR, avaliamos a expressão dos genes *Ppar- $\alpha$*  e *TRB-3* relacionados, respectivamente, com o metabolismo lipídico e glicídico do fígado (Du et al., 2003; Koo et al., 2004; Trefts et al., 2017).

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa (*Ppar- $\alpha$* ) são receptores nucleares conhecidos como moduladores centrais da transição do estado alimentado para o jejum pois induzem a oxidação lipídica pra ser usada como substrato energético no estado de jejum, quando estimulam, também, a gliconeogênese (Kersten, 2014; Preidis et al., 2017). Em nossos achados, a expressão do *Ppar- $\alpha$*  foi maior no ZT1 tanto nas ratas SHAM-AD quanto nas SHAM-TR quando comparado ao ZT12. Este padrão foi mantido no grupo OVX-AD e no grupo OVX-TR. Isso significa que restringir o horário da alimentação

não altera a variação de expressão do *Ppar- $\alpha$* , independentemente do estado hormonal. Tendo em vista o efeito protetor dos hormônios ovarianos sobre o metabolismo lipídico evidenciado por um estudo que demonstrou redução na expressão de *Ppar- $\alpha$*  concomitantemente com aumento dos valores hepáticos de triacilglicerol em ratas após 8 semanas de ovariectomia (Paquette et al., 2008), esperávamos, em nosso trabalho, que o perfil de expressão de *Ppar- $\alpha$*  fosse alterado pela ovariectomia, o que não foi confirmado. Ademais, em machos, o *Ppar- $\alpha$*  é um gene de maior expressão diurna em diferentes tecidos, sendo que seu pico de expressão no fígado de animais em regime alimentar *ad libitum* acontece no ZT12 (Yang et al., 2006). Neste sentido, o presente trabalho demonstrou que em fêmeas o perfil temporal de expressão deste gene é diferente dos machos. Além disso, a resposta deste gene no fígado ao horário da alimentação entre machos e fêmeas parece ser diferente, uma vez que ratos submetidos ao protocolo de alimentação restrita à fase de luz mostram um arraste de 12h no pico de expressão de *Ppar- $\alpha$*  quando comparado com a dos animais submetidos à dieta restrita à escuridão (Opperhuizen et al., 2016). A resposta reportada em machos parece ir de encontro com a função metabólica deste fator de transcrição. Sabe-se que agonistas sintéticos de *Ppar- $\alpha$*  são capazes de reduzir os valores de triglicérides (Staels et al., 1998) e a expressão do gene *Ppar- $\alpha$*  está aumentada em camundongos durante o jejum como resposta à necessidade aumentada da oxidação lipídica no fígado nessa condição (Kersten et al., 1999).

A proteína TRB-3 é uma pseudo-quinase da família *tribble*, e quando aumentada, se relacionam a lipotoxicidade presente em doenças como diabetes mellitus do tipo 2 (Ren et al., 2019; Wang et al., 2009). Tal qual a expressão de *Ppar- $\alpha$* , a do gene *TRB-3* também é induzida no fígado pelo jejum, promovendo o aumento da lipólise (Du et al., 2003; Qi et al., 2006). No presente estudo, ratas SHAM-AD apresentaram valores aumentados de RNA m do gene *TRB-3* no ZT1 quando comparado ao ZT12. Foi encontrada a mesma variação temporal de expressão nas ratas nos demais grupos estudados. Dessa forma, nem a dieta em tempo restrito, nem a ovariectomia foram capazes de alterar o padrão de expressão de *TRB-3*. Uma vez que a expressão gênica de *TRB-3* é induzida no fígado pelo jejum, era esperado que a alimentação restrita à fase de luz afetasse a expressão de *TRB-3* no ZT1. No entanto, isso não foi observado. Além disso,

a elevação da expressão de TRB-3 está relacionada com o desenvolvimento de resistência à insulina porque sua super expressão é capaz de aumentar a gliconeogênese (Du et al., 2003; Koo et al., 2004). Assim, esperava-se que no protocolo de alimentação em tempo restrito nas ratas OVX, situação na qual as quantidades de glicose circulantes foram mais elevadas durante o ipTTG do que das ratas *ad libitum*, os valores de expressão desse gene estivessem aumentados, o que também não foi demonstrado. Ademais, haja visto a perda da diferença temporal na resposta ao teste de tolerância à glicose nos animais OVX, esperava-se uma alteração deste fator de transcrição, o que também não foi observado. Assim, a piora da resposta ao ipTTG observada pelos animais OVX-TR não foram mediados por alterações na expressão de *TRB-3*, nem tampouco os valores de RNAm do gene *Ppar- $\alpha$*  responderam às alterações hormonais e à nova rotina alimentar.

