

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia

ROBERTA CRISTELLI FONSECA

**O CIRCUITO NEURAL MEDIADO PELO NERVO VAGO REGULA O  
PERFIL PROTEÔMICO DO INTESTINO AO LONGO DO DIA**

Belo Horizonte

2022

ROBERTA CRISTELLI FONSECA

**O CIRCUITO NEURAL MEDIADO PELO NERVO VAGO REGULA O  
PERFIL PROTEÔMICO DO INTESTINO AO LONGO DO DIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. PhD André Gustavo Oliveira

Belo Horizonte

2022

043

Fonseca, Roberta Cristelli.

O circuito neural mediado pelo nervo vago regula o perfil proteômico do intestino ao longo do dia [manuscrito] / Roberta Cristelli Fonseca. – 2022. 97 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. PhD André Gustavo Oliveira.

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

1. Fisiologia. 2. Intestinos. 3. Nervo Vago. 4. Ritmos biológicos. I. Oliveira, André Gustavo. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLÓGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO N° 358 DE ROBERTA CRISTELLI FONSECA

"O Circuito Neural Mediado Pelo Nervo Vago Regula o  
Perfil Proteômico do Intestino Ao Longo do Dia"

**ROBERTA CRISTELLI FONSECA**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **26 de maio de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**Prof. Dr. Rafael Machado Rezende**, Department of Neurology/Harvard  
**Profa. Dra. Cibele Aparecida Crispim**, FAMED/UFU  
**Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais  
**Profa. Dra. Paula Bargi de Souza**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais  
**Prof. Dr. André Gustavo de Oliveira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Orientador

**Belo Horizonte, 26 de maio de 2022.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Paula Bargi de Souza**, Professora do Magistério Superior, em 26/05/2022, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Machado Rezende**, Usuário Externo, em 26/05/2022, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Gustavo de Oliveira**, Professor do Magistério Superior, em 27/05/2022, às 08:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maristela de Oliveira Poletini**, Professora do Magistério Superior, em 01/06/2022, às 16:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cibele Aparecida Crispim**, Usuária Externa, em 01/06/2022, às 18:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1479732** e o código CRC **EFA70496**.

Dedico esta tese a todas as meninas e mulheres brasileiras, como um incentivo para a busca da independência, autonomia e realização de seus sonhos.

## Agradecimentos

A Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foi minha casa nos últimos doze anos e eu sempre desejei fazer parte desta instituição. As experiências que me proporcionou determinaram grande parte dos valores pessoais, profissionais, políticos e sociais que tenho hoje! Agradeço por esta grande oportunidade!

A defesa desta tese é a concretização de um sonho. Tenho muito orgulho do caminho que tracei para chegar até aqui! Agradeço à Deus por ter me concedido o propósito de tentar desvendar os mistérios da vida para assim, contribuir para o bem-estar da humanidade. Agradeço por meus dons e habilidades.

Ao fechar o ciclo da minha pós-graduação, sou grata por todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso. Agradeço aos meus pais por terem sido meu suporte. Especialmente, agradeço à minha mãe, Angélica, por sempre estar ao meu lado, incentivar meu desenvolvimento e por todo amor e carinho. Agradeço ao meu pai, Roberto, por ter ensinado superar meus medos e seguir em frente e por todo seu amor! Ainda, sou muito grata ao meu irmão, Thiago, e minha cunhada, Jana, pelo carinho e acolhimento.

Por todos estes anos fui presenteada com a torcida, incentivo e amor dos meus tios Gera e Dora, minhas avós, Inhazinha e Tita! Muito obrigada a todos vocês!

Agradeço ao Prof. PhD Thiago Verano Braga e ao Lucas Ribeiro, ambos do Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB/UFMG), à PhD Marcella Nunes de Melo Braga do Departamento de Bioquímica e Imunologia (ICB/UFMG), à técnica Adriana Campezzato Raabe Magalhães do Laboratório Multiusuário de Proteômica (ICB-UFMG) e ao Prof. PhD Frank Kjeldsen da *University of Sourthen Denmark*, os quais colaboraram grandiosamente para a coleta dos dados obtidos nesta tese. Agradeço também a todos os integrantes do Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia e à agência financiadora Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Para desenvolver este trabalho, precisei de muita colaboração e o Laboratório de Circuitos Fisiológicos forneceu apoio e auxílio em todas as etapas. Gabriel, Bruna, Lorena e Evelyn, obrigada por todas as anestésias que realizaram por mim (hahaha)! Brincadeiras à parte, agradeço a dedicação de vocês. Camila, aprendi muito com você nestes anos e te admiro muito! Muito obrigada pela amizade, companhia, compreensão e suporte!

Para finalizar, quero agradecer ao meu orientador: André, foi um prazer trabalhar com você! Vou sempre me inspirar em você e lembrar de tudo que me ensinou! Obrigada pela confiança e por abrir tantas portas de oportunidades! Dentre todos os aprendizados, o mais marcante e importante foi o significado do título de doutora: “Doutor é um título filosófico, significa doutor em filosofia. Portanto, um doutor precisa saber chegar em qualquer lugar, identificar, pensar e resolver os problemas à sua volta”! E assim eu desejo proceder na minha carreira e na vida!

“Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.” (Marie Curie).

## Resumo

### **O circuito neural mediado pelo nervo vago regula o perfil proteômico do intestino ao longo do dia**

Os ritmos circadianos são flutuações da fisiologia e comportamento em um período de aproximadamente 24 horas, que permitem aos organismos predizerem as mudanças ambientais e anteciparem suas respostas para melhor adaptarem-se. A dessincronização destes ritmos está associada a muitas desordens gastrointestinais e metabólicas como colite, síndrome do intestino irritável, obesidade e diabetes. Estudos prévios mostraram que nutrientes provenientes da dieta, microbiota e metabólitos são determinantes para sincronizar ritmo circadiano do trato gastrointestinal. Porém, o mecanismo de regulação dos ritmos biológicos intestinais não foi completamente elucidado. Assim, hipotetizamos que o nervo vago organiza temporalmente a fisiologia intestinal. Para testar essa hipótese, utilizamos espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida para avaliar a ritmicidade do proteoma e fosfoproteoma do íleo, em camundongos vagotomizados (grupo VNX) ou com a sinalização vagal intacta (grupo Sham). Constatamos que 4,2% do proteoma e 0,47% do fosfoproteoma do íleo oscilaram ao longo do dia, como indicado pelo teste de ritmicidade JTK, de acordo com o ciclo de atividade e alimentação do animal. As proteínas e fosfoproteínas identificadas estão associadas às funções clássicas do intestino, como digestão/absorção, metabolismo de nutrientes e barreira epitelial. Surpreendentemente, a interrupção da comunicação intestino-cérebro pela vagotomia aboliu a ritmicidade das proteínas. Curiosamente, na ausência do nervo vago, algumas proteínas relacionadas a funções imunológicas adquiriram comportamento cíclico. Estes resultados mostraram que a comunicação intestino-cérebro regula o ritmo de expressão e fosforilação de proteínas relacionadas às funções básicas do intestino. Além disso, a ritmicidade de muitas destas proteínas era desconhecida até o presente momento. Portanto, este trabalho expandiu o conhecimento sobre os ritmos biológicos intestinais e possibilitará a formulação e investigação de novas hipóteses.

Palavras- chave: Intestino. Nervo vago. Ritmos biológicos.

## **Abstract**

### **Vagus nerve-mediated neural circuitry regulates gut proteomic profile throughout the day**

Circadian rhythms are fluctuations in physiology and behavior around 24 hours allowing the organisms to predict the environmental changes and to anticipate its responses to better adapt. Circadian rhythm disruption is associated to many gastrointestinal and metabolic disorders such as colitis, irritable bowel syndrome, obesity, and diabetes. Previously, it was shown that food, intestinal microbiota, and metabolites are determinants to the gastrointestinal circadian rhythm synchronization. However, the regulatory mechanism of intestinal biological rhythms is not fully elucidated. Then, we hypothesized that the vagus nerve temporarily organizes the gut physiology. To test it, we used mass spectrometry coupled to liquid chromatography and analyzed the proteome and phosphoproteome rhythms in the ileum, on vagotomized (VNX) or Sham operated mice. We identified that 4,2% of the proteome and 0,47% of the phosphoproteome oscillated through the day, as measured by the JTK cycle test, according to activity and feeding cycles. The identified proteins and phosphoproteins are associated to classical intestinal functions, such as digestion/absorption, metabolism, and epithelial barrier. Surprisingly, the gut-brain axis interruption by vagotomy abolished the protein rhythms. Curiously, in the absence of vagus nerve, some proteins related to immune functions acquired cyclic behavior. These results showed that the gut-brain axis regulates the proteins expression and phosphorylation rhythms related to basic intestinal function. Furthermore, many proteins rhythms were unknown until this moment. Therefore, this work expanded the knowledge about intestinal biological rhythms and will allow the future hypothesis formulation and investigation.

**Keywords:** Intestine. Vagus nerve. Biological rhythms.

<b>1. Sumário</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
1.1. RITMO CIRCADIANO .....	12
1.2. INTESTINO .....	18
1.3. NERVO VAGO.....	28
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
3.2.1. Investigar se o nervo vago interfere na expressão temporal dos genes do relógio biológico no intestino delgado (íleo);.....	38
3.2.2. Identificar se expressão e fosforilação das proteínas intestinais flutuam ao longo do dia e se o nervo vago interfere nestas oscilações;.....	38
3.2.3. Avaliar quais são as vias bioquímicas associadas às proteínas que são expressas ou fosforiladas ritmicamente no intestino;.....	38
3.2.4. Estudar a dinâmica do ritmo de expressão e fosforilação das proteínas intestinais....	38
<b>4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>39</b>
4.1. ANIMAIS .....	39
4.2. MANIPULAÇÃO CIRÚRGICA DO CIRCUITO VAGAL .....	39
4.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR) PARA ANÁLISE DO EFEITO DO NERVO VAGO SOB A EXPRESSÃO DOS GENES DO RELÓGIO NO INTESTINO.....	39
4.4. ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	41
4.5. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS: .....	41
4.5.1. Dessalinização das proteínas.....	41
4.5.2. Digestão peptídica das proteínas:.....	42
4.5.3. Dessalinização dos peptídeos:.....	42
4.5.4. Marcação dos peptídeos: .....	43
4.5.5. Purificação dos peptídeos fosforilados usando cromatografiaTiO <sub>2</sub> : .....	44
4.6. ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	46
4.7. ANÁLISE DOS DADOS.....	47
4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	48
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
5.1. O NERVO VAGO ALTERA A EXPRESSÃO DE GENES DO RELÓGIO NO INTESTINO DELGADO .	50
5.2. O NERVO VAGO REGULA O RITMO CIRCADIANO E INFRADIANO DA ABUNDÂNCIA DO PROTEOMA INTESTINAL.....	51
5.3. AS PROTEÍNAS OSCILANTES ESTÃO ASSOCIADAS ÀS VIAS BIOLÓGICAS INTESTINAIS .....	52
5.4. A COMUNICAÇÃO ENTRE O INTESTINO-CÉREBRO, MEDIADA PELO NERVO VAGO, É IMPORTANTE PARA CONECTAR VIAS BIOQUÍMICAS INTESTINAIS .....	55

5.5.	PANORAMA DA OSCILAÇÃO DAS PROTEÍNAS ENRIQUECIDAS NO PROTEOMA TOTAL DO ÍLEO	57
5.6.	O NERVO VAGO MODULA A FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS INTESTINAIS AO LONGO DO DIA	61
5.7.	ENRIQUECIMENTO DE VIAS RELACIONADAS AOS FOSFOPEPTÍDEOS QUE OSCILAM AO LONGO DO DIA .....	62
5.8.	RITMO DE FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS AO LONGO DO DIA .....	63
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>82</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os ritmos circadianos (do Latim *circa* = por volta de; *diem* = dia) referem-se às funções biológicas e comportamentos que oscilam em um período de aproximadamente 24 horas, permitindo aos seres vivos anteciparem e adaptarem-se às mudanças diárias do ambiente (VOIGT; FORSYTH; KESHAVARZIAN, 2019). Assim, todas as células de um organismo são equipadas com uma maquinaria molecular, composta por genes denominados didaticamente genes do relógio, a qual funciona por alças de retroalimentação positivas e negativas que determinam o ritmo de funcionamento das células (MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012). Estes ritmos precisam estar sincronizados para permitir o funcionamento ideal do organismo como um todo. Para isso, o núcleo supraquiasmático, no sistema nervoso central, funciona como um maestro, captando os sinais provenientes do ambiente externo e regendo o ritmo dos órgãos periféricos por meio sinais hormonais e neurais (PANDA; HOGENESCH; KAY, 2002).

O estilo de vida intenso adotado pela sociedade moderna, no qual 24 horas são insuficientes para realizarmos todas as atividades e compromissos propostos, impulsiona o desenvolvimento econômico e tecnológico, ao mesmo tempo em que prejudica a qualidade de vida, saúde e bem-estar dos indivíduos, por causar a desorganização dos ritmos circadianos. Consequência da industrialização, a rotina de grande parte da população global atual é marcada por exposição prolongada à luz dos dispositivos eletrônicos, jornadas de trabalho noturnas, viagens entre muitos fusos horários, alimentação noturna ou em horários aleatórios durante o dia, dieta rica em carboidratos e gorduras e *jet lag* social (evento no qual a agenda de sono e alimentação é muito diferente entre os dias de trabalho e os dias de descanso) (VOIGT; FORSYTH; KESHAVARZIAN, 2019). Todos estes fatores contribuem para a desorganização do ritmo circadiano do organismo, condição associada a diversas doenças, como diabetes, obesidade, síndrome do intestino irritável, diarreia do viajante, colite e câncer (COSTA, 2003; HAUS; SMOLENSKY, 2006; KNUTSSON, 2003; PREUSS *et al.*, 2008).

Os trabalhadores noturnos ou que trabalham em turnos alternados são a parcela da população mais afetada pela desregulação do ritmo circadiano e a manifestação de doenças gastrointestinais é crescente entre estas pessoas. O Brasil possuía 6,933 milhões de trabalhadores noturnos em 2016, representando aproximadamente 20% de sua força de trabalho (Villas Bôas, 2016). Nos Estados Unidos e Europa, aproximadamente 15-20% da população

ativa trabalha durante a noite. Esses números são acompanhados por 30 a 80 % da população global que sofre de *jet lag* (ROENNEBERG *et al.*, 2012; SULLI *et al.*, 2018; VOIGT; FORSYTH; KESHAVARZIAN, 2019). Estes dados mostram a importância de desenvolver estratégias que minimizem os efeitos da desorganização circadiana e novos tratamentos para as doenças correlacionadas que acometem parte significativa da força de trabalho e da população mundial. Para isso, é essencial o entendimento da regulação dos ritmos circadianos periféricos, uma vez que a maioria das doenças resultam em desordens metabólicas e gastrointestinais.

Desde a descoberta dos genes da maquinaria molecular circadiana, o conhecimento sobre cronobiologia tem avançado muito. Atualmente sabemos que cada órgão tem um ritmo próprio e que vários fatores como a composição e abundância da microbiota, nutrição e horário da alimentação são capazes de alterar o ritmo circadiano do trato gastrointestinal (HOOGERWERF *et al.*, 2007a; PANDA; HOGENESCH; KAY, 2002; THAISS *et al.*, 2016). Inclusive, os sinais sincronizadores desencadeados pela alimentação são capazes de sobrepujar os sinais luminosos transmitidos pelo componente central dos ritmos circadianos (HOOGERWERF *et al.*, 2007a), indicando que existem outros mecanismos reguladores do ciclo circadiano independentes do núcleo supraquiasmático.

Tendo em vista a posição anatômica privilegiada do nervo vago para detectar sinais provenientes do lúmen intestinal, integrar estas informações ao sistema nervoso central e conectar a maioria dos órgãos periféricos por meio de suas fibras eferentes (BERTHOUD, H R; CARLSON; POWLEY, 1991; BERTHOUD, HANS RUDOLF *et al.*, 1997), somada à sua participação em diversas funções fisiológicas intestinais (BURDYGA *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2018), a hipótese deste trabalho é que o nervo vago organiza temporalmente as funções fisiológicas intestinais.

Utilizando espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida LC-MS, revelamos que a comunicação intestino-cérebro, mediada pelo ramo esquerdo do nervo vago, regula a oscilação da abundância e fosforilação das proteínas intestinais. Além disso, fomos pioneiros em identificar a ritmicidade de diversas proteínas associadas às funções fisiológicas clássicas do intestino.

Portanto, este trabalho fornece informações importantes e inovadoras sobre a regulação do ritmo circadiano intestinal e servirá como ponto de partida para a elaboração de estudos futuros.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. RITMO CIRCADIANO

“Coma como um rei de manhã, um príncipe a tarde, e um camponês a noite” foi o conselho para uma vida saudável proferido por Maimonides (1135-1204), um filósofo judeu medieval e médico conhecido como Rambam (ASHER; SASSONE-CORSI, 2015).

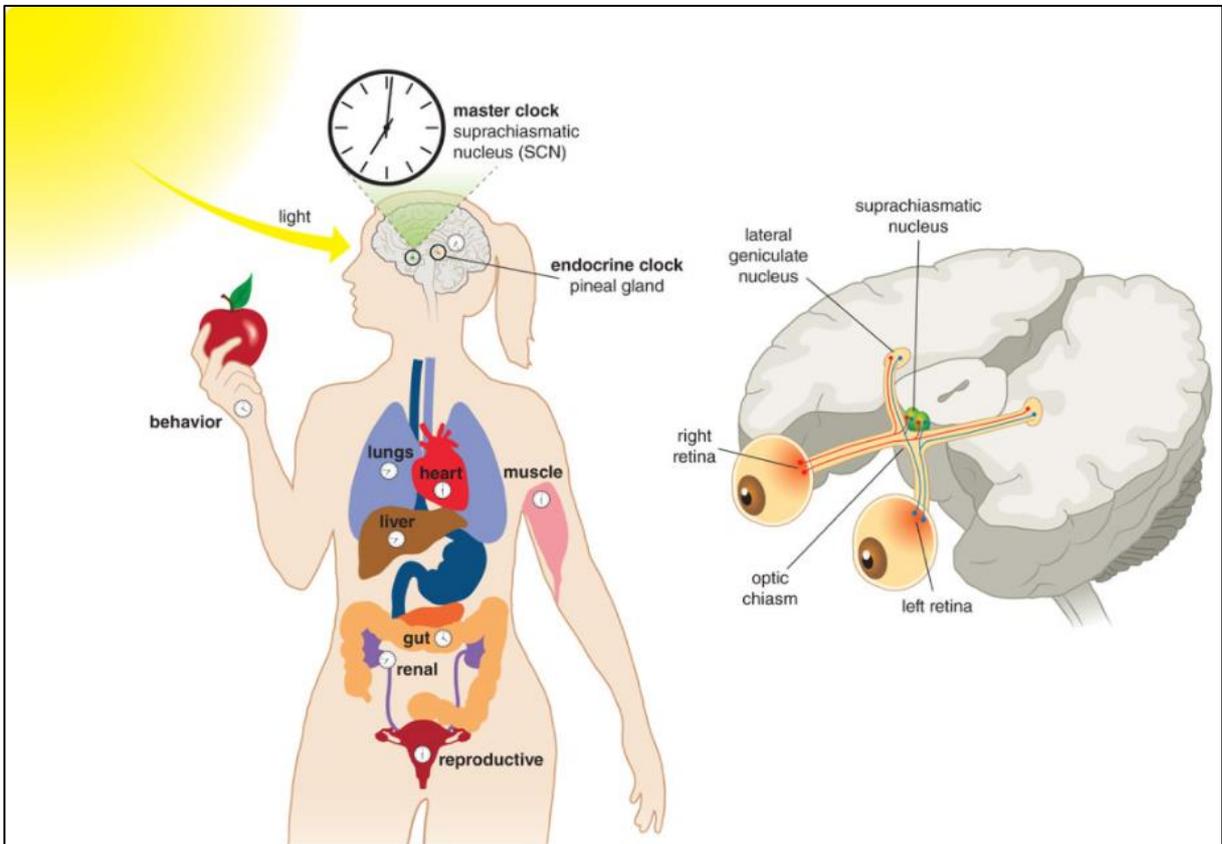
Muitas formas de vida na Terra são influenciadas por flutuações da luz causada pela rotação do planeta em torno do seu próprio eixo. Assim, todos os três domínios da vida (*archaea*, *bacteria*, e *eukarya*) conquistaram diferentes métodos e maquinarias moleculares para adaptarem-se às mudanças nas condições ambientais ao longo do dia (EDGAR *et al.*, 2012; THAISS *et al.*, 2014). Este aparato molecular propicia a existência dos ritmos circadianos, que são processos biológicos com oscilações de aproximadamente 24h que regulam diversas funções da vida em uma grande variedade de organismos (MOORE *et al.*, 2014; PANDA; HOGENESCH; KAY, 2002). Dentre estas funções, podemos citar no trato gastrointestinal a digestão de nutrientes, atividades imunológicas e regenerativas do epitélio, que são necessárias para o crescimento e sobrevivência do organismo (HOOGERWERF, 2006; HUSSAIN; PAN, 2009; KARPOWICZ *et al.*, 2013; MOORE *et al.*, 2014; POTTEN *et al.*, 1977; YU *et al.*, 2013). Nos seres humanos, a desorganização do ritmo circadiano está associada com uma variedade de doenças intestinais indo de diarreia a ulcera e câncer (HOOGERWERF, 2009; MOORE *et al.*, 2014; SAVARINO *et al.*, 1996; XU *et al.*, 2013).