## 9. CONCLUSÃO

Os hormônios ovarianos não influenciam a resposta do relógio hepático à alimentação em horário restrito uma vez que as alterações ocasionadas pela TR foram similares nas ratas SHAM e OVX. Os hormônios ovarianos, no entanto, mais precisamente o estradiol, parecem contribuir para a manutenção dos valores de mRNA dos genes de relógio do fígado de forma horário-do-dia específico, uma vez que a ovariectomia aumentou a expressão dos genes de relógio no ZT1 e a reposição com estradiol reverteu esse aumento. Além disso, os hormônios ovarianos também se mostraram importantes para a homeostase da glicose, uma vez que a ovariectomia aboliu a variação temporal da resposta ao ipTTG e a falta dos hormônios ovarianos somada à alimentação TR levaram a uma menor tolerância à glicose. Estes resultados, em conjunto, contribuem para o entendimento das alterações metabólicas geradas pela diminuição ou ausência dos hormônios ovarianos, como por exemplo, um maior ganho de peso corporal e um comprometimento do metabolismo da glicose observados durante a menopausa.



## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahima, R. S., Prabakaran, D., & Flier, J. S. (1998). Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI11176>
- Ahrén. (2000). Diurnal variation in circulating leptin is dependent on gender, food intake and circulating insulin in mice. *Acta Physiologica Scandinavica*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2000.00746.x>
- Albers, E. E., Gerall, A. A., & Axelson, J. F. (1981). Effect of reproductive state on circadian periodicity in the rat. *Physiology and Behavior*. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90073-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90073-1)
- Ando, H., Ushijima, K., Shimba, S., & Fujimura, A. (2016). Daily fasting blood glucose rhythm in male mice: A role of the circadian clock in the liver. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1376>
- Arble, D. M., Bass, J., Laposky, A. D., Vitaterna, M. H., & Turek, F. W. (2009). Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity*. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.264>
- Asarian, L., & Geary, N. (2002). Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Hormones and Behavior*. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2002.1835>
- Aschoff, J., & Pohl, H. (1978). Phase relations between a circadian rhythm and its zeitgeber within the range of entrainment. *Naturwissenschaften*. <https://doi.org/10.1007/BF00440545>
- Baker, F. C., & Driver, H. S. (2007). Circadian rhythms, sleep, and the menstrual cycle. *Sleep Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2006.09.011>
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schutz, G., & Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.289.5488.2344>
- Björkelund, C., Lissner, L., Andersson, S., Lapidus, L., & Bengtsson, C. (1996). Reproductive history in relation to relative weight and fat distribution. *International Journal of Obesity*. [https://doi.org/10.1016/0378-5122\(96\)81659-8](https://doi.org/10.1016/0378-5122(96)81659-8)
- Blattner, M. S., & Mahoney, M. M. (2012). Circadian parameters are altered in two strains of mice with transgenic modifications of estrogen receptor subtype 1. *Genes, Brain and Behavior*. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00831.x>
- Bray, M. S., Ratcliffe, W. F., Grenett, M. H., Brewer, R. A., Gamble, K. L., & Young, M. E. (2013). Quantitative analysis of light-phase restricted feeding reveals metabolic dyssynchrony in mice. *International Journal of Obesity*. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.137>

- Brockman, R., Bunick, D., & Mahoney, M. M. (2011). Estradiol deficiency during development modulates the expression of circadian and daily rhythms in male and female aromatase knockout mice. *Hormones and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.07.011>
- Bryzgalova, G., Gao, H., Ahren, B., Zierath, J. R., Galuska, D., Steiler, T. L., Dahlman-Wright, K., Nilsson, S., Gustafsson, J. Å., Efendic, S., & Khan, A. (2006). Evidence that oestrogen receptor- $\alpha$  plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: Insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia*. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-0105-3>
- Buijs, R. M., & Kalsbeek, A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/35081582>
- Butera, P. C. (2010). Estradiol and the control of food intake. *Physiology and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.06.010>
- Cagnacci, A., Soldani, R., Laughlin, G. A., & Yen, S. S. C. (1996). Modification of circadian body temperature rhythm during the luteal menstrual phase: Role of melatonin. *Journal of Applied Physiology*. <https://doi.org/10.1152/jappl.1996.80.1.25>
- Canaple, L., Rambaud, J., Dkhissi-Benyahya, O., Rayet, B., Nguan, S. T., Michalik, L., Delaunay, F., Wahli, W., & Laudet, V. (2006). Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock. *Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0052>
- Chaix, A., Zarrinpar, A., Miu, P., & Panda, S. (2014). Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.11.001>
- Chung, H., Chou, W., Sears, D. D., Patterson, R. E., Webster, N. J. G., & Ellies, L. G. (2016). Time-restricted feeding improves insulin resistance and hepatic steatosis in a mouse model of postmenopausal obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.09.006>
- Ciana, P., Ravisicioni, M., Mussi, P., Vegeto, E., Que, I., Parker, M. G., Lowik, C., & Maggi, A. (2003). In vivo imaging of transcriptionally active estrogen receptors. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm809>
- Clegg, D. J., Brown, L. M., Woods, S. C., & Benoit, S. C. (2006). Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1339>
- Damiola, F., Le Minli, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., & Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.183500>
- de Goede, P., Foppen, E., Ritsema, W. I. G. R., Korpel, N. L., Yi, C. X., & Kalsbeek, A. (2019). Time-Restricted Feeding Improves Glucose Tolerance in Rats, but Only When in Line With the Circadian Timing System. *Frontiers*

in *Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00554>

- Downs, J. L., & Urbanski, H. F. (2006). Aging-related sex-dependent loss of the circulating leptin 24-h rhythm in the rhesus monkey. *Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06745>
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R. N., & Montminy, M. (2003). TRB3: A tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1079817>
- Eckel-Mahan, K. L., Patel, V. R., De Mateo, S., Orozco-Solis, R., Ceglia, N. J., Sahar, S., Dilag-Penilla, S. A., Dyar, K. A., Baldi, P., & Sassone-Corsi, P. (2013). Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.034>
- Elimam, A., & Marcus, C. (2002). Meal timing, fasting and glucocorticoids interplay in serum leptin concentrations and diurnal profile. *European Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1470181>
- Elmquist, J. K., Maratos-Flier, E., Saper, C. B., & Flier, J. S. (1998). Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. In *Nature neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/2164>
- Fonken, L. K., Workman, J. L., Walton, J. C., Weil, Z. M., Morris, J. S., Haim, A., & Nelson, R. J. (2010). Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008734107>
- Gambacciani, M., Ciaponi, M., Cappagli, B., Piaggese, L., De Simone, L., Orlandi, R., & Genazzani, A. R. (1997). Body weight, body fat distribution, and hormonal replacement therapy in early postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.2.3735>
- Garaulet, M., Gómez-Abellán, P., Alburquerque-Béjar, J. J., Lee, Y. C., Ordovás, J. M., & Scheer, F. A. J. L. (2013). Timing of food intake predicts weight loss effectiveness. *International Journal of Obesity*. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.229>
- Gavrila, A., Peng, C. K., Chan, J. L., Mietus, J. E., Goldberger, A. L., & Mantzoros, C. S. (2003). Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: Comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021721>
- Geary, N., & Asarian, L. (2006). Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1860>
- Gray, J. M., & Wade, G. N. (1981). Food intake, body weight, and adiposity in female rats: actions and interactions of progestins and antiestrogens. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1981.240.5.e474>
- Hamada, T., LeSauter, J., Venuti, J. M., & Silver, R. (2001). Expression of period