Os ritmos circadianos são caracterizados por (1) período de aproximadamente 24 horas; (2) habilidade de ser sincronizado por pistas externas e (3) habilidade de persistir na ausência de sinais externos (HARDIN, 2011; PARASRAM; KARPOWICZ, 2020; TAKAHASHI, 2017). Estas características diferenciam ritmo circadiano de outros processos responsivos ao ambiente externo, incluindo ritmos diurnos cuja repetição diária pode ser determinada por respostas à luz, e ritmos ultra e infradianos cujo período é maior ou menor que 24 horas (PARASRAM; KARPOWICZ, 2020).

Para promover a adaptação funcional ótima, os relógios circadianos - osciladores que permitem acoplar variações diurnas das condições ambientais aos processos fisiológicos e comportamentais (MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012; THAISS *et al.*, 2014) - preparam o indivíduo para eventos preditivos como disponibilidade de alimentos e estado de repouso (FONKEN *et al.*, 2010).

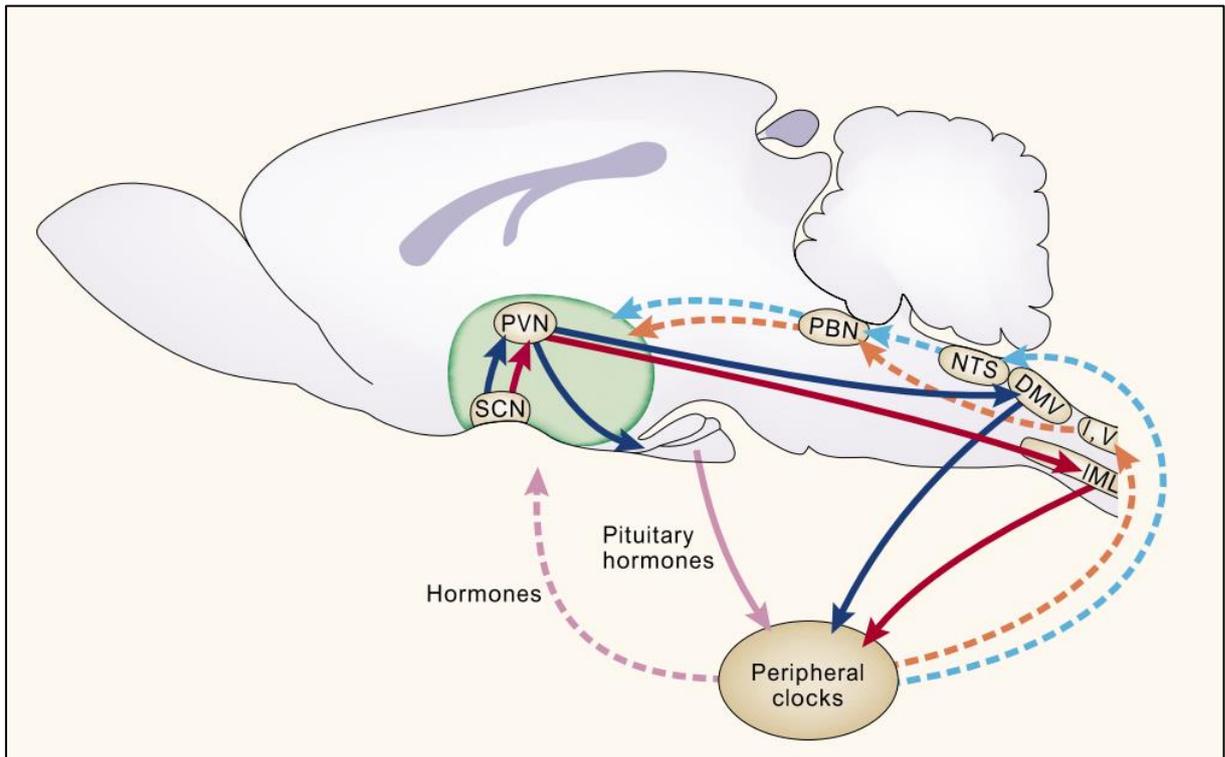
O componente circadiano central ou relógio central localiza-se no núcleo supraquiasmático (SCN) do hipotálamo e é composto por aproximadamente 15-20,000 neurônios, os quais possuem um padrão de ativação característico, oscilando a cada 24h. A

sincronização deste relógio com o ambiente externo acontece quando os raios luminosos incidem na retina ocular e são transmitidos para o SCN, o qual funciona como um maestro ou marca-passo, ditando o ritmo dos relógios periféricos, presentes em todos os tecidos e células do corpo (PANDA; HOGENESCH; KAY, 2002) (**Figura 1**).



**Figura 1 – Relógios Biológicos.** O ritmo circadiano das funções e comportamentos dos organismos são sincronizados com as pistas ambientais externas. Dentre estas, a luz é considerada o estímulo sincronizador mais potente. Os sinais luminosos que chegam na retina são enviados ao núcleo supraquiasmático (SCN), representado na imagem à direita. Este núcleo é considerado como o relógio maestro, uma vez que é capaz de organizar o ritmo de oscilações dos relógios periféricos, presentes em todas as células e órgãos do corpo (Alucino, B; Oxford University Press, 2017).

O SCN interage com os componentes circadianos periféricos ou relógios periféricos por meio da ativação de neurônios localizados no núcleo paraventricular (PVN), o qual transforma os sinais recebidos do SCN em sinais autonômicos e hormonais, como descrito na **Figura 2**. As informações hormonais ou neurais atingem os órgãos periféricos como as glândulas adrenais, coração, fígado, intestino, gônadas e tecido adiposo (BUIJS; KALSBECK, 2001).

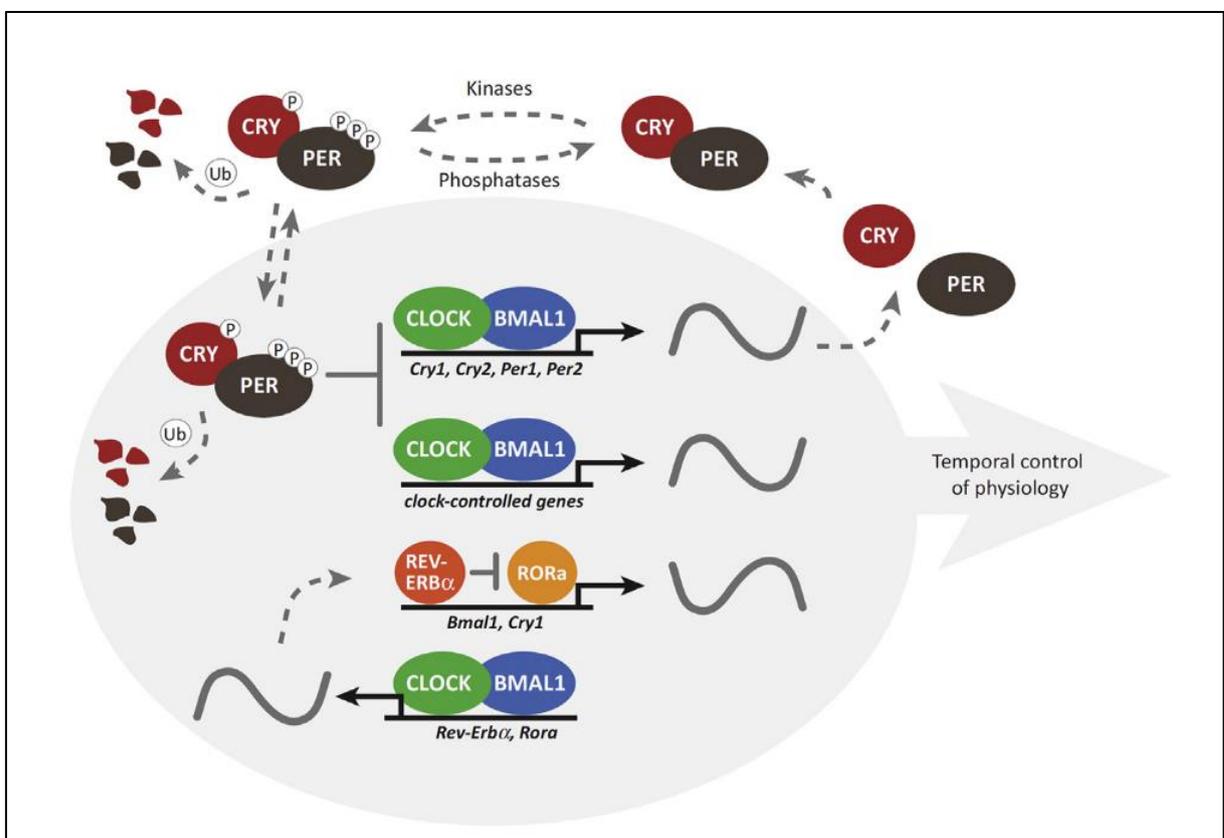


**Figura 2 – Interação entre os circuitos dos relógios central e periféricos.** Os sinais neurais gerados no núcleo supraquiasmático (SCN) são transmitidos para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). O PVN possui neurônios que se projetam diretamente para o núcleo dorsal motor do vago (DMV) e coluna intermediolateral (IML), núcleos nos quais estão localizados as fibras eferentes parassimpáticas e simpáticas, respectivamente. Estes neurônios eferentes podem enviar a informação proveniente do relógio central para os relógios localizados em órgãos periféricos. Os sinais neurais do PVN também podem ser enviados para a hipófise, onde desencadeiam a liberação de hormônios que agem sincronizando os relógios periféricos ao relógio central. Por outro lado, existe a transmissão de informações dos órgãos periféricos para o circuito circadiano central. Assim, os hormônios secretados pelos órgãos periféricos podem interagir com seus receptores no sistema nervoso central ou neurônios aferentes autonômicos podem enviar as informações referentes às condições fisiológicas, metabólicas e imunológicas das vísceras para o cérebro. Neste caso, os neurônios simpáticos projetam-se dos órgãos periféricos para os núcleos I e IV da coluna dorsal. Em seguida, estes núcleos fazem sinapse com o núcleo do trato solitário (NTS), o qual também recebe as informações de neurônios aferentes parassimpáticos. Por sua vez, as fibras parassimpáticas enviam sinais para o NTS, o qual faz sinapse com neurônios do núcleo parabrancual (PBN). Em seguida, estes neurônios comunicam-se com os núcleos hipotalâmicos, incluindo o PVN e SCN. Os neurônios parassimpáticos podem transmitir as informações viscerais para os núcleos hipotalâmicos diretamente a partir do NTS ou indiretamente, por meio da ativação do PBN (BUIJS; KALSBECK, 2001).

A maquinaria molecular circadiana dos mamíferos (**Figura 3**) é composta por fatores de transcrição, que são os genes *Circadian locomotor output cycles kaput* (*Clock*) junto com seu parólogo *Neural PAS domain protein 2* (*Npas2*) e *Brain and muscle ARNT-like 1* (*Bmal1*, codificado por *Arntl*), os quais formam heterodímeros e ligam-se ao promotor E-box dos genes *Period 1, 2 e 3* (*Per1/2/3*) e *Cryptochrome 1 e 2* (*Cry1/2*) (**Figura 3**). PER e CRY formam um complexo que faz uma alça de retroalimentação negativa inibindo a expressão *Bmal1* e *Clock*, formando assim um loop de autorregulação transcricional/translacional (**Figura 3**). As quinases caseína 1 $\delta$  e - $\epsilon$  (CK1 $\delta/\epsilon$ ) e proteína quinase ativada por AMP (AMPK), fosforilam as proteínas PER e CRY, respectivamente, causando sua degradação (**Figura 3**). Além disso, a proteína *F-box/leucine rich-repeat protein 3* (FBXL3) complementa ação de CK1 $\delta/\epsilon$  mediando a

ubiquitinação e consequente degradação de CRY1/2 (**Figura 3**). Em última instância, a taxa de degradação de PER e CRY é responsável por estabelecer o período circadiano de 24 horas (GERHART-HINES; LAZAR, 2015; MARTCHENKO *et al.*, 2020).

Em paralelo a esta alça principal, o heterodímero BMAL1/COCK induz a expressão dos receptores nucleares, REV-ERB $\alpha$  (codificado por NR1D1) e  $\beta$  bem como o ácido retinóico relacionado aos receptores órfãos  $\alpha$  e  $\gamma$  (ROR $\alpha$  e  $\gamma$ ) (MARTCHENKO *et al.*, 2020; PREITNER *et al.*, 2002; SATO *et al.*, 2004) (**Figura 3**). Estas proteínas funcionam em direções opostas, enquanto REV-ERB $\alpha/\beta$  reprimem a transcrição *Bmal1*, ROR $\alpha/\gamma$  estimula a expressão de *Bmal1* (MARTCHENKO *et al.*, 2020; PREITNER *et al.*, 2002; SATO *et al.*, 2004) (**Figura 3**).



**Figura 3 – Arquitetura molecular do relógio circadiano.** No núcleo celular os fatores de transcrição CLOCK e BMAL1 formam heterodímeros e ligam-se ao promotor E-box dos genes *Per1-3* e *Cry1-2*, promovendo sua expressão. No citoplasma celular, PER e CRY formam um complexo que pode ser fosforilado, e consequentemente degradado ou pode retornar ao núcleo para inibir a expressão dos genes *Clock* e *Bmal1*. Em paralelo, o heterodímero COCK/BMAL1 induz a expressão das proteínas REV-ERB e ROR, as quais reprimem e estimulam a transcrição do gene *Bmal1*, respectivamente. Os ciclos de transcrição destes genes e degradação das proteínas expressas duram aproximadamente 24 horas e controlam temporalmente a fisiologia do organismo (SOLLARS; PICKARD, 2015).

Todos os genes mencionados acima estão envolvidos na regulação da transcrição dos genes controlados pelo relógio (CCGs) e estabelecem o ritmo circadiano para processos chave. Os fatores de transcrição circadiano (genes do relógio) controlam a dinâmica rítmica da cromatina, incluindo mudanças em marcadores epigenéticos, organização espacial

cromossômica, e atividade de polimerase, determinando portanto, a fração do genoma que entra em expressão oscilatória de maneira tecido específica (AGUILAR-ARNAL *et al.*, 2013; KOIKE *et al.*, 2012; PERELIS *et al.*, 2015; THAISS *et al.*, 2016; VOLLMERS *et al.*, 2012). Como resultado, mais de 20% do transcriptoma total de um tecido e mais de 50% dos transcritos de todo o corpo consiste em elementos oscilatórios, os quais determinam o padrão diário da atividade celular e do organismo (PANDA; HOGENESCH; KAY, 2002; THAISS *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014).

Estes componentes circadianos são resetados ou sincronizados por pistas ambientais, ou *zeitgeber* (ZT), como o horário e composição do alimento, exercício físico, temperatura, microbiota e luz (TAKAHASHI, 2017; TEICHMAN *et al.*, 2020; TOGNINI *et al.*, 2017). Classicamente, a luz é a pista ambiental mais potente e dita o ritmo de ativação de neurônios do componente circadiano central.

No trato gastrointestinal, a microbiota é um importante sincronizador dos ritmos circadianos do hospedeiro (LEONE *et al.*, 2015; LIANG; BUSHMAN; FITZGERALD, 2015; MUKHERJI *et al.*, 2013; TEICHMAN *et al.*, 2020; THAISS *et al.*, 2014; ZARRINPAR *et al.*, 2014). Paralelamente, o ciclo circadiano da microbiota pode ser sincronizado ao ciclo do hospedeiro e aos sinais externos como a luz e a alimentação (KACZMAREK; MUSAAD; HOLSCHER, 2017; LEONE *et al.*, 2015; LIANG; BUSHMAN; FITZGERALD, 2015; TEICHMAN *et al.*, 2020; THAISS *et al.*, 2014; ZARRINPAR *et al.*, 2014). Porém, a alimentação é o *zeitgeber* principal para sincronizar os ritmos dos relógios periféricos. Os ciclos de alimentação/jejum estabelecem nos animais uma atividade antecipatória ao horário das refeições, caracterizada pelo aumento da atividade locomotora, temperatura corporal, níveis de corticosterona e resulta na deflagração do comportamento alimentar (MARTCHENKO *et al.*, 2020; MISTLBERGER, 1994). Esta atividade depende de um sistema circadiano endógeno denominado oscilador sincronizado por alimentação (KONTUREK; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2011; LANDRY; MISTLBERGER, 2007; MARCHANT; MISTLBERGER, 1997), o qual funciona de forma independente do SCN e de estímulos luminosos. Este fato foi experimentalmente comprovado quando roedores alimentados uma vez ao dia e acomodados em ambientes escuros mantiveram a atividade antecipatória antes das refeições subsequentes (MARTCHENKO *et al.*, 2020; MISTLBERGER, 1994). Este comportamento também persiste em animais com o SCN lesionado (MARTCHENKO *et al.*, 2020; STEPHAN; SWANN; SISK, 1979).

A existência da atividade antecipatória na ausência do relógio maestro apontada o intestino como o próprio oscilador que gera a sincronização pelo horário da alimentação. De

fato, o intestino expressa de forma ritmica genes do relógio como *Per1*, *Per2* e *Bmal*, no plexo mionterico e células epiteliais (HOOGERWERF, 2010; HOOGERWERF *et al.*, 2007b; KONTUREK; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2011), além de diversas de suas funções, a citar a motilidade intestinal, secreção de ácido gástrico, manutenção e restauração da barreira mucosa de proteção, produção de enzimas digestivas, transporte de nutrientes no intestino delgado e sistema imunológico serem moduladas por flutuações circadianas (KONTUREK; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2011; OHDO, 2010). Porém, a autonomia da geração de ritmos circadianos pelo intestino e o mecanismo molecular capaz de sincronizar o relógio intestinal com a alimentação ainda não foi desvendado e permanecem como grandes desafios para a cronobiologia.

Ao que concerne ao sinal emitido pelas refeições, foi demonstrado que o olfato, paladar ou volume no trato gastrointestinal parecem não estar envolvidos na sincronização deste oscilador. Primeiro, estudos mostraram que ratos com o sistema olfativo destruído exibem a atividade antecipatória à comida assim como os animais intactos (Coleman and Hay, 1990; Davidson *et al.*, 2001, 2003). Posteriormente, a composição da dieta (e não apenas o horário) foi apontado como importante sincronizador do ritmo circadiano dos roedores (ASHER; SASSONE-CORSI, 2015; HARIRI; THIBAUT, 2011; KOHSAKA *et al.*, 2007), os quais aumentaram o consumo de calorias durante a fase clara e apresentaram alterações no relógio hepático quando alimentados com dieta rica em gordura (ASHER; SASSONE-CORSI, 2015; KOHSAKA *et al.*, 2007). Porém, o consumo de grandes quantidades de comida palatável, não nutritiva, não foi capaz de sincronizar os relógios do trato gastrointestinal (DAVIDSON, A. J. *et al.*, 2003; STEPHAN, 1997). Entretanto, o consumo mínimo de 25 calorias é suficiente para alterar a fase dos ritmos circadianos em ratos, independente do volume da refeição (DAVIDSON, A. J. *et al.*, 2003; STEPHAN; DAVIDSON, 1998). Juntos, estes dados indicam que a nutrição é um preditor melhor das propriedades da comida, para sincronizar o ritmo circadiano, em comparação ao paladar, cheiro ou volume do alimento consumido.