- genes: Rhythmic and nonrhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-19-07742.2001>
- Hara, R., Wan, K., Wakamatsu, H., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M., & Shibata, S. (2001). Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes to Cells*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00419.x>
- Hart-Unger, S., & Korach, K. S. (2011). Estrogens and obesity: Is it all in our heads? In *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.09.003>
- Hatori, M., Vollmers, C., Zarrinpar, A., DiTacchio, L., Bushong, E. A., Gill, S., Leblanc, M., Chaix, A., Joens, M., Fitzpatrick, J. A. J., Ellisman, M. H., & Panda, S. (2012). Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.019>
- Homma, H., Kurachi, H., Nishio, Y., Takeda, T., Yamamoto, T., Adachi, K., Morishige, K. I., Ohmichi, M., Matsuzawa, Y., & Murata, Y. (2000). Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11404>
- Inoue, I., Shinoda, Y., Ikeda, M., Hayashi, K., Kanazawa, K., Nomura, M., Matsunaga, T., Xu, H., Kawai, S., Awata, T., Komoda, T., & Katayama, S. (2005). CLOCK/BMAL1 is involved in lipid metabolism via transactivation of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) response element. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. <https://doi.org/10.5551/jat.12.169>
- Jakubowicz, D., Barnea, M., Wainstein, J., & Froy, O. (2013). High Caloric intake at breakfast vs. dinner differentially influences weight loss of overweight and obese women. *Obesity*. <https://doi.org/10.1002/oby.20460>
- Jamshed, H., Beyl, R. A., Manna, D. L. D., Yang, E. S., Ravussin, E., & Peterson, C. M. (2019). Early time-restricted feeding improves 24-hour glucose levels and affects markers of the circadian clock, aging, and autophagy in humans. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu11061234>
- Jensen, M. D. (2008). Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. In *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1585>
- Kalsbeek, A., Fliers, E., Romijn, J. A., La Fleur, S. E., Wortel, J., Bakker, O., Endert, E., & Buijs, R. M. (2001). The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/endo.142.6.8197>
- Kawakami, M., Yokota-Nakagi, N., Uji, M., Yoshida, K. I., Tazumi, S., Takamata, A., Uchida, Y., & Morimoto, K. (2018). Estrogen replacement enhances insulin-induced as160 activation and improves insulin sensitivity in ovariectomized rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00131.2018>

- Kersten, S. (2014). Integrated physiology and systems biology of PPAR $\alpha$ . In *Molecular Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.02.002>
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., & Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  mediates the adaptive response to fasting. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI6223>
- Kim, S. M., Neuendorff, N., Alaniz, R. C., Sun, Y., Chapkin, R. S., & Earnest, D. J. (2018). Shift work cycle-induced alterations of circadian rhythms potentiate the effects of high-fat diet on inflammation and metabolism. *FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.201700784R>
- Kitson, A. P., Marks, K. A., Aristizabal Henao, J. J., Tupling, A. R., & Stark, K. D. (2015). Prevention of hyperphagia prevents ovariectomy-induced triacylglycerol accumulation in liver, but not plasma. *Nutrition Research*. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.09.013>
- Ko, C. H., & Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. In *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl207>
- Koo, S. H., Satoh, H., Herzig, S., Lee, C. H., Hedrick, S., Kulkarni, R., Evans, R. M., Olefsky, J., & Montminy, M. (2004). PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR- $\alpha$ -dependent induction of TRB-3. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm1044>
- la Fleur, S. E., Kalsbeek, A., Wortel, J., Fekkes, M. L., & Buijs, R. M. (2001). A Daily Rhythm in Glucose Tolerance. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.6.1237>
- Landt, M., Gingerich, R. L., Havel, P. J., Mueller, W. M., Schoner, B., Hale, J. E., & Heiman, M. L. (1998). Radioimmunoassay of rat leptin: Sexual dimorphism reversed from humans. *Clinical Chemistry*. <https://doi.org/10.1093/clinchem/44.3.565>
- Liu, A. C., Lewis, W. G., & Kay, S. A. (2007). Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. In *Nature Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.37>
- Liu, C., Li, S., Liu, T., Borjigin, J., & Lin, J. D. (2007). Transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature05767>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López, M., & Tena-Sempere, M. (2015). Estrogens and the control of energy homeostasis: A brain perspective. In *Trends in Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.06.003>
- Lovejoy, J. C., Champagne, C. M., De Jonge, L., Xie, H., & Smith, S. R. (2008). Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *International Journal of Obesity*.

<https://doi.org/10.1038/ijo.2008.25>

- Lowden, A., Moreno, C., Holmbäck, U., Lennernäs, M., & Tucker, P. (2010). Eating and shift work - Effects on habits, metabolism, and performance. In *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*. <https://doi.org/10.5271/sjweh.2898>
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., Kern, P. A., & Friedman, J. M. (1995). Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm1195-1155>
- Manoogian, E. N. C., & Panda, S. (2017). Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging. In *Ageing Research Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.12.006>
- 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., Jebailey, L., Wang, X., Takahashi, J. S., & Bass, J. (2010). Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature09253>
- Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D. J., & Hevener, A. L. (2013). The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. In *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1055>
- Moore, R. Y., & Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90054-6)
- Morin, L. P., & Fleming, A. S. (1978). Variation of food intake and body weight with estrous cycle, ovariectomy, and estradiol benzoate treatment in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. <https://doi.org/10.1037/h0077435>
- Mühlbauer, E., Gross, E., Labucay, K., Wolgast, S., & Peschke, E. (2009). Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.01.029>
- Mukherji, A., Kobiita, A., & Chambon, P. (2015). Shifting the feeding of mice to the rest phase creates metabolic alterations, which, on their own, shift the peripheral circadian clocks by 12 hours. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519735112>
- Murphy, Z. C., Pezuk, P., Menaker, M., & Sellix, M. T. (2013). Effects of Ovarian Hormones on Internal Circadian Organization in Rats<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.109322>
- Nakamura, T. J., Sellix, M. T., Kudo, T., Nakao, N., Yoshimura, T., Ebihara, S., Colwell, C. S., & Block, G. D. (2010). Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues: Effects of fluctuating ovarian steroid

- hormone levels. *Steroids*. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.01.007>
- Nakamura, T. J., Shinohara, K., Funabashi, T., & Kimura, F. (2001). Effect of estrogen on the expression of Cry1 and Cry2 mRNAs in the suprachiasmatic nucleus of female rats. *Neuroscience Research*. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(01\)00285-1](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(01)00285-1)
- Obici, S. (2009). Minireview: Molecular targets for obesity therapy in the brain. In *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0409>
- Ogawa, S., Chan, J., Gustafsson, J. Å., Korach, K. S., & Pfaff, D. W. (2003). Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor  $\alpha$ : Specificity for the type of activity. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220519>
- Opperhuizen, A. L., Wang, D., Foppen, E., Jansen, R., Boudzovitch-Surovtseva, O., de Vries, J., Fliers, E., & Kalsbeek, A. (2016). Feeding during the resting phase causes profound changes in physiology and desynchronization between liver and muscle rhythms of rats. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/ejn.13377>
- Palmisano, B. T., Stafford, J. M., & Pendergast, J. S. (2017). High-Fat feeding does not disrupt daily rhythms in female mice because of protection by ovarian hormones. *Frontiers in Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00044>
- 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. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00722-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00722-5)
- Pantaleão, T. U., Mousovich, F., Rosenthal, D., Padrón, Á. S., Carvalho, D. P., & Costa, V. M. C. Da. (2010). Effect of serum estradiol and leptin levels on thyroid function, food intake and body weight gain in female Wistar rats. *Steroids*. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.03.009>
- Paquette, A., Wang, D., Jankowski, M., Gutkowska, J., & Lavoie, J. M. (2008). Effects of ovariectomy on PPAR $\alpha$ , SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver. *Menopause*. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e31817b8159>
- Parsons, M. J., Moffitt, T. E., Gregory, A. M., Goldman-Mellor, S., Nolan, P. M., Poulton, R., & Caspi, A. (2015). Social jetlag, obesity and metabolic disorder: Investigation in a cohort study. *International Journal of Obesity*. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.201>
- Peschke, E., & Peschke, D. (1998). Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia*. <https://doi.org/10.1007/s001250051034>
- Petersen, S. (1976). The temporal pattern of feeding over the oestrous cycle of the mouse. *Animal Behaviour*. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(76\)80023-1](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(76)80023-1)
- Pittendrigh, C. S. (1993). Temporal Organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Annual Review of Physiology*.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ph.55.030193.000313>