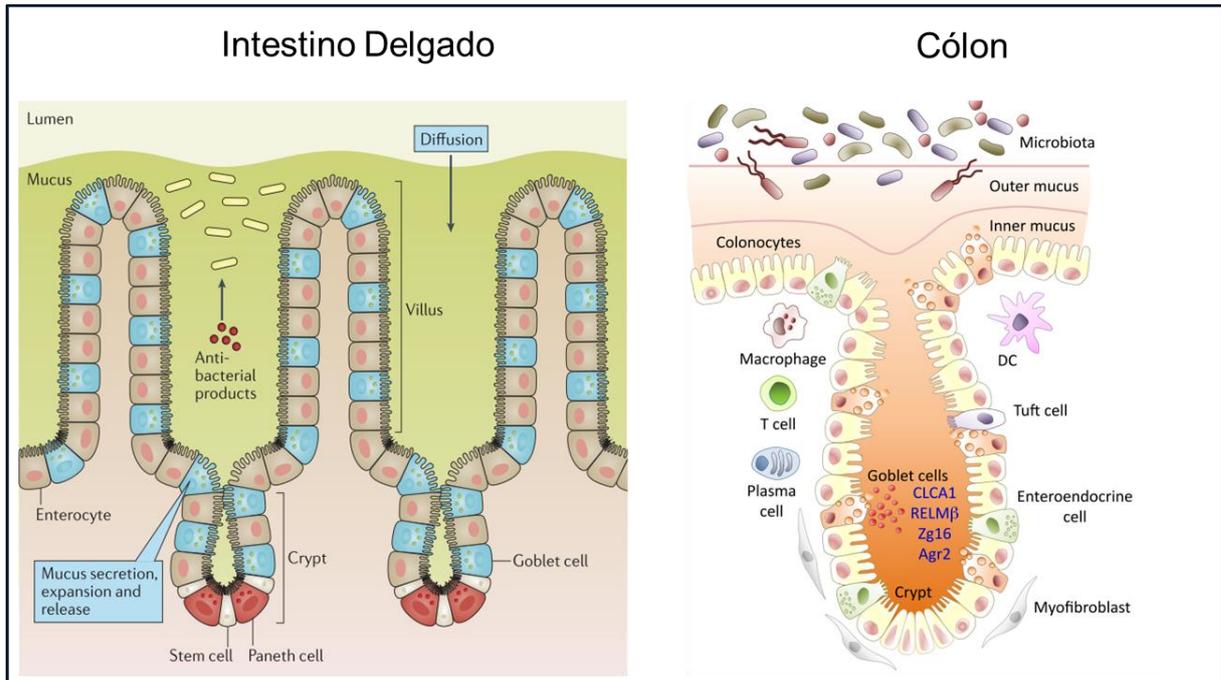
## 2.2. INTESTINO

“... e entre eu e o individualista Sr Cérebro, tem se estabelecido um conjunto duplo de redes elétricas, por meio das quais eu poderia, fácil e rapidamente, dizer a ele todas as ocorrências do dia na medida em que elas aconteciam, e ele também poderia me enviar seus próprios sentimentos e impressões” escreveu Sydney Whiting em *Memórias de um Estômago*, em 1853 (KAELBERER *et al.*, 2018).

O lúmen intestinal hospeda trilhões de microrganismos, denominados microbiota (A *et al.*, 2010; BONAZ; BAZIN; PELLISSIER, 2018; ECKBURG *et al.*, 2005), que facilitam não apenas a captação de nutrientes e energia dos alimentos ingeridos, como também produzem muitos metabólitos que influenciam diversos aspectos da fisiologia, imunologia e comportamento do hospedeiro (LIU *et al.*, 2019; TEICHMAN *et al.*, 2020; VAN DE WOUW *et al.*, 2018). Em conformidade com a importância da microbiota para a fisiologia do hospedeiro, nos últimos anos muitas doenças metabólicas, imunológicas, psiquiátricas e neurológicas, como por exemplo, obesidade (CANI *et al.*, 2008), doença de Crohn (PELLISSIER *et al.*, 2014), depressão (GUIDA *et al.*, 2018), ansiedade (BERCIK *et al.*, 2010), Alzheimer (MAHMOUDIANDHEKORDI *et al.*, 2019) e Parkinson (KIM *et al.*, 2019), têm sido associadas a alterações da comunidade microbiana do intestino. Ainda, o lúmen intestinal é um ponto crítico para a fisiologia e imunologia do indivíduo, por ser o primeiro local de contato com os nutrientes, patógenos e substâncias tóxicas provenientes da alimentação. Assim, o intestino precisa simultaneamente digerir os nutrientes, identificar as substâncias que devem ser absorvidas ou não, montar respostas adaptativas à microbiota e impedir que patógenos ganhem acesso ao interior do organismo (COLLINS; SURETTE; BERCIK, 2012; MAYER, 2011) (BONAZ; BAZIN; PELLISSIER, 2018; BROOKES *et al.*, 2013; CRYAN; DINAN, 2012; FORSYTHE; KUNZE; BIENENSTOCK, 2016; SARKAR *et al.*, 2016). Para tanto, o intestino é composto por um epitélio altamente especializado, um sistema nervoso próprio e mecanismos reguladores muito refinados. Dentre estes mecanismos, destacam-se os circuitos neurais e hormonais que comunicam o intestino e cérebro, formando o eixo intestino-cérebro,

O epitélio intestinal é formado por várias células especializadas, organizadas em camada única e distribuídas de forma distinta ao longo do intestino (ALLAIRE *et al.*, 2018; CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006; GERBE *et al.*, 2016; GRIBBLE; REIMANN, 2016; HOWITT *et al.*, 2016; JOHANSSON; HANSSON, 2016; OHNO, 2015; RODRÍGUEZ-COLMAN *et al.*, 2017; VAN DER FLIER; CLEVERS, 2009; VON MOLTKE *et al.*, 2016) (**Figura 4**). Os enterócitos são células absorptivas, colunares altas, possuem núcleo oval em sua porção basal e representam grande parte do epitélio intestinal. Na porção apical, estas células possuem uma camada de microvilosidades densamente agrupadas (borda em escova), as quais aumentam a superfície de absorção celular (Berne and Levy, 2009). As células caliciformes são

pouco abundantes na porção proximal (intestino delgado) e aumentam em número em direção à região distal (intestino grosso). Estas células produzem glicoproteínas ácidas do tipo mucinas que são hidratadas e formam ligações cruzadas entre si para originar o muco, cuja função principal é proteger e lubrificar o epitélio (Junqueira and Carneiro, 2008). No intestino delgado, o muco forma camada única, facilmente removível e permeável e mantém as bactérias fora do contato com o epitélio por ação de substâncias antibacterianas (**Figura 4**). No cólon, são formadas camadas duplas de muco, sendo a camada interna firmemente aderida ao epitélio e impenetrável às bactérias, enquanto a camada de muco mais externa é expandida e serve de habitat para os microrganismos (**Figura 4**) (JOHANSSON; HANSSON, 2016). As células de Paneth, localizadas nas porções basais das glândulas intestinais, são células exócrinas com grânulos de secreção eosinofílica em seu citoplasma apical. Estes grânulos contêm lisozima e defensina, enzimas que podem permeabilizar e digerir a parede de bactérias. Devido à sua atividade antibacteriana, a lisozima também exerce controle sobre a microbiota intestinal. As células de Paneth são encontradas apenas no intestino delgado e estão concentradas na porção distal deste segmento (íleo) (MOWAT; AGACE, 2014). Próximas às células de Paneth, no terço basal das criptas, estão localizadas as células tronco (MOWAT; AGACE, 2014). As células M recobrem os folículos linfoides das placas de Payer, localizadas no íleo. Essas células podem captar antígenos por endocitose e transportá-los para macrófagos e linfócitos adjacentes, os quais migram para outros compartimentos do sistema linfóide onde as respostas imunológicas contra estes antígenos serão iniciadas (Junqueira and Carneiro, 2008). Por sua vez, as células enteroendócrinas (EECs), raras e secretoras, compreendem menos que 1% das células epiteliais e produzem mais de 20 hormônios diferentes (BEUMER *et al.*, 2020; FURNESS, JOHN B. *et al.*, 2013).

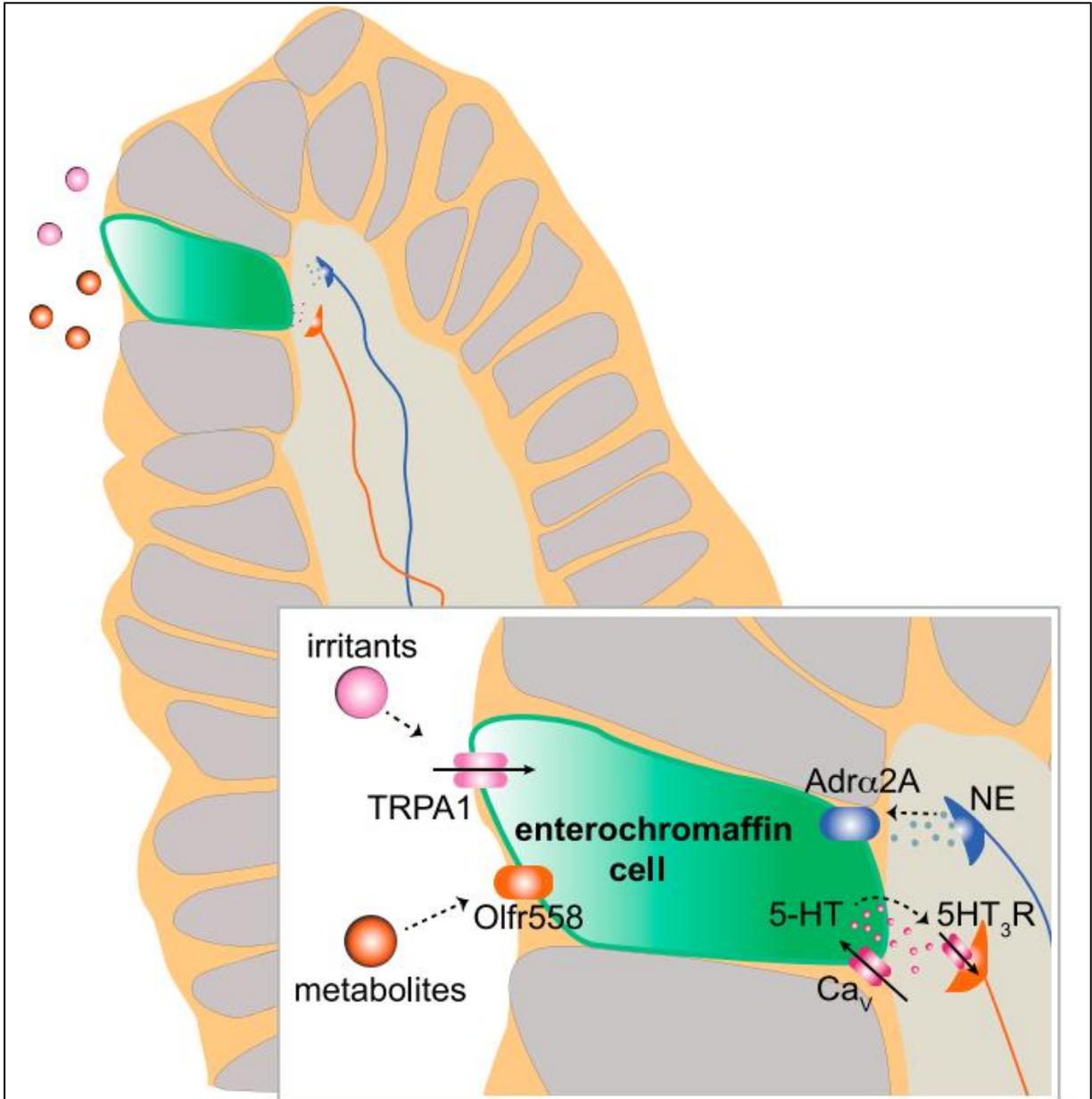


**Figura 4 – Anatomia e morfologia do intestino.** O epitélio do intestino é composto por células absorptivas (enterócitos), células tronco, células de Paneth, células caliciformes e células tufo. À direita está representado a morfologia característica do intestino delgado, cujo epitélio apresenta invaginações que formam os vilos e criptas e está protegido por camada única de muco (JOHANSSON; HANSSON, 2016). Por sua vez, o cólon (esquerda) apresenta criptas epiteliais e contém camada dupla de muco (ALLAIRE *et al.*, 2018).

As EECs são distribuídas por todo o epitélio do trato gastrointestinal (GRIBBLE; REIMANN, 2016) e no passado foram classificadas de acordo com o principal hormônio que produzem (GRIBBLE; REIMANN, 2016; SJÖLUND *et al.*, 1983). Porém, esta classificação é inadequada, visto que existe atualmente um conhecimento robusto sobre a co-expressão de hormônios dentro de células individuais (CHO *et al.*, 2015; EGEROD *et al.*, 2012; GRIBBLE; REIMANN, 2016; HABIB *et al.*, 2012; SVENDSEN *et al.*, 2015; THEODORAKIS *et al.*, 2006). Alguns destes hormônios, como a serotonina (5-hidroxi-triptamina (5-HT)), são produzidos ao longo de todo o intestino. Outros são produzidos predominantemente em uma determinada região (GRIBBLE; REIMANN, 2016; HÅKANSON *et al.*, 1986; KU; LEE; LEE, 2003; LAMBERTS *et al.*, 1991; SJÖLUND *et al.*, 1983; TACHÉ; STENGEL, 2009). A superfície apical destas células é equipada com diversos receptores capazes de monitorar o lúmen intestinal, identificando sinais químicos provenientes da alimentação e da microbiota (BEUMER *et al.*, 2020; FURNESS, JOHN B. *et al.*, 2013). A ativação destes receptores promove a secreção de hormônios pelas EECs. Dentre estes hormônios, o peptídeo semelhante a glucagon (GLP-1) e peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) são denominados incretinas, uma vez que estimulam a secreção de insulina. Muitos outros hormônios controlam o apetite incluindo o indutor de apetite grelina, o redutor de apetite peptídeo YY e

colecistocinina. Somatostatina é um peptídeo inibitório para a maioria dos hormônios intestinais (BEUMER *et al.*, 2020; WORTHINGTON; REIMANN; GRIBBLE, 2018). As células enterocromafins, um subtipo de EECs, produzem 90% da serotonina corporal e regulam os movimentos intestinais (BEUMER *et al.*, 2020; WORTHINGTON; REIMANN; GRIBBLE, 2018). Nos seres humanos, as contrações intestinais também estão sob controle da motilina (BEUMER *et al.*, 2020; WORTHINGTON; REIMANN; GRIBBLE, 2018).

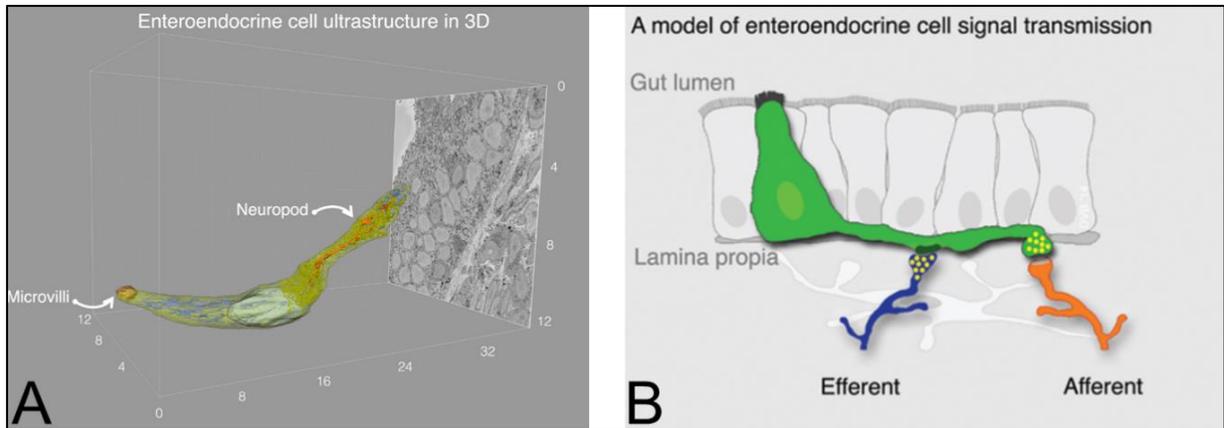
As células enteroendócrinas são componentes importantes do eixo intestino-cérebro. Os sinais captados por seus receptores podem ser transmitidos para o sistema nervoso próprio do intestino (sistema nervoso entérico), para o sistema nervoso central e outros órgãos viscerais, controlando a ingestão de alimentos, secreção de insulina, secreção de enzimas digestivas e movimentos intestinais (BEUMER *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2018). Bellono e colaboradores mostraram as EECs são eletricamente excitáveis por possuírem canais iônicos de sódio dependente de voltagem e canais de cálcio (**Figura 5**). Por meio de receptores e vias de transdução de sinais específicos, as EECs detectam estímulos muito relevantes como, por exemplo, estímulos irritantes por meio do canal iônico potencial receptor transiente A1 (TRPVA1), metabólitos microbianos pelo receptor olfatório 558 (Oflr558), e estresse relacionado a catecolaminas pelo receptor adrenérgico  $\alpha$ 2A (Adra2A) (**Figura 5**). Estas vias sensoriais de transdução estimulam canais de cálcio dependente de voltagem tipo P/Q para controlar a secreção de serotonina para fibras nervosas aferentes primárias que expressam o receptor do hormônio (BELLONO *et al.*, 2017).



**Figura 5** – Células enteroendócrinas são biossensores capazes de detectar substâncias nocivas, metabólitos e catecolaminas. A ativação dos canais iônicos dependentes de voltagem, presentes nestas células, culmina na secreção de serotonina, a qual ativa neurônios sensoriais (BELLONO *et al.*, 2017).

Ainda, as EECs possuem toda a maquinaria necessária para fazer sinapse, incluindo a expressão de genes que codificam proteínas pré, pós e trans sinápticas. (BOHÓRQUEZ *et al.*, 2015) e exibem um processo basal denominado neurópole (**Figura 6**) (BOHÓRQUEZ *et al.*, 2014), o qual contém neurofilamentos (estruturas típicas de axons), vesículas secretoras de peptídeos e promovem o contato direto entre as EECs e neurônios que inervam o intestino delgado e cólon (BOHÓRQUEZ *et al.*, 2014) (**Figura 6A**). Especificamente, as EECs sintetizam os neurotransmissores para transmitir, instantaneamente, sinais para neurônios do nervo vago (**Figura 6**) (KAELBERER *et al.*, 2018), o maior componente do sistema nervoso autônomo parassimpático. Portanto, o circuito neuroepitelial mediado pelas EECs e nervo

vago constitui um meio de comunicação de extrema importância entre o cérebro e o intestino, possibilitando a percepção dos eventos que estão ocorrendo no lúmen e a modulação de diversas funções intestinais, em milissegundos, em resposta a estes eventos.



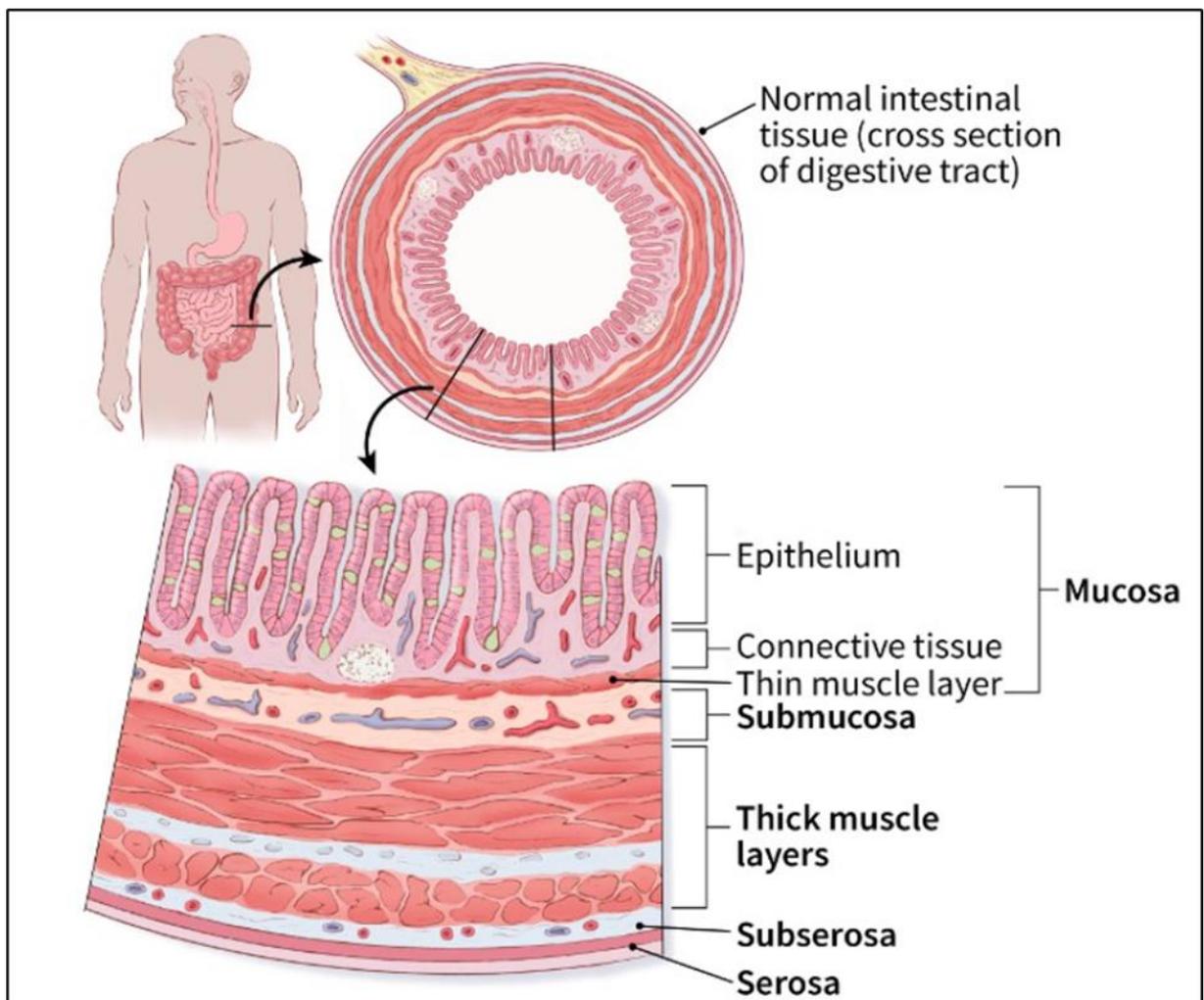
**Figura 6 – Modelo representativo dos neurópodas das células enteroendócrinas.** A) Reconstrução 3D de uma célula enteroendócrina mostrando a borda em escova, formada por microvilos e em contato com o lúmen (esquerda) e o neurópode à direita, com muitas vesículas secretoras (verde) e neurofilamentos (laranja) (BOHÓRQUEZ *et al.*, 2014). B) Esquema da transmissão de sinais entre a célula enteroendócrina (verde) e fibras neurais vagais eferentes (azul) e aferentes (laranja) (BOHÓRQUEZ *et al.*, 2015).

Os diferentes segmentos do intestino são classificados conforme sua composição celular e funções fisiológicas específicas. Assim, o intestino delgado é caracterizado por possuir especializações denominadas vilos, que aumentam a superfície de absorção e contato com nutrientes (**Figura 4**). Esta porção do intestino é composta por três segmentos: duodeno (mais próximo ao estômago), jejuno e íleo, o qual é continuado pelo cólon ou intestino grosso (Junqueira and Carneiro, 2008). Outra característica marcante do intestino delgado é presença de borda em escova, ou microvilos, na superfície apical das células epiteliais, onde estão enzimas digestivas e transportadores de nutrientes, elevando sua capacidade absorptiva (MOWAT; AGACE, 2014). Porém, o íleo participa em menor escala dos processos nutricionais e, apesar de ser o local principal para a absorção de ácidos biliares e vitamina B<sub>12</sub>, apresenta vilos menores e menor quantidade de enzimas na borda em escova (MOWAT; AGACE, 2014). Por outro lado, o cólon possui uma superfície achatada (**Figura 4**), coerente com suas funções de transporte do material fecal em estado sólido e reabsorção de água e íons (Berne and Levy, 2009; Crosnier, Stamataki and Lewis, 2006; Spence, Lauf and Shroyer, 2011; Allaire *et al.*, 2018).

Estruturalmente, o intestino é constituído por quatro túnicas principais: mucosa, submucosa, muscular e serosa. A mucosa, camada mais próxima ao lúmen é composta pelo epitélio, lâmina própria e lâmina muscular da mucosa (**Figura 7**). A lâmina própria, localizada abaixo do epitélio, é formada por tecido conjuntivo frouxo com fibrilas de colágeno e elastina

e contém glândulas, vasos linfáticos, capilares, fibras nervosas e linfonodos. A lâmina muscular da mucosa é formada por uma fina camada de músculo liso (Berne and Levy, 2009).

Em seguida, encontra-se a camada submucosa (**Figura 7**), composta por tecido conjuntivo frouxo e onde localizam-se os vasos sanguíneos, vasos linfáticos de grande calibre, nervos e o plexo submucoso ou, plexo de Meissner, do sistema nervoso entérico (Berne and Levy, 2009). A túnica muscular é composta por camadas de músculo liso (**Figura 7**). A camada muscular circular é mais próxima ao lúmen e circunda-o. A camada muscular longitudinal está mais distante do lúmen e está disposta longitudinalmente ao longo do intestino. Entre estas camadas está localizado o plexo mioentérico ou plexo de Auerbach, do sistema nervo entérico (não representado) (Berne and Levy, 2009). Por fim, a camada intestinal mais externa, denominada serosa ou adventícia (**Figura 7**) é constituída por células mesoteliais escamosas (Berne and Levy, 2009).

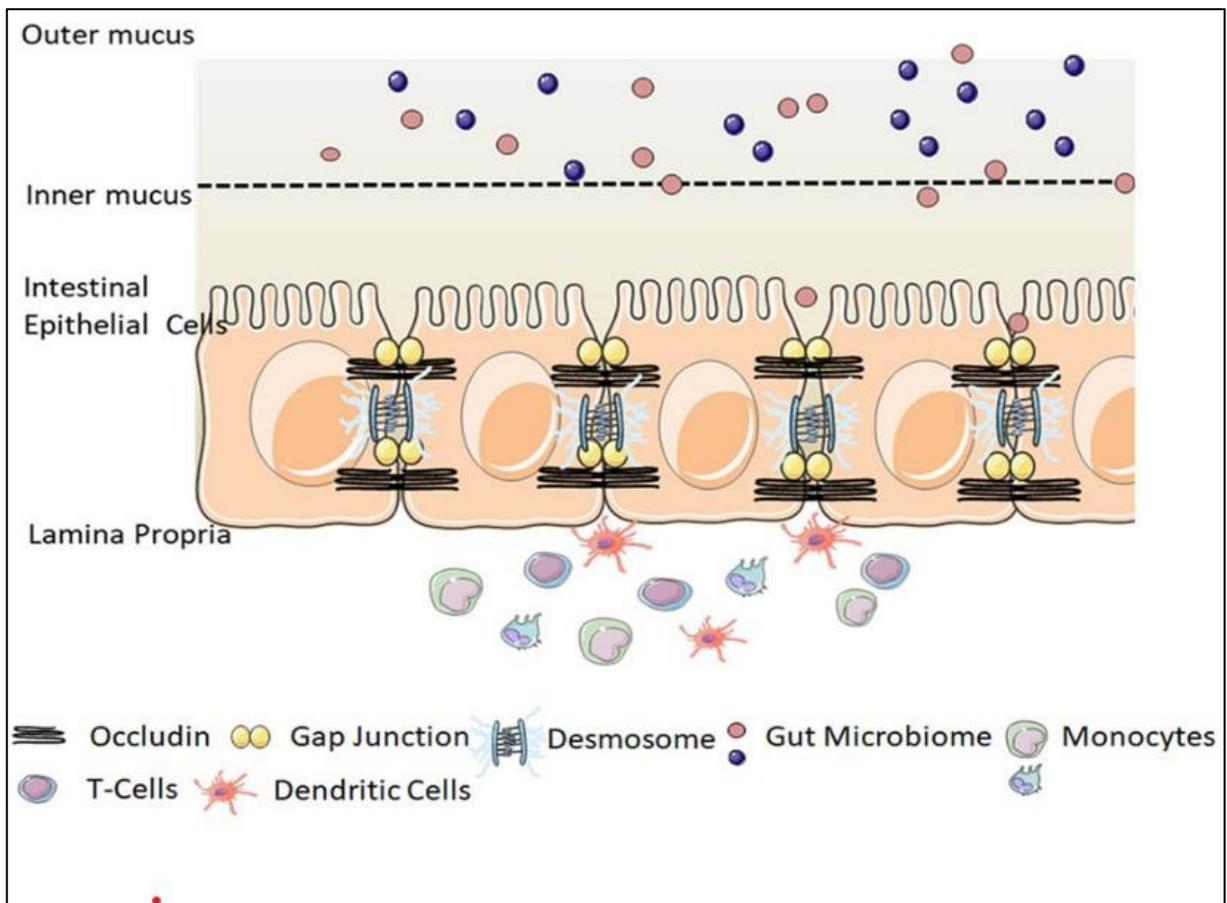


**Figura 7 – Camadas intestinais.** Imagem representativa de um corte transversal do intestino ilustrando as camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa. (*The American Cancer Society medical and editorial content team, 2018*).

A grande maioria dos processos imunológicos do intestino ocorrem na camada mucosa (MOWAT; AGACE, 2014). A resposta imune adaptativa do intestino acontece primordialmente no tecido linfoide associado ao intestino (GALT) e seu seus linfonodos. Em contrapartida, as células efectoras imunes estão distribuídas ao longo da lâmina própria e do epitélio. Na lâmina própria localizam-se as células B, células T e muitas outras da imunidade inata, a citar as células dendríticas, macrófagos, eosinófilos e mastócitos, enquanto o epitélio abriga células T, na maioria das vezes. Juntos, o epitélio e lâmina própria concentram a maior população de células T, células plasmáticas e macrófagos do corpo (MOWAT; AGACE, 2014).

Uma das funções essenciais do intestino é fazer uma barreira seletiva permeável a nutrientes, água, minerais e íons e impermeável aos microrganismos e substâncias tóxicas. A barreira intestinal compreende a camada de muco, o sistema imunológico da camada mucosa e obstáculos físicos conferidos pelo epitélio, denominados barreira epitelial (ODENWALD; TURNER, 2017) (**figura 8**). Os enterócitos são mantidos aderidos uns aos outros por estruturas físicas, como as junções estreitas, junções de adesão, desmossomos e junções de lacuna, as quais são complexos de proteínas intracelulares e transmembranas (Berne and Levy, 2009), como representado na **Figura 8**. As junções estreitas ou zonas ocludentes estão localizadas na parede apical da membrana lateral destas células, formando uma rede de ligamentos. Estas junções participam do transporte pelo epitélio e da polarização celular, impedindo a difusão de proteínas e lipídeos a partir do ápice para a região basolateral (KEITA; SÖDERHOLM, 2010; MITIC; VAN ITALLIE; ANDERSON, 2000). Por outro lado, as junções aderentes estão localizadas abaixo das zonas ocludentes e são estruturas de membrana associadas à actina e miosina (**Figura 8**). As junções aderentes são formadas por moléculas de adesão da família das caderinas e proteínas de ligação citoplasmática (KEITA; SÖDERHOLM, 2010; NUSRAT; TURNER; MADARA, 2000). Por sua vez, os desmossomos são densos pontos de adesão entre células epiteliais e são conectados por filamentos intermediários do citoesqueleto. Estes pontos são distribuídos ao longo das superfícies laterais e são frequentemente concentrados abaixo das junções de adesão (KEITA; SÖDERHOLM, 2010) (**Figura 8**). Junções de lacuna são arranjos cilíndricos e tubulares constituídos de proteínas chamadas conexinas. Estas junções funcionam

como canais intercelulares, os quais permitem que íons e moléculas pequenas passem pelas células, ligando o interior de células adjacentes (KEITA; SÖDERHOLM, 2010) (**Figura 8**).

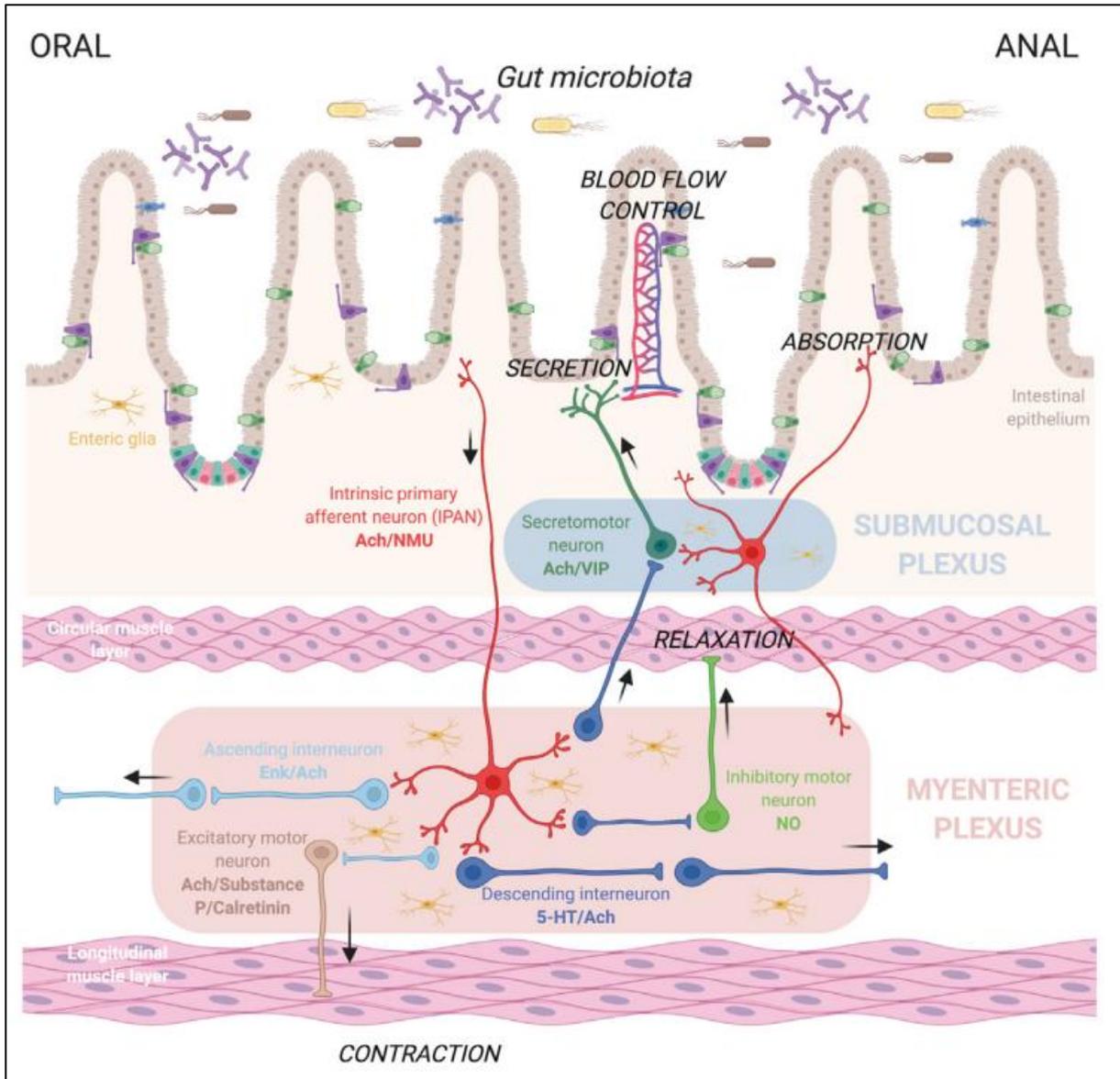


**Figura 8– Componentes da barreira intestinal.** A primeira linha de defesa do intestino consiste no muco e suas substâncias antibactericidas, que impedem o contato das bactérias luminais com as células do epitélio. Posteriormente diversas estruturas (proteínas ocludinas, junções de adesão e desmossomos) mantêm as células epiteliais fortemente aderidas entre si, contribuindo para a seletividade da permeabilidade intestinal. Finalmente, o sistema imune do intestino, representado pelos monócitos, células T e células dendríticas fazem o patrulhamento da mucosa intestinal (CHELAKKOT; GHIM; RYU, 2018).

Devido à seletividade de permeabilidade imposta pela barreira epitelial, existem meios específicos pelos quais determinadas substâncias presentes no lúmen conseguem cruzar o epitélio intestinal. Os líquidos solúveis e compostos hidrofílicos atravessam a barreira epitelial por difusão passiva dentro da bicamada lipídica ou via pequenos poros aquosos hidrofílicos, enquanto moléculas de tamanho mediano (aproximadamente 600 Da) passam pelas junções estreitas e espaços intercelulares, pela via paracelular (KEITA; SÖDERHOLM, 2010; KRUG *et al.*, 2009; WATSON, C J; ROWLAND; WARHURST, 2001). Em condições fisiológicas normais, a via paracelular é impermeável a moléculas do tamanho de proteínas constituindo uma importante barreira aos antígenos macromoleculares (KEITA; SÖDERHOLM, 2010). Por outro lado, açúcares, aminoácidos, vitaminas, e outros nutrientes são absorvidos do lúmen pela via de transporte ativo, mediado por transportadores especializados. Outro mecanismo de

transporte ativo é o processo de endocitose, pelo qual grandes peptídeos, proteínas e partículas podem ser internalizados pelas células e posteriormente expelidos (transcitose). O controle do transporte pela via de transcitose é essencial para o patrulhamento de antígenos no trato gastrointestinal (DIDIERLAURENT *et al.*, 2002; KEITA; SÖDERHOLM, 2010; PONDA; MAYER, 2005; SANDERSON; WALKER, 1993). Assim, alterações nas vias paracelular e de transcitose estão presentes em patologia intestinais (KEITA; SÖDERHOLM, 2010).

Esta complexa fisiologia, exige mecanismos de regulação muito precisos. Para isso, os processos evolutivos garantiram ao intestino um sistema nervoso próprio, denominado sistema nervoso entérico, composto por milhões de neurônios e células da glia, localizados na parede intestinal formando os plexos mioentérico e submucoso (FURNESS, JB., 2012; HOLLAND *et al.*, 2021) (**Figura 9**). Por realizar suas funções de forma independente do sistema nervoso central e da medula espinhal, o sistema nervoso entérico é popularmente conhecido como o “segundo cérebro” (GERSHON, 1998; HOLLAND *et al.*, 2021). O sistema nervoso autonômico também pode modular estes neurônios e, por este motivo, são englobados na definição do sistema nervoso entérico, sendo referidos como sistema nervoso entérico extrínseco. O sistema nervoso entérico monitora todo o lúmen intestinal, regula a absorção de nutrientes, água, e eletrólitos evita a passagem de substâncias nocivas para o interior das células (HOLLAND *et al.*, 2021; MARGOLIS; GERSHON, 2016; YOO; MAZMANIAN, 2017), além de modular o sistema imune e os movimentos intestinais (FURNESS, JB., 2012; HOLLAND *et al.*, 2021). Curiosamente, a modulação de muitas destas funções é atribuída ao sistema nervoso parassimpático.