- Poggiogalle, E., Jamshed, H., & Peterson, C. M. (2018). Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans. *Metabolism: Clinical and Experimental*. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.017>
- Portaluppi, F., Vergnani, L., Manfredini, R., & Fersini, C. (1996). Endocrine mechanisms of blood pressure rhythms. *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb26711.x>
- Preidis, G. A., Kim, K. H., & Moore, D. D. (2017). Nutrient-sensing nuclear receptors PPAR $\alpha$  and FXR control liver energy balance. In *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI88893>
- Qi, L., Heredia, J. E., Altarejos, J. Y., Sreaton, R., Goebel, N., Niessen, S., MacLeod, I. X., Liew, C. W., Kulkarni, R. N., Bain, J., Newgard, C., Welson, M., Evans, R. M., Yates, J., & Montminy, M. (2006). TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COF1 to lipid metabolism. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1123374>
- Rabinowitz, L. (1996). Aldosterone and potassium homeostasis. *Kidney International*. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.258>
- Rebouças, E. C. C., Leal, S., & Sá, S. I. (2016). Regulation of NPY and  $\alpha$ -MSH expression by estradiol in the arcuate nucleus of Wistar female rats: a stereological study. *Neurological Research*. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1203124>
- Reinke, H., & Asher, G. (2016). Circadian Clock Control of Liver Metabolic Functions. In *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.11.043>
- Ren, X., Chen, N., Chen, Y., Liu, W., & Hu, Y. (2019). TRB3 stimulates SIRT1 degradation and induces insulin resistance by lipotoxicity via COP1. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.05.009>
- Reznick, J., Preston, E., Wilks, D. L., Beale, S. M., Turner, N., & Cooney, G. J. (2013). Altered feeding differentially regulates circadian rhythms and energy metabolism in liver and muscle of rats. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.08.010>
- Ribas, V., Nguyen, M. T. A., Henstridge, D. C., Nguyen, A. K., Beaven, S. W., Watt, M. J., & Hevener, A. L. (2010). Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ER $\alpha$ -deficient mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00504.2009>
- Rocha, M., Bing, C., Williams, G., & Puerta, M. (2004). Physiologic estradiol levels enhance hypothalamic expression of the long form of the leptin receptor in intact rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2004.01.003>
- Roenneberg, T., & Merrow, M. (2002). Life before the clock: Modeling circadian evolution. *Journal of Biological Rhythms*. <https://doi.org/10.1177/0748730402238231>
- Roepke, T. A. (2009). Oestrogen modulates hypothalamic control of energy