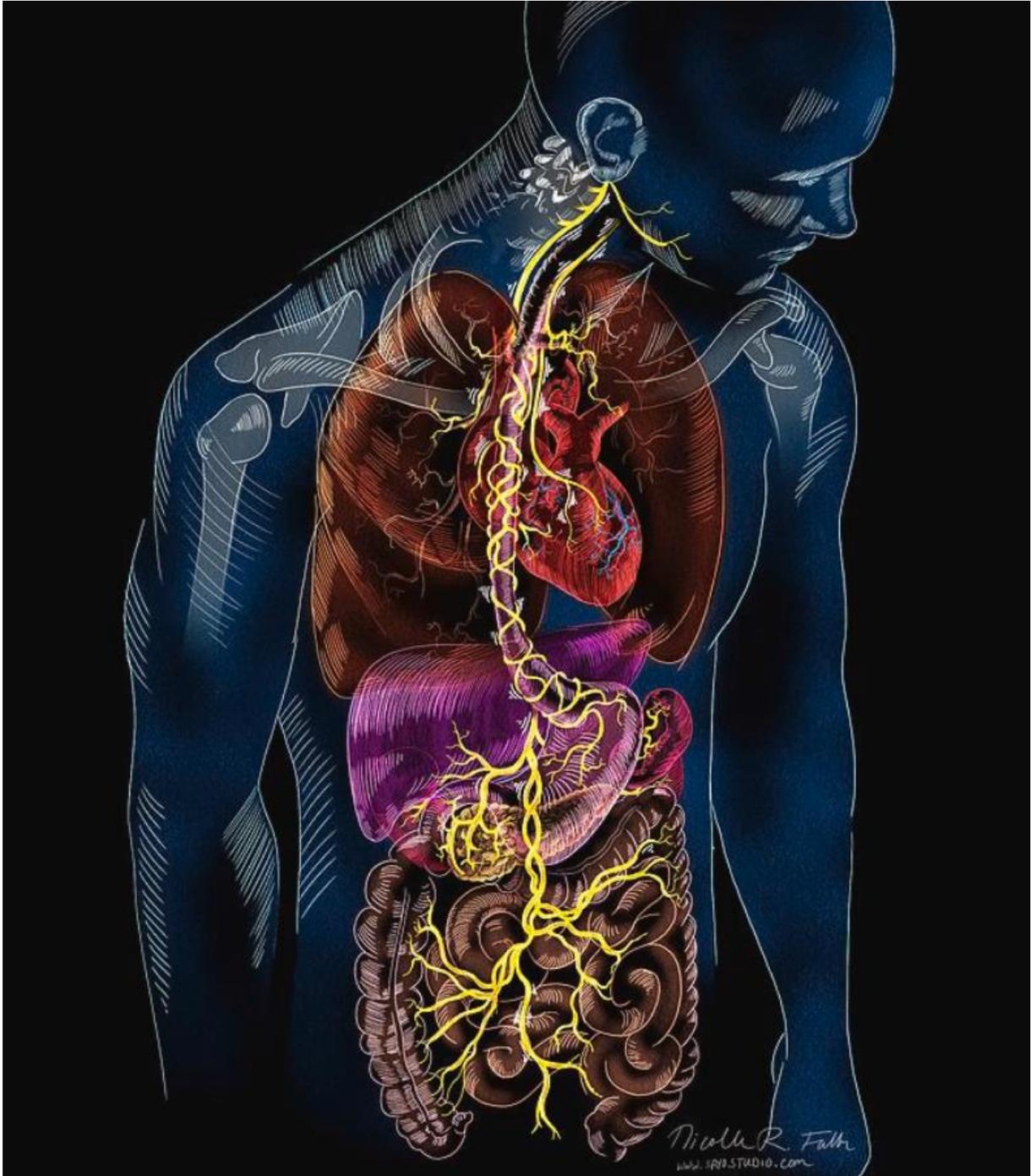


**Figura 9 – Disposição anômica do sistema nervoso entérico na parede do intestino.** A figura representa o epitélio do trato gastrointestinal, da boca ao ânus, bem como diversas células, estruturas e o sistema nervoso entérico. O sistema nervoso entérico é composto por neurônios intrínsecos aferentes (vermelho), neurônios secretores e motores (verde escuro), interneurônios ascendentes (azul claro) e descendentes (azul escuro), neurônios motores excitatórios (marrom) e neurônios motores inibidores (verde claro). Estes neurônios regulam os movimentos de contração e distensão das camadas musculares intestinais, secreção, absorção e fluxo sanguíneo. Neurônios do sistema nervoso autônomo (não representados) também compõem o sistema nervoso entérico extrínseco (JOLY; LEULIER; DE VADDER, 2021).

### 2.3. NERVO VAGO

O nervo vago é extenso, origina-se no tronco encefálico e estende-se até o cólon, innervando principalmente os órgãos torácicos e abdominais e, por este motivo, é popularmente conhecido como “o grande protetor viajante do corpo” (BERTHOUD, HANS RUDOLF; NEUHUBER, 2000; YUAN; SILBERSTEIN, 2016), como ilustrado na **Figura 10**. Os neurônios vagais constituem o principal nervo do sistema nervoso autônomo parassimpático (PAVLOV; TRACEY, 2012; THOMPSON; MASTITSKAYA; HOLDER, 2019) e a

acetilcolina (ACh) é o seu principal neurotransmissor. Porém, outras substâncias não colinérgicas e não adrenérgicas (NANC) também participam das sinalizações vagais (YUAN; SILBERSTEIN, 2016), por exemplo, o óxido nítrico (NO), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e proteína relacionada ao gene calcitonina (CGRP) (YUAN; SILBERSTEIN, 2016).



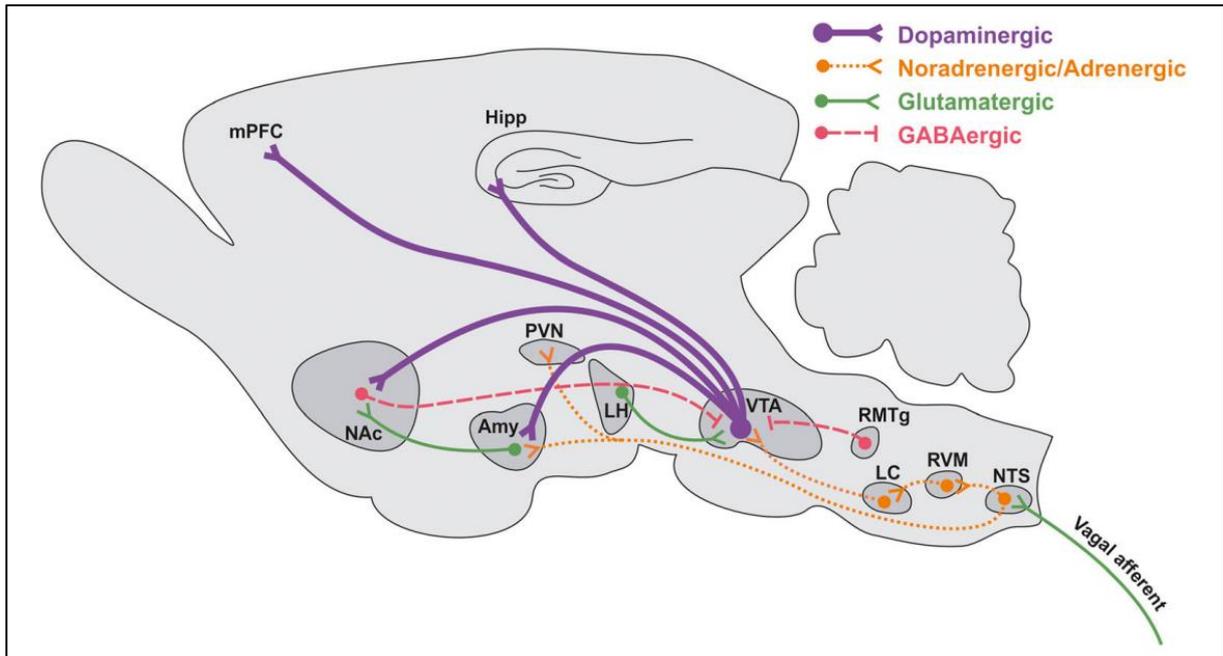
**Figura 10 – Fotografia ilustrativa do nervo vago.** O nervo vago, conhecido como X nervo craniano, origina-se no tronco encefálico e seus ramos direito e esquerdo inervam o coração, pulmão, fígado e o trato gastrointestinal (Fuller, NR, 2018).

O nervo vago é formado por fibras aferentes (sensoriais) e eferentes (motoras) e por este motivo é considerado um nervo misto. As fibras aferentes são pseudounipolares, ou seja,

projetam fibras axonais para órgãos periféricos e para o sistema nervoso central (THOMPSON; MASTITSKAYA; HOLDER, 2019). Os corpos celulares dos neurônios vagais aferentes situam-se no gânglio jugular (superior) e gânglio nodoso (inferior) e os neurotransmissores presentes nestes gânglios são o glutamato, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a substância P (MANAKER; FOGARTY, 1995; ROGES et al., 1980).

Os neurônios do gânglio jugular emitem projeções axonais para do meato auditivo externo, meninges da fossa superior, laringe e esôfago superior (parte periférica) e para o núcleo espinhal do nervo trigêmeo, no sistema nervoso central. Este núcleo comunica-se com o núcleo posteromedial ventral (VPM), no tálamo dorsal, o qual comunica-se com o córtex sensorial (YUAN; SILBERSTEIN, 2016).

No gânglio nodoso encontram-se os corpos celulares de neurônios vagais que inervam o trato respiratório, coração, órgãos abdominais e transmitem informações para o núcleo do trato solitário (NTS), no sistema nervoso central. Simultaneamente, o NTS recebe sinais provenientes do hipotálamo e amígdala. Em contrapartida, este núcleo emite projeções axonais para outras regiões centrais como medula rostral ventrolateral (RVM) núcleo parabrancúleo (hipotálamo) e amígdala (GONZÁLEZ-ARANCIBIA *et al.*, 2019; HUCH *et al.*, 2015; THOMPSON; MASTITSKAYA; HOLDER, 2019), como ilustrado na **Figura 11**. Portanto, o NTS funciona como um centro autonômico funcional-afetivo, o qual contribui para o controle homeostático de todo o corpo (NIEUWENHUIS; VOOGD; VAN HUIJZEN, 2008; THOMPSON; MASTITSKAYA; HOLDER, 2019).

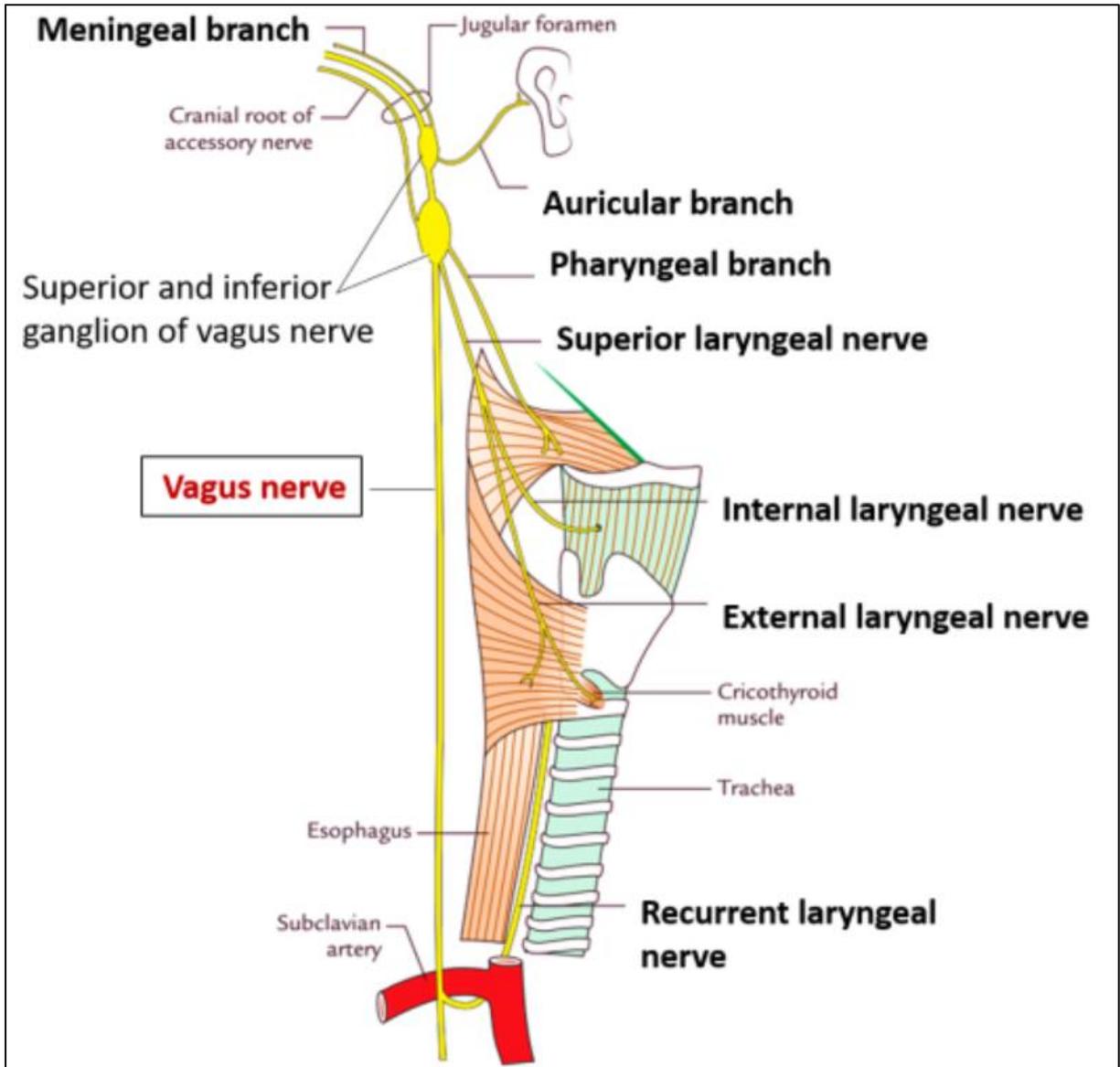


**Figura 11 – Principais interações neuronais do núcleo do trato solitário (NTS) no sistema nervoso central.** As fibras vagais aferentes, provenientes do gânglio nodoso, fazem sinapse no NTS. Este núcleo comunica-se diretamente com a medula rostral ventrolateral (RVM), amígdala (Amy) e núcleo paraventricular (PVN), por meio da sinalização noradrenérgica/adrenérgica, como ilustrado pelas linhas pontilhadas laranja (GONZÁLEZ-ARANCIBIA *et al.*, 2019). Indiretamente, o NTS interage com diversos outros centros neurais ilustrados acima, mas que não serão discutidos neste trabalho.

Os corpos celulares dos neurônios vagais eferentes pré-ganglionares estão localizados no núcleo dorsal motor do vago (DMV) e núcleo ambíguo (NA), no tronco encefálico (**Figura 12**) (THOMPSON; MASTITSKAYA; HOLDER, 2019; WATSON, CHARLES, 2012; WEAVER, 1980; YUAN; SILBERSTEIN, 2016). Os corpos celulares dos neurônios parassimpáticos pós-ganglionares localizam-se nos gânglios intramurais (FURNESS, J. B., 2009; JOHNSON, 2013; THOMPSON; MASTITSKAYA; HOLDER, 2019), os quais estão posicionados próximo ou dentro dos órgãos que inervam (THOMPSON; MASTITSKAYA; HOLDER, 2019).

O DMV integra as informações provenientes da amígdala, área postrema, hipotálamo, sistema olfatório, núcleos da rafe, e NTS (MANAKER; FOGARTY, 1995; ROGES *et al.*, 1980) (**Figura 12**). Portanto, o DMV é considerado um ponto autonômico para a modulação central da função parassimpática (THOMPSON; MASTITSKAYA; HOLDER, 2019). Por sua vez, o núcleo ambíguo abriga os corpos celulares de neurônios eferentes pré-ganglionares do nervo vago que inervam o coração, núcleo do trato solitário e o núcleo espinal do nervo trigêmeo (CÂMARA; GRIESSENAUER, 2015; REA, 2014; THOMPSON; MASTITSKAYA; HOLDER, 2019) (**Figura 12**).



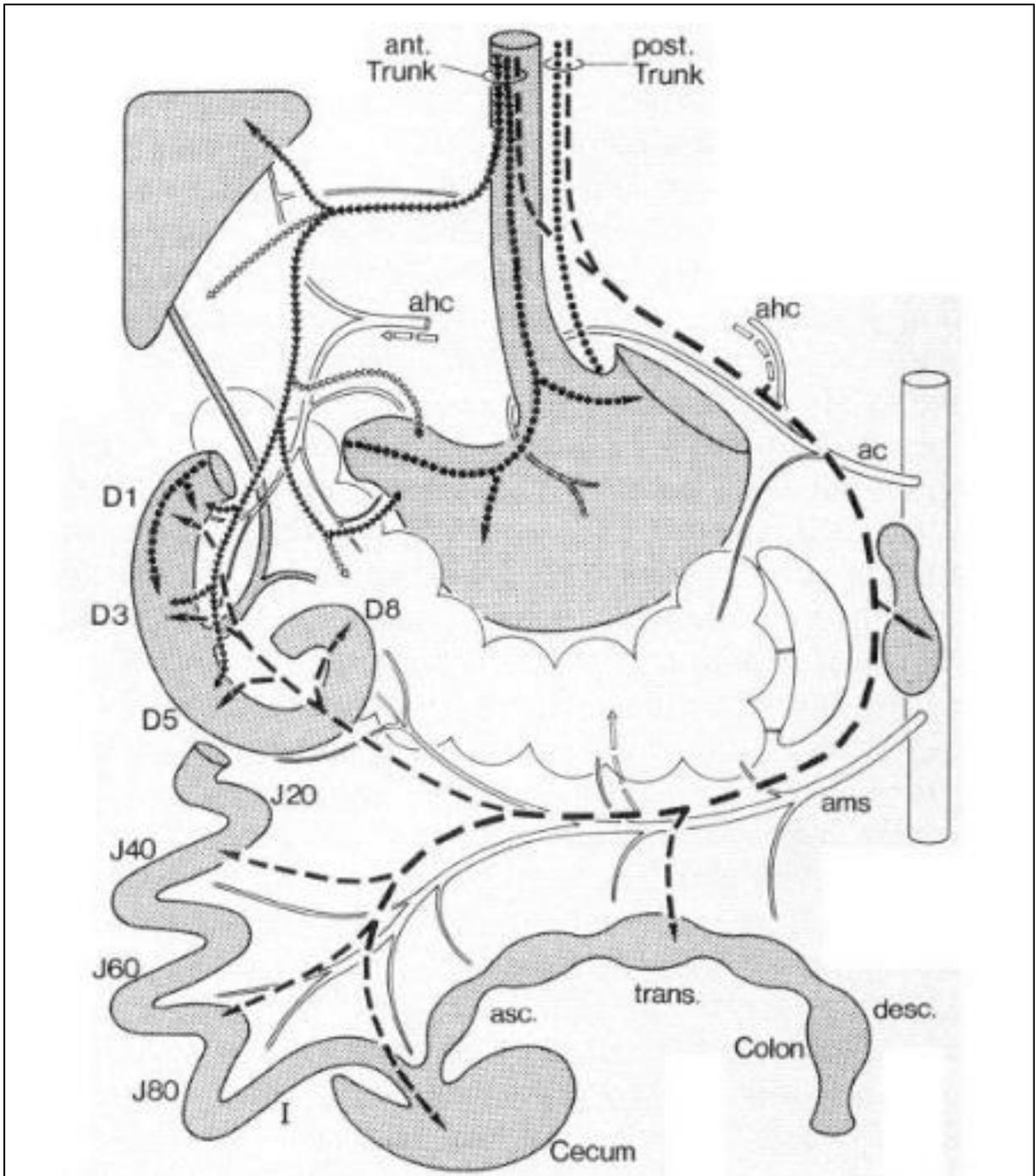


**Figura 13 – Esquema representativo da neuroanatomia cervical do nervo vago.** Após passar pelos gânglios jugular e nodoso, o nervo vago viaja ao longo da artéria carótida e veia jugular e bifurca-se em dois feixes, um dos quais forma o nervo laríngeo recorrente e o outro feixe continua seu percurso em sentido caudal para inervar as vísceras. (*Vagus Nerve , Nuclei, course, branches, structures supplied and lesion , Anatomy QA, 17-02-2022*).

Posteriormente, o nervo vago continua seu caminho descendente formando os ramos esofágico (inerva o esôfago inferior), o ramo pulmonar e o ramo cardíaco, o qual inerva a artéria aorta e o coração. As fibras vagais remanescentes passam pelo diafragma, onde dividem-se na comissura esofágica, próxima ao esôfago e inervam várias estruturas abdominais (fígado, veia porta, ductos biliares, estômago, rins, glândula adrenais, intestinos e útero) (Ruffoli et al., 2011; Yuan & Silberstein, 2016). Imediatamente após atravessar o diafragma, os ramos vagais direito e esquerdo passam a ser denominados ramos anterior e posterior, respectivamente, devido a sua posição anatômica em relação ao esôfago. Então, estas estruturas ramificam-se, originando os três grandes ramos (gástrico, celíaco e hepático) (**Figura 14**). Nota-se que que o ramo hepático,

que inerva majoritariamente o fígado, é composto exclusivamente por fibras nervosas provenientes do ramo anterior (BERTHOUD, H R; CARLSON; POWLEY, 1991). Por sua vez, os ramos celíaco e gástrico são formados por fibras originadas dos ambos os ramos anterior e posterior (BERTHOUD, H R; CARLSON; POWLEY, 1991) (**Figura 14**).

A participação de cada um destes ramos na inervação eferente do trato gastrointestinal foi elucidada por Berthoud e colaboradores (BERTHOUD, H R; CARLSON; POWLEY, 1991). O ramo gástrico inerva densamente todo o estômago e o duodeno proximal (**Figura 14**). O ramo hepático inerva o fígado, o duodeno e possui poucas projeções para a parte antral do estômago e outros seguimentos intestinais. Junto com os outros ramos, o ramo celíaco inerva o duodeno, mas proporciona, exclusivamente, a inervação do jejuno, íleo, cécum e cólon (BERTHOUD, H R; CARLSON; POWLEY, 1991) (**Figura 14**). O padrão de ramificação descrito acima parece ser um padrão presente em diversas espécies de animais, incluindo humanos. Porém, a posição, o local exato e quantidade de ramificação pode ser particular de cada indivíduo ou espécie (BERTHOUD, H R; CARLSON; POWLEY, 1991). A inervação vagal do duodeno por ambos os ramos gástrico, hepático e celíaco sugere uma grande participação parassimpática no controle das funções deste segmento.



**Figura 14 – Representação anatômica da inervação vagal do sistema gastrointestinal.** Abaixo do diafragma o ramo esquerdo do nervo vago é denominado ramo anterior, e subdivide-se em ramo hepático (linha de triângulos) e ramo gástrico anterior (linha pontilhada). O ramo esquerdo do nervo vago recebe o nome de ramo posterior, na região subdiafragmática. Este ramo origina os ramos gástrico posterior (linha pontilhada) e ramo celíaco (linha tracejada). O fígado é inervado exclusivamente pelo ramo hepático. O estômago é inervado pelo par dos ramos gástrico e parcialmente pelo ramo hepático. A porção duodenal do intestino é inervada por fibras dos ramos hepático e celíaco. O jejuno, íleo e cólon são inervados exclusivamente pelo ramo celíaco (BERTHOUD, H R; CARLSON; POWLEY, 1991).

Estruturalmente, os neurônios vagais possuem axônios mielinizados e não mielinizados e são classificados como fibras tipos A, B e C, de acordo com a velocidade de condução, a qual é proporcional ao seu diâmetro (BERTHOUD, HANS RUDOLF; NEUHUBER, 2000;

RUFFOLI *et al.*, 2011). Fibras mielinizadas do tipo A de grande calibre, conduzem informações somáticas aferentes e eferentes, enquanto as fibras de menor diâmetro transmitem as informações aferentes, provenientes dos órgãos viscerais. As fibras do tipo B transportam informações eferentes por neurônios pré-ganglionares autonômicos. Curiosamente, aproximadamente 80% das fibras vagais são do tipo C, pequenas, não mielinizadas e conduzem a maioria das informações aferentes originadas nas vísceras subdiafragmáticas (PRECHTL; POWLEY, 1990; TORRES-ROSAS *et al.*, 2014).

Além da classificação quanto ao tipo das fibras neurais, no gânglio nodoso os neurônios foram agrupados quanto ao estímulo sensorial detectável (sensores químicos, pressão, distensão, tensão e volume) e suas características moleculares e genéticas (KUPARI *et al.*, 2019). Portanto, atualmente são conhecidos 18 tipos diferentes de neurônios altamente especializados no gânglio nodoso (KUPARI *et al.*, 2019).

Fisiologicamente, o nervo vago participa da regulação das funções dos órgãos internos, por exemplo, modulando a digestão, temperatura corporal, frequências cardiovascular e respiratória, comportamento alimentar, metabolismo, sistema imunológico, dor, humor e participa de alguns reflexos como tossir, engolir, espirrar e vomitar (BABIC; BROWNING, 2014; BREIT *et al.*, 2018). A modulação destas funções acontece, em grande parte, devido a comunicação bidirecional do eixo intestino-cérebro, mediada pelo nervo vago. Assim, as fibras aferentes vagais funcionam como sentinelas, enviando ao sistema nervoso central as informações sobre o ambiente nos órgãos viscerais. No sistema nervoso central, estas informações são integradas para gerar uma resposta gerada que é enviada aos órgãos periféricos por meio das fibras vagais eferentes. Recentemente foi demonstrado que estas fibras também são importantes para processos cognitivos, incluindo comportamentos motivacionais afetivos e memória dependente de hipocampo (DAVIS *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2018; KLARER *et al.*, 2019; MANISCALCO; RINAMAN, 2018; SUAREZ *et al.*, 2018).

Surpreendentemente, a estimulação do nervo vago, utilizada para o tratamento de depressão severa e epilepsia, tem sido indicada como tratamento alternativo para a doença de Crohn (GROFF; VASUDEVAN; YAGHOUBY, 2020; REDGRAVE *et al.*, 2018). Apesar dos benefícios, a estimulação vagal causa alterações do sono e da percepção temporal em pacientes com depressão, sugerindo a possibilidade da modulação parassimpática sobre o ciclo circadiano (GROFF; VASUDEVAN; YAGHOUBY, 2020; THÖNES; OBERFELD, 2015). Corroborando esta hipótese, neurônios do gânglio nodoso expressam genes relacionados ao ciclo circadiano e fibras aferentes vagais apresentam limiar de ativação diferente ao longo do dia (KENTISH *et al.*, 2013). Além disso, o nervo vago modula algumas funções intestinais oscilatórias, como por

exemplo a permeabilidade da barreira epitelial, expressão de transportadores de nutrientes e ingestão de alimentos (PAGE, 2021; QANDEEL *et al.*, 2009; TAVAKKOLIZADEH *et al.*, 2005).

Teoricamente, um oscilador circadiano é caracterizado por (1) uma via de entrada que inclui pistas recebidas do ambiente e sua transmissão para o relógio central; (2) um oscilador central que mantém o horário circadiano e gera ritmo e (3) vias de saída por meio das quais o ritmo é convertido em controle de processos metabólicos, fisiológicos e comportamentais. (ASHER; SASSONE-CORSI, 2015; VOLLMERS *et al.*, 2009).

Diante do exposto, o nervo vago possui algumas características que o fazem um potencial candidato para compor este oscilador periférico. Primeiro, o nervo vago está em uma posição anatômica privilegiada para funcionar como a via de entrada, uma vez que suas terminações nervosas aferentes expressam muitos receptores capazes de identificar diversos estímulos presentes no lúmen intestinal. Segundo, o nervo vago pode ser o gerador dos ritmos circadianos, uma vez que expressa os genes do relógio e sua atividade oscila ao longo do dia (KENTISH; PAGE, 2015; PAGE, 2021; SCHWARTZ *et al.*, 2000). Terceiro, as fibras eferentes vagais poderia converter o ritmo gerado em controle da motilidade, secreção, digestão e absorção intestinal, assim como sensações de saciedade e comportamento alimentar (KENTISH; PAGE, 2015; PAGE, 2021; SCHWARTZ *et al.*, 2000). Portanto, a hipótese deste trabalho é que o nervo vago regula a organização temporal da fisiologia do intestino.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar se o nervo vago regula os ritmos biológicos da parte ileal do intestino.

Iremos estudar o íleo uma vez que este seguimento possui a maior concentração de células enteroendócrinas, é bastante inervado pelo nervo vago, quantidade e variedade consideráveis de elementos da microbiota.

#### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 3.2.1. Investigar se o nervo vago interfere na expressão temporal dos genes do relógio biológico no intestino delgado (íleo);
- 3.2.2. Identificar se expressão e fosforilação das proteínas intestinais flutuam ao longo do dia e se o nervo vago interfere nestas oscilações;
- 3.2.3. Avaliar quais são as vias bioquímicas associadas às proteínas que são expressas ou fosforiladas ritmicamente no intestino;
- 3.2.4. Estudar a dinâmica do ritmo de expressão e fosforilação das proteínas intestinais.

#### 4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Protocolo CEUA: 311/2016

##### 5.1. ANIMAIS

Neste projeto utilizamos camundongos machos, com idade entre 8 e 12 semanas, da linhagem C57BL/6JUnib, provenientes do Biotério Central da UFMG. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12h), com ração *ad libitum*, no biotério de experimentação animal do departamento de Biofísica e Fisiologia (ICB/ UFMG).

##### 5.2. MANIPULAÇÃO CIRÚRGICA DO CIRCUITO VAGAL

Os camundongos submetidos à procedimentos cirúrgicos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (80mg/Kg) e xilazina (15mg/Kg).

Os animais foram submetidos à cirurgia para exposição e secção do nervo vago, na região cervical esquerda e posteriormente suturados (grupo VNX). Um outro grupo de camundongos (Sham) foi submetido ao mesmo procedimento experimental, com exceção do rompimento do nervo vago, o qual permaneceu intacto. Os roedores, de ambos grupos, foram deixados em recuperação por um período de sete dias antes da realização dos testes (FONSECA *et al.*, 2019).

Cada um dos grupos experimentais Sham e VNX foram subdivididos em outros quatro grupos (ZT1, ZT6, ZT13 e ZT18). ZT refere-se a *zeitgeber*, que é uma pista ambiental capaz de sincronizar os ritmos circadianos do indivíduo. No presente estudo, este sinal sincronizador foi a luz elétrica do biotério. Assim, o ciclo claro iniciou-se às 7 horas e o ciclo escuro ocorreu a partir das 19 horas. Todavia, ZT1 indica que a coleta de tecidos foi feita 1 hora após o início do ciclo claro, ou seja, às 8 horas do dia. As coletas de tecidos dos grupos ZT6, ZT13 e ZT18 foram realizadas 6, 13 e 18 horas após o início do ciclo claro, respectivamente.

##### 5.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR) PARA ANÁLISE DO EFEITO DO NERVO VAGO SOB A EXPRESSÃO DOS GENES DO RELÓGIO NO INTESTINO.

Nesta etapa, investigamos a participação do nervo vago sob a expressão dos genes do relógio (*Arntl* - *Bmal1*, *Cry1*, *Per1*, *Per2*, *Rev-Erb $\alpha$*  e *Rora*) no intestino íleo de camundongos. Visto que a porção ileal do intestino abriga a maior população de células enteroendócrinas (BEUMER *et al.*, 2020) e possui densidade significativa de microbiota (THAISS *et al.*, 2014, 2016) e fibras vagais, (BERTHOUD, H R; CARLSON; POWLEY, 1991; BERTHOUD, HANS RUDOLF; NEUHUBER, 2000), decidimos que este é o seguimento apropriado para estudar a participação do nervo vago na sincronização do ritmo biológico do intestino.

Sete dias após as cirurgias Sham e VNX, os animais foram anestesiados como previamente descrito e eutanasiados para a coleta do tecido. Neste experimento cada um dos

grupos experimentais Sham (ZT1, ZT6, ZT13 e ZT18) e VNX (ZT1, ZT6, ZT13 e ZT18) foram compostos por 8 animais.

O material obtido foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C até o processamento das amostras. A extração do mRNA total do fígado foi feita usando o kit *Aurum total RNA minikit* (BioRad), conforme as instruções do fabricante. A concentração e qualidade do RNA foram determinadas por leitura da absorbância em 260nm em espectrofotômetro. As reações da enzima transcriptase reversa foram realizadas com 2µg de RNA total, utilizando o kit *iScript cDNA Synthesis kit* (BioRad). O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) utilizando iTAq™ Universal Sybr Green Supermix (BioRad). O gene S26, cuja expressão em nosso modelo animal é constante em todas as fases do dia, foi utilizado na normalização dos resultados de cada amostra. A expressão relativa do mRNA foi calculada pela diferença entre o *cycle threshold* (Ct) do gene alvo e o Ct do gene referência:  $\Delta Ct = (Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene referência})$ . A expressão diferencial (*fold change*) foi calculada pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Nome da sequência	Sequência (5' – 3')
<b>Mm Clock (forward)</b>	AGAACTTGGCATTGAAGAGTCTC
<b>Mm Clock (reverse)</b>	GTCAGACCCAGAATCTTGGCT
<b>Mm Rev-erb alpha (forward)</b>	TACATTGGCTCTAGTGGCTCC
<b>Mm Rev-erb alpha (reverse)</b>	CAGTAGGTGATGGTGGGAAGTA
<b>Mm Ror alpha (forward)</b>	GTGGAGACAAATCGTCAGGAAT
<b>Mm Ror alpha (reverse)</b>	TGGTCCGATCAATCAAACAGTTC
<b>Mm Cry 1 (forward)</b>	CACTGGTTCGAAAGGGACTC
<b>Mm Cry 1 (reverse)</b>	CTGAAGCAAAAATCGCCACCT
<b>Mm Per1 (forward)</b>	CGGATTGTCTATATTTTCGGAGCA
<b>Mm Per1 (reverse)</b>	TGGGCAGTCGAGATGGTGTGA
<b>Mm Per2 (forward)</b>	GAAAGCTGTCACCACCATAGAA
<b>Mm Per2 (reverse)</b>	AACTCGCACTTCCTTTTCAGG
<b>Mm Bmal1 (forward)</b>	TGACCCTCATGGAAGGTTAGAA
<b>Mm Bmal1 (reverse)</b>	GGACATTGCATTGCATGTTGG
<b>Mm S26 (forward)</b>	TCATTCGGAACATTGTAGAAGCC
<b>Mm S26 (reverse)</b>	ACAGCTCACGCAATAATGCAG

Tabela 1: Sequência dos *primers* para os genes do relógio.

#### 5.4. ESPECTROMETRIA DE MASSA

Proteômica é um método moderno de espectrometria de massa que possibilita a caracterização detalhada de processos bioquímicos, devido a sua acurácia na identificação de proteínas e suas modificações bioquímicas (CIFANI; KENTSIS, 2017). Para identificar os processos biológicos que estão sob controle do relógio circadianos são obtidos dados em larga escala para quantificar os níveis proteicos ao longo do dia. Nestes intervalos de tempo, os ritmos circadianos manifestam-se como padrões oscilatórios da expressão de proteínas em um período de aproximadamente 24 horas (HUGHES; HOGENESCH; KORNACKER, 2010; HURLEY *et al.*, 2018; HUTCHISON *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2016). A fosforilação é uma mudança pós traducional das proteínas determinante para os ritmos biológicos (BAKER *et al.*, 2009a; REISCHL; KRAMER, 2011a; ROBLES; HUMPHREY; MANN, 2017a).

Para identificar a modulação do nervo vago sob a ritmicidade dos processos fisiológicos, analisamos o proteoma e fosfoproteoma da porção ileal do intestino dos animais dos grupos Sham e VNX e cada um dos grupos experimentais Sham (ZT1, ZT6, ZT13 e ZT18) e VNX (ZT1, ZT6, ZT13 e ZT18) foram compostos por 5 animais. Após a eutanásia, o intestino foi coletado, lavado com solução salina fisiológica, congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado no freezer -80° C.

#### 5.5. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS:

Para realizar a extração das proteínas foi feita a lise, redução e alcalinização de 20 miligramas (mg) do íleo/animal. Inicialmente o tecido foi macerado utilizando-se nitrogênio líquido e cadinho de porcelana. Em seguida, foram adicionados 200 µL do tampão de lise (6 M Ureia, 2M Tiuréia, 40 mM clorocetamida, 20 mM TEAB, 0,5 M TCEP, 1X inibidor de protease, 1X inibidor de fosfatase e água miliQ). O TCEP reduz as ligações fosfato, a clorocetamida adiciona um grupo alquila para impedir que as ligações de fosfato se refaçam e o TEAB é um tampão para manter o pH da solução entre 8 e 9. Em seguida, o tecido macerado foi sonificado na frequência 40 hertz (Hz), durante 15 segundos, por 3 vezes. Posteriormente, as amostras foram deixadas em um agitador, à temperatura ambiente, por uma hora. As proteínas extraídas foram quantificadas utilizando o kit Ensaio de Proteínas Qubit Invitrogen, seguindo as instruções do fabricante. A qualidade das proteínas extraídas foi verificada por análise no espectrômetro de massa MALDI-ToF/ ToF do Laboratório Multiusuário de Proteômica (LMProt)-UFMG. Para isso, as proteínas foram previamente dessalinizadas.

##### 4.5.1. Dessalinização das proteínas

Nesta etapa, foram utilizadas colunas de cromatografia (Zip-TIP C18), as quais foram ativadas com 100% aceto nitrila e equilibrada com 0,1 % TFA. Depois, 10 µL das amostras

foram passadas pela coluna e lavadas com 0,1% TFA. As amostras foram eluídas com 40  $\mu\text{L}$  de 20% acetonitrila + 20% TFA, 100  $\mu\text{L}$  de 50% aceto nitrila e 200  $\mu\text{L}$  de 70% acetonitrila + 0,5% TFA.

As proteínas eluídas foram colocadas na centrífuga a vácuo até secarem e posteriormente foram acidificadas com 15  $\mu\text{L}$  de 0,1% TFA. Em seguida, foram plaqueados 1  $\mu\text{L}$  das amostras + 1  $\mu\text{L}$  de matriz  $\alpha$ -ciano na placa ancor-chip do espectrômetro de massa tipo MALDI-ToF/ ToF do Laboratório Multiusuário de Proteômica (LMProt)-UFMG. As proteínas ionizadas foram identificadas no espectro de 5000 a 25000 daltons.

#### 4.5.2. Digestão peptídica das proteínas:

Após a dessalinização, 200 microgramas ( $\mu\text{g}$ ) das proteínas/amostra foram digeridos enzimaticamente em peptídeos. Para isso, as amostras foram diluídas 10 vezes em uma solução de TEAB 50 milimolar, pH 8. Em seguida, foram adicionados 4  $\mu\text{g}$  da enzima tripsina Worthington para digerir as proteínas e a reação ocorreu no agitador por 16 horas, à temperatura ambiente. Após este tempo, acidificamos os peptídeos obtidos adicionando ácido fórmico para concentração final 5%, resultando no fim da reação enzimática. Posteriormente, os tubos com os peptídeos foram centrifugados a 14000 rpm, por 5 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi coletado. O pH de todas as amostras estava menor que 3, como esperado.

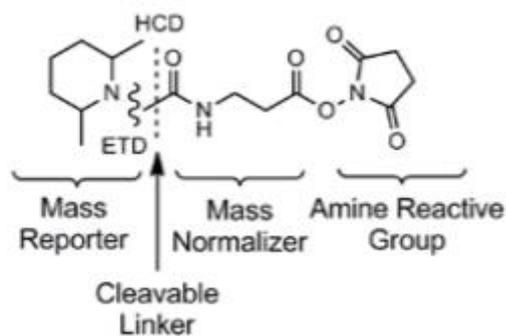
A qualidade dos peptídeos eluídos foi avaliada no espectrômetro de massa tipo MALDI-ToF/ ToF do Laboratório Multiusuário de Proteômica (LMProt)-UFMG, investigando a presença e ionização dos peptídeos dentro do espectro de 0 a 4000 daltons. Para isso, os peptídeos foram previamente dessalinizados.

#### 4.5.3. Dessalinização dos peptídeos:

Nesta etapa, foram utilizadas colunas de cromatografia (poros R2 + R3), as quais foram ativadas com 100% aceto nitrila e equilibrada com 0,1 % TFA. Depois, 10  $\mu\text{L}$  das amostras foram passados pela coluna e lavados com 0,1% TFA. As amostras foram eluídas com 40  $\mu\text{L}$  de 20% aceto nitrila + 20% TFA, 100  $\mu\text{L}$  de 50% aceto nitrila e 200  $\mu\text{L}$  de 70% aceto nitrila + 0,5% TFA. O conteúdo eluído foi colocado na centrífuga a vácuo para evaporar a solução de eluição e concentrar os peptídeos. Então, os peptídeos foram acidificados em 15  $\mu\text{L}$  de 0,1% TFA e plaqueados (1  $\mu\text{L}$  das amostras + 1  $\mu\text{L}$  de matriz  $\alpha$ -ciano) na placa ancor-chip do espectrômetro de massa. Aproximadamente 1  $\mu\text{L}$  dos peptídeos obtidos foram quantificados no *Qubit 4 Fluorometer Thermo Fisher*. Finalmente, os demais peptídeos extraídos foram deixados na centrífuga a vácuo para evaporar todos os solventes presentes na amostra e foram marcados para posteriormente serem analisados no espectrofotômetro de massa.

#### 4.5.4. Marcação dos peptídeos:

A marcação dos peptídeos foi feita utilizando o kit TMT™ 10plex *Mass Tag Labeling* (Thermo Scientific™). Este kit permite a quantificação relativa dos peptídeos por espectrometria de massa (MS). Cada um dos reagentes marcadores deste kit (TMT<sup>10</sup>-126, TMT<sup>10</sup>-127N, TMT<sup>10</sup>-127C, TMT<sup>10</sup>-128N, TMT<sup>10</sup>-128C, TMT<sup>10</sup>-129N, 129C, TMT<sup>10</sup>-130N, TMT<sup>10</sup>-C, TMT<sup>10</sup>-131) são isobáricos e possuem estrutura química composta por um grupo amina-reativa ester-HNS, um braço normalizador de massa e um indicador de massa. Para cada amostra, um único indicador de massa na região de menor massa do espectro MS/MS é usado para medir os níveis relativos de expressão proteica durante a etapa de fracionamento dos peptídeos (*TMT10plex Mass Tag Labeling Kits and Reagents Thermo Scientific – Instructions*)



**Figura 15 – Estrutura química dos reagentes marcadores TMT Thermo Scientifics.** Ilustração dos componentes funcionais (indicador de massa, normalizador de massa e grupo amina reativa) e reagentes marcadores, indicando os locais de fragmentação MS/MS por meio de dissociação por colisão de alta energia (HCD) e dissociação por transferência de elétrons (ETD). - (*TMT10plex Mass Tag Labeling Kits and Reagents Thermo Scientific – Instructions*).