- homeostasis through multiple mechanisms. In *Journal of Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01814.x>
- Rogers, N. H., Li, J. W. P., Strissel, K. J., Obin, M. S., & Greenberg, A. S. (2009). Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1405>
- Royston, S. E., Yasui, N., Kondilis, A. G., Lord, S. V., Katzenellenbogen, J. A., & Mahoney, M. M. (2014). ESR1 and ESR2 differentially regulate daily and circadian activity rhythms in female mice. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1101>
- Rudic, R. D., McNamara, P., Curtis, A. M., Boston, R. C., Panda, S., Hogenesch, J. B., & FitzGerald, G. A. (2004). BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020377>
- Saladin, R., De Vos, P., Guerre-Millot, M., Leturque, A., Girard, J., Staels, B., & Auwerx, J. (1995). Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. In *Nature*. <https://doi.org/10.1038/377527a0>
- Salgado-Delgado, R., Ángeles-Castellanos, M., Buijs, M. R., & Escobar, C. (2008). Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.03.066>
- Salgado-Delgado, R. C., Saderi, N., Basualdo, M. del C., Guerrero-Vargas, N. N., Escobar, C., & Buijs, R. M. (2013). Shift Work or Food Intake during the Rest Phase Promotes Metabolic Disruption and Desynchrony of Liver Genes in Male Rats. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060052>
- Sancar, G., & Brunner, M. (2014). Circadian clocks and energy metabolism. In *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1574-7>
- Santollo, J., & Daniels, D. (2015). Multiple estrogen receptor subtypes influence ingestive behavior in female rodents. In *Physiology and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.05.032>
- Santollo, J., & Eckel, L. A. (2008). Estradiol decreases the orexigenic effect of neuropeptide Y, but not agouti-related protein, in ovariectomized rats. *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.019>
- Satoh, Y., Kawai, H., Kudo, N., Kawashima, Y., & Mitsumoto, A. (2006). Time-restricted feeding entrains daily rhythms of energy metabolism in mice. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00775.2005>
- Schibler, U., Ripperger, J., & Brown, S. A. (2003). Peripheral circadian oscillators in mammals: Time and food. In *Journal of Biological Rhythms*. <https://doi.org/10.1177/0748730403018003007>
- Schoeller, D. A., Cella, L. K., Sinha, M. K., & Caro, J. F. (1997). Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI119717>

- Shi, S. Q., Ansari, T. S., McGuinness, O. P., Wasserman, D. H., & Johnson, C. H. (2013). Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.048>
- Shimomura, Y., Shimizu, H., Kobayashi, I., & Kobayashi, S. (1989). Importance of feeding time in pair-fed, ovariectomized rats. *Physiology and Behavior*. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90109-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90109-1)
- Simon, C., Gronfier, C., Schlienger, J. L., & Brandenberger, G. (1998). Circadian and ultradian variations of leptin in normal man under continuous enteral nutrition: Relationship to sleep and body temperature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.6.4864>
- Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E., & Fruchart, J. C. (1998). Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.19.2088>
- Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., & Menaker, M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.291.5503.490>
- Stubbins, R. E., Holcomb, V. B., Hong, J., & Núñez, N. P. (2012). Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. *European Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s00394-011-0266-4>
- Sun, M., Feng, W., Wang, F., Li, P., Li, Z., Li, M., Tse, G., Vlaanderen, J., Vermeulen, R., & Tse, L. A. (2018). Meta-analysis on shift work and risks of specific obesity types. In *Obesity Reviews*. <https://doi.org/10.1111/obr.12621>
- Sutton, E. F., Beyl, R., Early, K. S., Cefalu, W. T., Ravussin, E., & Peterson, C. M. (2018). Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even without Weight Loss in Men with Prediabetes. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.04.010>
- Terazono, H., Mutoh, T., Yamaguchi, S., Kobayashi, M., Akiyama, M., Udo, R., Ohdo, S., Okamura, H., & Shibata, S. (2003). Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0936797100>
- Toth, M. J., Tchernof, A., Sites, C. K., & Poehlman, E. T. (2000). Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. *International Journal of Obesity*. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801118>
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. In *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D. R., Eckel, R. H., Takahashi, J. S., & Bass, J. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1108750>