Antes de serem utilizados, os reagentes marcadores TMT foram colocados em temperatura ambiente. Cada um dos marcadores foram ressuspensos em 41 µL de acetonitrila anidro. Os reagentes dissolveram em 5 minutos passando por agitações ocasionais. Em seguida, os tubos com os marcadores foram centrifugados rapidamente. Posteriormente, 15 µg dos peptídeos obtidos de cada amostra foram separados e marcados por meio da adição de 8 µL da solução de seus respectivos marcadores TMT e 20 µL de TEAB 100mM (pH entre 8,5 e 9).

Grupo/ Replicata	Sham ZT1	VNX ZT1	Sham ZT6	VNX ZT6	Sham ZT13	VNX ZT13	Sham ZT 18	VNX ZT18
R1	TMT10- 126	TMT10- 127N	TMT10- 127C	TMT10- 128N	TMT10- 128C	TMT10- 129N	TMT10- 129C	TMT10- 130N
R2	TMT10- 131	TMT10- 126	TMT10- 127N	TMT10- 127C	TMT10- 128N	TMT10- 128C	TMT10- 129N	TMT10- 129C
R3	TMT10- 130C	TMT10- 131	TMT10- 126	TMT10- 127N	TMT10- 127C	TMT10- 128N	TMT10- 128C	TMT10- 129N
R4	TMT10- 130N	TMT10- 130C	TMT10- 131	TMT10- 126	TMT10- 127N	TMT10- 127C	TMT10- 128N	TMT10- 128C
R5	TMT10- 129C	TMT10- 130N	TMT10- 130C	TMT10- 131	TMT10- 126	TMT10- 127N	TMT10- 127C	TMT10- 128N

**Tabela 2: Tabela de marcação dos peptídeos.** Cada amostra de um grupo experimental, denominada replicata, foi marcada um determinado reagente TMT.

A reação de marcação ocorreu por 1 hora, em temperatura ambiente e foi finalizada pela adição de 8 $\mu$ L da solução hidroxilamina 5%, durante 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram concentradas na centrífuga a vácuo.

Dentro de um mesmo grupo, as amostras foram denominadas replicatas e enumeradas de 1 a 5. A etapa seguinte consistiu em adicionar 15  $\mu$ L de ácido fórmico 0,1% por replicata e transferir 1,5  $\mu$ L desta solução para tubos *low-binding*. Para isso, foram utilizados 5 tubos enumerados de 1 a 5 (R1, R2, R3, R4 e R5). Em cada um destes tubos foram adicionadas suas respectivas alíquotas de replicata (de acordo com a enumeração dos tubos e das replicatas) de cada um dos grupos experimentais. Assim, o tubo R1 contém 15  $\mu$ g das replicadas 1 de todos os grupos experimentais. O tubo R2 contém 15  $\mu$ g das replicadas 2 de todos os grupos experimentais, e assim sucessivamente. Posteriormente, foram adicionados 1,35  $\mu$ L de TFA 10% aos tubos R1, R2, R3, R4 e R5. O conteúdo de cada um destes tubos foi dessalinizado com TFA, em colunas de cromatografia (ZIP-TIP C18) e a qualidade da marcação dos peptídeos foi verificada no espectrômetro de massa tipo MALDI-ToF/ ToF do Laboratório Multiusuário de Proteômica (LMProt)-UFMG.

Posteriormente, o conteúdo dos tubos (R1, R2, R3, R4 e R5) passou por um processo de purificação para fosforilação dos peptídeos para a análise do fosfoproteoma.

#### 4.5.5. Purificação dos peptídeos fosforilados usando cromatografia $\text{TiO}_2$ :

Em cada um dos tubos (R1, R2, R3, R4 e R5) foram adicionados 600  $\mu$ L de *Loading Buffer* (80% acetonitrila, 5% TFA e 1M ácido glicólico) para diluir a solução 10 vezes e  $\text{TiO}_2$  (0,81 mg de  $\text{TiO}_2$ /tubo) (THINGHOLM *et al.*, 2006). Depois, os tubos foram mantidos em

agitação por 10 minutos e centrifugados por 15 segundos. O sobrenadante foi recolhido, incubado novamente com  $\text{TiO}_2$  (0,4  $\text{TiO}_2$  mg/tubo), agitado por 10 minutos e centrifugado por 15 segundos para decantar as esferas de  $\text{TiO}_2$ . Em seguida, as esferas de  $\text{TiO}_2$  foram lavadas por meio da adição de 100  $\mu\text{L}$  de *Loading Buffer*, agitadas por 15 segundos e subsequentemente transferidas para novos tubos. Aos novos tubos foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de *Washing Buffer 1* (80% aceto nitrila, 1% TFA), os quais foram agitados por 15 segundos e centrifugados para decantar as esferas.

Posteriormente, uma nova lavagem foi realizada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de *Washing Buffer 2* (10% aceto nitrila, 0,1 % TFA), agitação por 15 segundos e centrifugação para decantar as esferas. Após essa última lavagem o sobrenadante foi recolhido em novos tubos denominados FT (*flow through*). Os peptídeos FT foram colocados na centrífuga a vácuo para secarem e adicionados 100  $\mu\text{L}$  de 0,1% de ácido fórmico.

Posteriormente, os peptídeos foram dessalinizados usando coluna de cromatografia com poros R2 e R3 e eluidos e utilizados para a análise de proteoma total. Nesta dessalinização, as colunas de cromatografia foram ativadas 100  $\mu\text{L}$  de 50% aceto nitrila por duas vezes e lavadas com 100  $\mu\text{L}$  de 0,1% ácido fórmico por 3 vezes. Em seguida as colunas foram carregadas com as amostras por 3 vezes e lavadas com 100  $\mu\text{L}$  de 0,1% ácido fórmico por 3 vezes. A eluição dos peptídeos foi feita com 40  $\mu\text{L}$  de 20% aceto nitrila + 0,1% ácido fórmico, 50  $\mu\text{L}$  de 50% aceto nitrila, 100  $\mu\text{L}$  de 70% aceto nitrila + 0,5% ácido fórmico. Os peptídeos eluidos secaram na centrífuga a vácuo.

Em paralelo à dessalinização e eluição dos peptídeos destinados à análise do proteoma total, as esferas de  $\text{TiO}_2$  remanescentes foram colocadas na centrífuga à vácuo para secarem, por aproximadamente 10 minutos. As esferas foram adicionadas à 100  $\mu\text{L}$  da solução de eluição (60  $\mu\text{L}$  de solução de amônia (28%) em 940  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  (pH 11,3) para eluir os fosfopeptídeos. A solução de eluição e as esferas reagiram por 10 minutos para aumentar a eficiência da eluição.

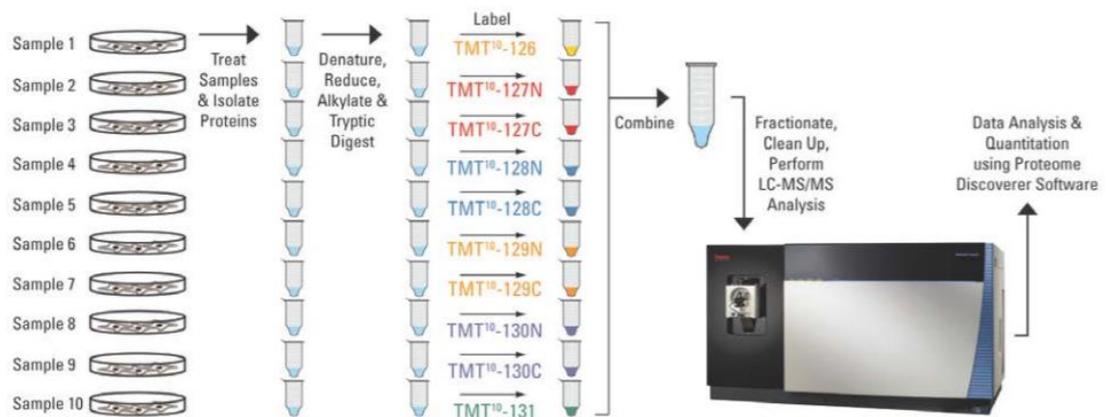
Em seguida, os fosfopeptídeos eluidos foram acidificados com ácido fórmico 100% (1  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico para cada 10  $\mu\text{L}$  de solução de eluição). A dessalinização ocorreu em colunas de cromatografia (R3), as quais foram ativadas com 100  $\mu\text{L}$  50% aceto nitrila por duas vezes e lavadas com 100  $\mu\text{L}$  0,1% ácido fórmico, por 3 vezes. As colunas foram carregadas com as amostras por três vezes e lavadas novamente com 100  $\mu\text{L}$  0,1% ácido fórmico, por 3 vezes. Finalmente, os fosfopeptídeos foram eluidos com 40  $\mu\text{L}$  de 20% aceto nitrila + 0,1% ácido fórmico, 50  $\mu\text{L}$  de 50% aceto nitrila e 100  $\mu\text{L}$  de 70% aceto nitrila + 0,5% ácido fórmico. Os fosfopeptídeos eluidos secaram na centrífuga a vácuo e foram enviados para a análise do fosfoproteoma.

Este experimento foi realizado em colaboração com o Professor Thiago Verano Braga e o discente Lucas Ribeiro, ambos do Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB/UFMG), a PhD Marcella Nunes de Melo Braga do Departamento de Bioquímica e Imunologia (ICB/UFMG) e técnica Adriana Campezzato Raabe Magalhães do Laboratório Multiusuário de Proteômica (ICB-UFMG).

#### 5.6. ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Os peptídeos e fosfopeptídeos foram enviados para *University of Sourthen Denmark* para fracionamento e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) em colaboração com o Dr Frank Kjeldsen. Para o proteoma total, as amostras foram pré-fracionadas por cromatografia de fase reversa em pH = 10 e coletadas em 10 frações diferentes, para cada amostra.

O proteoma total e o fosfoproteoma foram analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS). As amostras foram previamente adicionadas à ácido fórmico 0,1% (v/v) (solução A). Separadamente, o proteoma total e o fosfoproteoma foram analisados no equipamento Dionex Ultimate 3000 (Thermo) acoplado a um espectrômetro de massa Orbitrap Fusion Lumos (Thermo). As amostras foram colocadas em uma pré-coluna e em seguida analisadas em coluna analítica. O gradiente cromatográfico utilizado foi 2-5 % de aceto nitrila 95 % (v/v) e ácido fórmico 0,1% (v/V) por 1 minuto, 5-40 % de aceto nitrila 95 % (v/v) por 45 minutos e 45-95 % do mesmo solvente por 10 minutos (fluxo: 275 nL/min). O espectrômetro foi configurado para o modo polaridade positiva e aquisição – dependente de dados (DDA, Top-Speed). Os íons obtidos foram resolvidos em MS1 na faixa de massa 350 – 1500m/z, resolução 60.000 FWHM (do inglês *full width at half maximum*) a 200 m/z no analisador de massa Orbitrap e selecionados no quadrupolo (janela de isolamento (m/z = 1,2) para fragmentação no modo HCD (energia de colisão normalizada de 32% com 5% *Stepped Collision Energy*). A resolução dos íons fragmentados foi de 15.000 FWHM a 200 m/z.



**Figura 16 –:** Esquema da técnica proteômica utilizando o kit TMT10plex Reagente Marcadores Thermo Scientific. Proteínas foram extraídas do fêo e posteriormente desnaturadas, reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina. Em seguida, cada replicata de um grupo experimental foi marcada com um dos reagentes marcadores TMT. Em seguida, cada uma das 5 replicatas de cada grupo experimental foram combinadas em seus respectivos tubos. Em seguida, essas amostras foram fracionadas, lavadas e analisadas no LS-MS/MS. Finalmente, os dados gerados por este aparelho foram analisados por um *software* (TMT10plex Mass Tag Labeling Kits and Reagents Thermo Scientific – Instructions).

### 5.7. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos do espectrômetro de massa (RAW) foram adicionados ao programa MaxQuant (versão 1.6.1.0), o qual identificou as proteínas pesquisando as sequências experimentais no banco de dados Unirpot, referentes à *Mus musculus*, acessado em 09 de agosto de 2021 (17519 entradas). A tolerância de erro para o primeiro peptídeo pesquisado foi configurada para 20 ppm e para o principal peptídeo pesquisado foi configurada para 4,5 ppm. Incluímos a tripsina como enzima peptídica e permitimos até 2 digestões perdidas. Apenas as proteínas que continham uma taxa de falso positivo (FDR, sigla em inglês) mantida em 1% foram incluídas para as análises estatísticas. Como modificação fixa, utilizamos “carbamidometilação de cisteínas”. Configuramos as modificações variáveis do proteoma como “oxidação de Met” e “acetilação de N-terminal (proteínas)”. Para o fosfoproteoma, também consideramos como modificações variáveis os sítios de fosforilação nas serinas, treoninas e tirosinas (“*phospho (STY)*”).

Os dados gerados no MaxQuant foram posteriormente analisados no programa Perseus V.1.6.15.0 (Tyanova; Temu; Sinitcyn; et al., 2016). Para o proteoma total obtivemos inicialmente 6483 proteínas. Esses dados foram transformados para escala logarítmica base 2 ( $\log_2(x)$ ), normalizados pela mediana e filtrados os reversos e potenciais contaminantes. Normalizamos as replicatas pela média e obtivemos 6092 proteínas. Posteriormente, filtramos dentro de cada grupo, considerando valores válidos apenas as proteínas que apareceram no mínimo 5 vezes em todos os grupos e obtivemos 3545 proteínas.

Para a análise do fosfoproteoma, obtivemos inicialmente 25644 proteínas. Transformamos os dados para escala logarítmica na base 2 ( $\log_2(x)$ ), normalizamos pela mediana e filtramos os reversos e potenciais contaminantes, considerando apenas as proteínas que tiveram 75% de chance de serem fosforiladas e obtivemos 16458 proteínas. Fizemos a normalização das replicatas pela média e filtramos os grupos considerando valores válidos quando as proteínas apareceram no mínimo 3 vezes em todos os grupos e obtivemos 4059 proteínas. Decidimos considerar os valores válidos como 3 vezes, porque o fosfoproteoma gera muitos “*missing values*” ou valores não identificados. Então um maior número de proteínas identificadas pode gerar uma análise fidedigna.

Para fins estatísticos, utilizando a função “*imputation*” ou imputação, que substitui os valores não identificados por valores válidos extraídos aleatoriamente da curva de distribuição dos dados e que representam a baixa abundância dos *missing values*. Os parâmetros utilizados foram largura = 0,3 (refere-se à largura da curva Gaussiana relativa ao desvio padrão dos valores que foram identificados), redução = 1,8 (quantidade do deslocamento para baixo dos valores distribuídos aleatoriamente).

## 5.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram feitas no programa R. Para o teste de ritmicidade aplicamos o algoritmo JTK, existente no pacote R MetaCycle version 1.2.0 (HUGHES; HOGENESCH; KORNACKER, 2010; WU *et al.*, 2016) nos grupos Sham (ZT1, ZT6, ZT13 e ZT18) e VNX (ZT1, ZT6, ZT13 e ZT18). O teste JTK é ideal para análise de grande quantidade de dados com distribuição não paramétrica (HUGHES; HOGENESCH; KORNACKER, 2010). Consideramos significativo o valor  $p < 0,05$ .

Posteriormente, identificamos os nomes dos genes (EntrezID) que codificam as proteínas que oscilam a partir do identificador único das proteínas (Uniprot) (Uniprot. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uploadlists/>. Acesso: 05 Jan 2022).

A partir dos genes que codificam as proteínas é possível fazer o estudo do enriquecimento de vias bioquímicas, no banco de dados KEGG. O enriquecimento determina quais são as vias bioquímicas associadas aos genes. Para realizar o enriquecimento, selecionamos os genes referentes às proteínas que oscilaram e apresentaram  $p_{adjusted} < 0,05$ . Neste estudo, utilizamos o pacote R *clusterProfiler* versão 4.2.1 e o configuramos para a espécie *Mus músculos*, com o valor do corte definido como  $p < 0,05$ . Para determinar o padrão de expressão, ao longo do dia, das proteínas que constituem as vias enriquecidas, utilizamos o teste estatístico 2way ANOVA. Este procedimento foi aplicado para o enriquecimento de vias do proteoma total e fosfoproteoma.

Ademais, verificamos se o nervo vago impacta a expressão de proteínas em um determinado horário do dia, ou seja, nos ZT1, ZT6, ZT13 e ZT18. Assim, por meio do pacote R *stats* versão 4.2.1, aplicamos o test t de student, nas proteínas identificadas após a análise inicial dos dados. Consideramos estatisticamente significativo o valor  $p < 0,05$ , entre os grupos Sham e VNX, em cada um dos quatro tempos do estudo. Estes dados foram utilizados para fazer a análise do enriquecimento das vias bioquímicas relacionadas aos genes no banco de dados KEGG (como descrito previamente), utilizando o pacote R *clusterProfiler* versão 4.2.1, configurado para a espécie *Mus musculus* e valor do corte definido como  $p < 0,05$ . Esta análise foi feita para o proteoma total e fosfoproteoma.

A análise estatística da expressão dos genes do relógio foi feita pelo teste t Student.

## 5. RESULTADOS

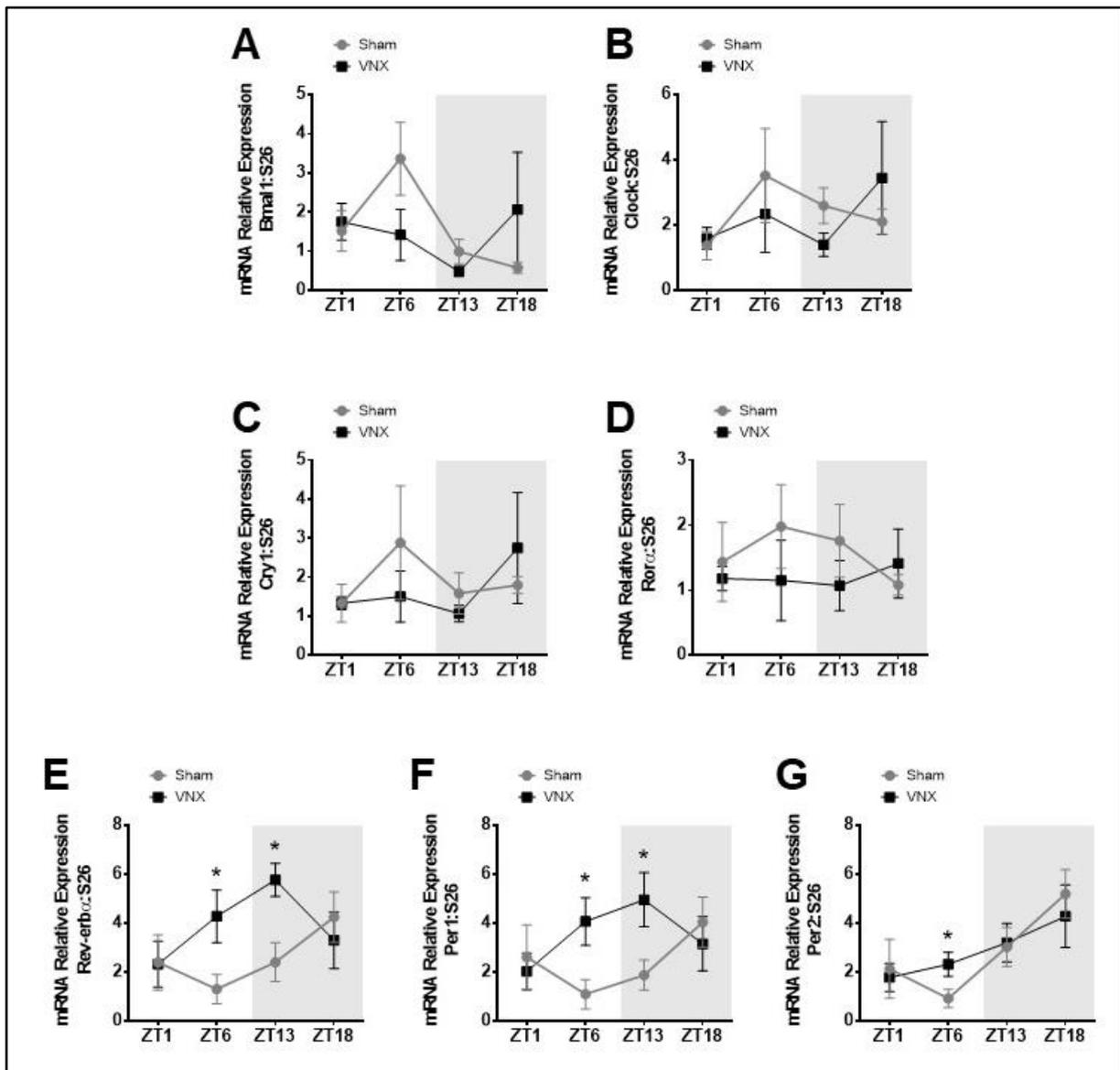
### 6.1. O NERVO VAGO ALTERA A EXPRESSÃO DE GENES DO RELÓGIO NO INTESTINO DELGADO

Com o objetivo de elucidar a participação parassimpática sob a modulação do ritmo circadiano intestinal, inicialmente verificamos a expressão dos principais genes do relógio (Bmal1, Clock, Cry1, Per1, Per2, Rev-erba e Rora) nos grupos Sham e VNX, ao longo do dia (ZT1, ZT6, ZT13 e ZT18), por meio da técnica RT-PCR.