- Varma, M., Chai, J. K., Meguid, M. M., Laviano, A., Gleason, J. R., Yang, Z. J., & Blaha, V. (1999). Effect of estradiol and progesterone on daily rhythm in food intake and feeding patterns in Fischer rats. *Physiology and Behavior*. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00152-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00152-3)
- Vollmers, C., Gill, S., DiTacchio, L., Pulivarthy, S. R., Le, H. D., & Panda, S. (2009). Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909591106>
- Wang, Y. G., Shi, M., Wang, T., Shi, T., Wei, J., Wang, N., & Chen, X. M. (2009). Signal transduction mechanism of TRB3 in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.2329>
- Weigt, C., Hertrampf, T., Flenker, U., Hülsemann, F., Kurnaz, P., Fritzeimer, K. H., & Diel, P. (2015). Effects of estradiol, estrogen receptor subtype-selective agonists and genistein on glucose metabolism in leptin resistant female Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.002>
- Witte, M. M., Resuehr, D., Chandler, A. R., Mehle, A. K., & Overton, J. M. (2010). Female mice and rats exhibit species-specific metabolic and behavioral responses to ovariectomy. *General and Comparative Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.01.006>
- Wollnik, F., & Turek, F. W. (1988). Estrous correlated modulations of circadian and ultradian wheel-running activity rhythms in LEW/Ztm rats. *Physiology and Behavior*. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90204-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90204-1)
- Wong, P. M., Hasler, B. P., Kamarck, T. W., Muldoon, M. F., & Manuck, S. B. (2015). Social Jetlag, chronotype, and cardiometabolic risk. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2923>
- 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. (2011). Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.009>
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R. I., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., & Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.682>
- Yang, X., Downes, M., Yu, R. T., Bookout, A. L., He, W., Straume, M., Mangelsdorf, D. J., & Evans, R. M. (2006). Nuclear Receptor Expression Links the Circadian Clock to Metabolism. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.050>
- Yasumoto, Y., Hashimoto, C., Nakao, R., Yamazaki, H., Hiroyama, H., Nemoto, T., Yamamoto, S., Sakurai, M., Oike, H., Wada, N., Yoshida-Noro, C., & Oishi, K. (2016). Short-term feeding at the wrong time is sufficient to

desynchronize peripheral clocks and induce obesity with hyperphagia, physical inactivity and metabolic disorders in mice. *Metabolism: Clinical and Experimental*. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.02.003>

- Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepkka, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., & Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308709101>
- Zhang, E. E., Liu, Y., Dentin, R., Pongsawakul, P. Y., Liu, A. C., Hirota, T., Nusinow, D. A., Sun, X., Landais, S., Kodama, Y., Brenner, D. A., Montminy, M., & Kay, S. A. (2010). Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.2214>
- Zhang, R., Lahens, N. F., Ballance, H. I., Hughes, M. E., & Hogenesch, J. B. (2014). A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408886111>
- Zhu, L., Zou, F., Yang, Y., Xu, P., Saito, K., Hinton, A. O., Yan, X., Ding, H., Wu, Q., Fukuda, M., Sun, Z., Tong, Q., & Xu, Y. (2015). Estrogens prevent metabolic dysfunctions induced by circadian disruptions in female mice. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1922>
- Zidon, T. J. P. K. L. F. R. J. W. L. T. M. O. E. S. A. F. Y. P. D. J. C. D. B. L. J. A. K. V. J. V.-P. (2020). Effects of ER $\beta$  and ER $\alpha$  on OVX-induced changes in adiposity and insulin resistance. *Journal of Endocrinology*, 245(1), 165–178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1530/JOE-19-0321>

11. ANEXOS

**Tabela 2.** Análise de Fourier dos genes de relógio.

<b>Per1</b>		
<i>Sham AD</i>	F= 6,52	p= 0,007
<i>Sham TR</i>	F= NaN	p= NaN
<i>OVX AD</i>	F= NaN	p= NaN
<i>OVX TR</i>	F= 12,93	p= 0,000
<b>Bmal1</b>		
<i>Sham AD</i>	F= 5,3	p= 0,016
<i>Sham TR</i>	F= NaN	p= NaN
<i>OVX AD</i>	F= 7,08	p= 0,005
<i>OVX TR</i>	F= 12,95	p= 0,0002
<b>Reverb-<math>\alpha</math></b>		
<i>Sham AD</i>	F= 24,94	p= 8,8x10 <sup>-6</sup>
<i>Sham TR</i>	F=9,70	p= 0,001
<i>OVX AD</i>	F= 7,29	p= 0,004
<i>OVX TR</i>	F= 4,13	p= 0,03
<b>Cry1</b>		
<i>Sham AD</i>	F= 8,79	p= 0,002
<i>Sham TR</i>	F= NaN	p= NaN
<i>OVX AD</i>	F= 4,22	p= 0,032
<i>OVX TR</i>	F= 3,82	p= 0,041
<b>Cry2</b>		
<i>Sham AD</i>	F= 4,10	p= 0,033
<i>Sham TR</i>	F= NaN	p= NaN
<i>OVX AD</i>	F= 4,09	p= 0,03
<i>OVX TR</i>	F= NaN	p= NaN