Assim, observamos que a expressão destes genes parece oscilar ao longo do dia nos animais do grupo Sham (**Figura 17**). Especificamente, os genes Bmal1, Clock, Cry1 e Rora exibem uma tendência de maior expressão durante a fase clara do dia, no ZT6, e menor expressão durante a fase escura, no ZT18 (**Figura 17 A-D**). Por sua vez, a vagotomia alterou o perfil de oscilação destes genes, nos quais o pico de expressão mudou do ZT6 para o ZT18, mostrando que ocorreu a mudança de fase da expressão destes genes (**Figura 17 A-D**). Entretanto, o padrão de expressão exibido em ambos os grupos não foi estatisticamente significativo.

Em contraste, os genes Per1, Per2 e Rev-erba parecem ter a maior expressão durante a fase escura do dia, no ZT18, e menor abundância no ZT6, nos animais com inervação vagal intacta, (**Figura 17 E, F e G**). Curiosamente, a interrupção da comunicação intestino-cérebro (grupo VNX) elevou a expressão dos genes Rev-erba e Per1 nos ZT6 e ZT13, horários nos quais os genes estavam pouco abundantes no intestino dos animais do grupo Sham (**Figura 17 E e F**). Concomitantemente, a vagotomia aumentou a expressão do gene Per2 no ZT6, horário de menor abundância do gene no grupo Sham (**Figura 17 G**).

Juntos, estes dados sugerem que a vagotomia desorganizou temporalmente a expressão dos genes do relógio no íleo de camundongos, indicando a possível relação do eixo intestino-cérebro com os ritmos biológicos do intestino.



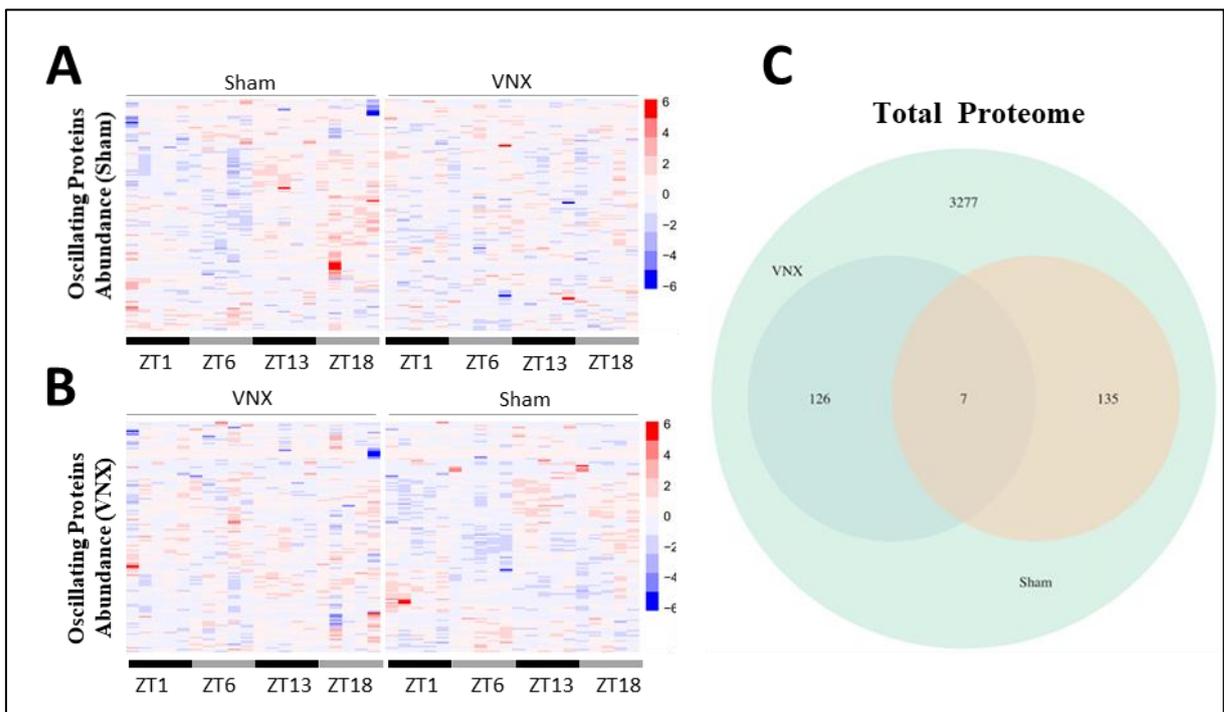
**Figura 17– Modulação da expressão dos genes do relógio pelo nervo vago.** A vagotomia diminuiu a expressão dos genes A) Bmal1, B) Clock, C) Cry1 e D) Rora no ZT6. Além disso, a diminuição do tônus colinérgico provocou o aumento da expressão dos genes E) Rev-erba e F) Per1, nos ZT6 e ZT13, e do gene PER2, no ZT6. Linhas cinza representam o grupo Sham. Linhas pretas indicam o grupo VNX. Testes estatísticos: Teste t de Student, \* para  $p < 0,05$ .

## 6.2. O NERVO VAGO REGULA O RITMO CIRCADIANO E INFRADIANO DA ABUNDÂNCIA DO PROTEOMA INTESTINAL

Diante dos milhares de proteínas intestinais, seria pouco provável inferir, por meio da literatura científica, e testar todas as que poderiam ser expressas ritmicamente sob regulação do nervo vago. Portanto, optamos por analisar o proteoma total do íleo dos animais dos grupos Sham e VNX nos tempos ZT1, ZT6, ZT13 e ZT18.

Utilizando a técnica de proteômica associada à espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida LC-MS, identificamos no íleo de camundongos 17519 fragmentos de peptídeos que foram relacionados à 6483 proteínas, das quais 3277 foram identificadas em todas

as amostras do experimento. Detectamos que a abundância de 135 proteínas, ou seja, aproximadamente 4,12% do proteoma total intestinal oscila majoritariamente em ritmo circadiano, mas também observamos a presença de ritmo infradiano, em condições fisiológicas normais (Sham), como avaliado pelo teste de ritmicidade JTK (**Figura 18**). Supreendentemente, a vagotomia interrompeu esta ritmicidade ao mesmo tempo em que provocou a variação temporal da abundância de outras 126 proteínas (3,84 % do proteoma total intestinal) (**Figura 18**). Apenas sete proteínas foram ritmicamente expressas em ambos os grupos.



**Figura 18– O nervo vago regula o ritmo de abundância das proteínas do íleo.** Os mapas de calor representam a flutuação das proteínas ao longo do dia. Neste mapa, o diagrama de cores representa a concentração das proteínas identificadas, onde as cores quentes representam maior abundância e as cores frias representam menor quantidade. A) A porção do proteoma que oscila no grupo Sham não oscila no grupo VNX. B) Em contrapartida, quando o nervo vago é seccionado (VNX), outra fração do proteoma intestinal apresenta ritmicidade, o que não ocorria previamente (Sham). C) O diagrama de Venn representa as 3277 proteínas identificadas no experimento (círculo verde) e a quantidade de proteínas com abundância ritmica detectadas nos grupos Sham e VNX, círculos rosa e azul, respectivamente. Teste estatístico: Teste de ritmicidade JTK.

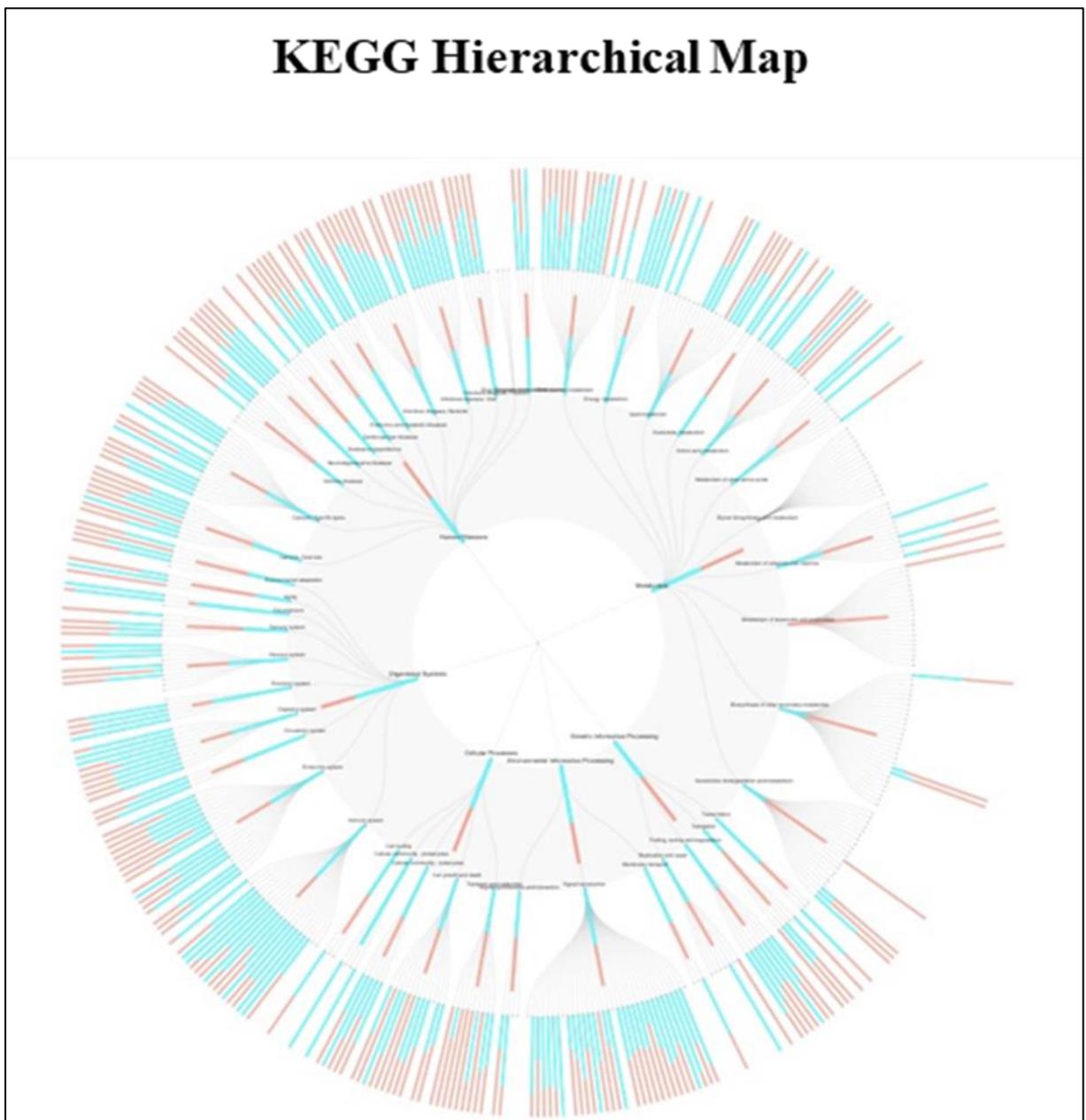
Portanto, mostramos que o nervo vago regula os ritmos do proteoma do íleo, sugerindo que a comunicação entre o eixo intestino-cérebro, mediada pelo nervo vago esquerdo, organiza temporalmente a abundância das proteínas intestinais.

### 6.3. AS PROTEÍNAS OSCILANTES ESTÃO ASSOCIADAS ÀS VIAS BIOLÓGICAS INTESTINAIS

Devido à marcante modulação do nervo vago sobre o ritmo circadiano do proteoma intestinal, exploramos quais são as vias biológicas relacionadas às proteínas reguladas pelo nervo vago.

Em vista disso, analisamos a hierarquia funcional da Enciclopédia de Genes e Genomas Kyoto (KEGG) associado às proteínas identificadas em ambos os grupos (Sham e VNX). Para esta análise, utilizamos os valores p ajustados inversos obtidos no teste de ritmicidade JTK e o banco de dados KEGG BRITE para gerar o mapa hierárquico (<https://www.genome.jp/kegg/brite.html>).

O mapa hierárquico gerado mostrou que as proteínas cuja abundância oscila ao longo do dia estão associadas à diversas vias biológicas do KEGG, as quais são distintas entre os grupos Sham e VNX (**Figura 19**).

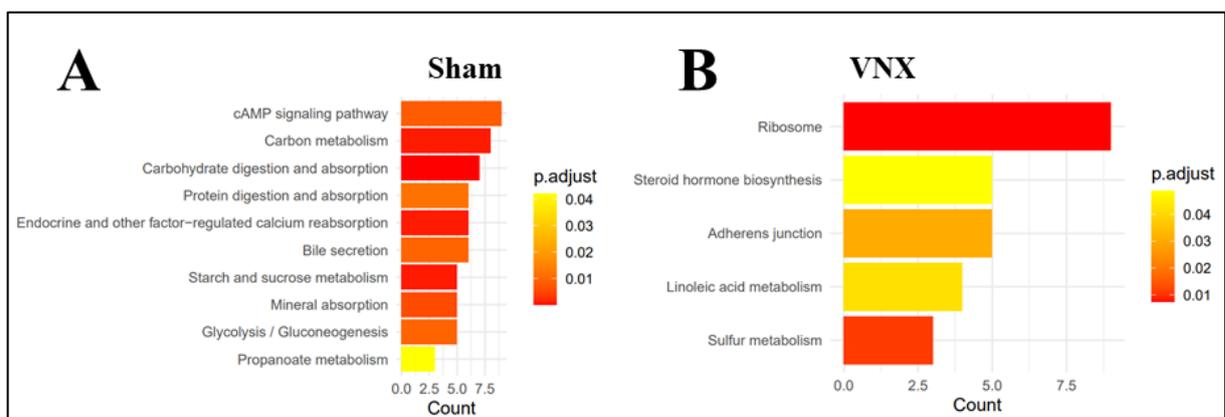


**Figura 19 – Mapa hierárquico do KEGG.** Este mapa mostra que as proteínas, cuja abundância oscila ao longo do dia, estão associadas a determinados processos biológicos (círculos internos), que são associados a diversas vias fisiológicas, diferentemente representadas entre os grupos Sham (linhas azuis) e VNX (linhas vermelhas).

Em seguida, investigamos quais são estas vias utilizando a análise de enriquecimento do KEGG, a qual é uma ferramenta estatística utilizada para identificar as vias que são significativamente representadas dentro de uma lista de genes, por meio de vários testes estatísticos que consideram o número de genes detectados no experimento, o rank relativo destes genes e o número de genes anotados em uma via de interesse (REIMAND *et al.*, 2019). Foram consideradas diferencialmente representadas as vias com  $p_{ajusted} < 0,05$ .

Assim, constatamos que 10 vias biológicas foram estatisticamente representadas pelas proteínas oscilantes do grupo Sham: via de sinalização da adenosina 3,5-monofosfato cíclico (AMPC), metabolismo do carbono, absorção e digestão de carboidratos, digestão e absorção de proteínas, reabsorção de cálcio regulada por fatores endócrinos e outros fatores, secreção biliar, metabolismo do amido e da sacarose, absorção mineral, gliconeogênese/glicólise e metabolismo do propanoato (**Figura 20A**). Dessas, as vias AMPC, metabolismo do carbono e absorção e digestão de carboidratos foram as mais representadas.

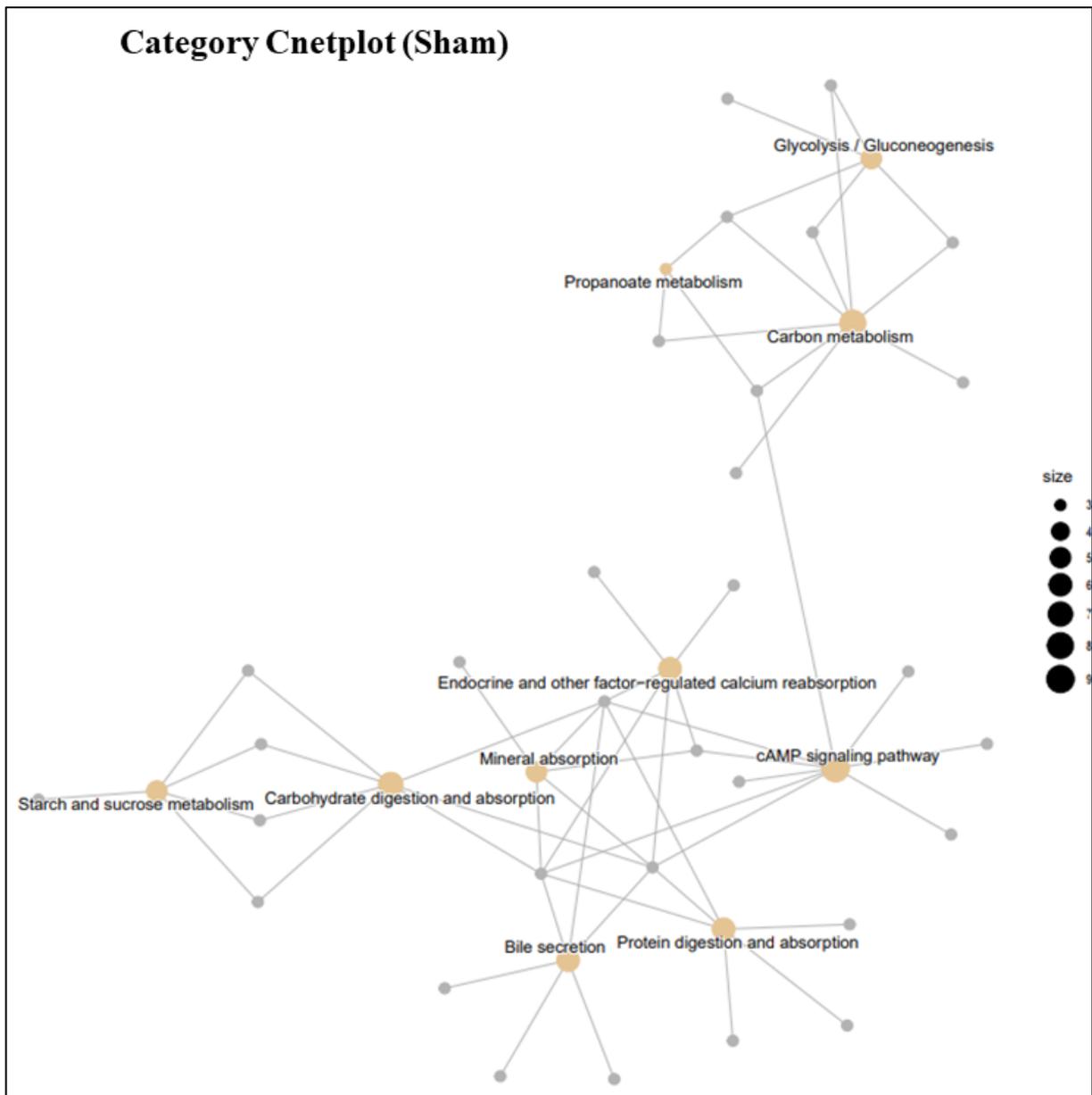
Como esperado, as vias enriquecidas no grupo VNX divergem das vias identificadas no grupo Sham. No grupo vagotomizado, as proteínas rítmicas estão relacionadas às vias bioquímicas: ribossomo (a mais frequente), biossíntese de hormônios esteroides, junções aderentes, metabolismo do ácido linoleico e metabolismo do enxofre (**Figura 20B**).



**Figura 20 – Enriquecimento de vias no proteoma total do íleo.** Vias bioquímicas diferencialmente representadas na porção oscilante do proteoma ileal de camundongos A) Sham e B) VNX. O diagrama de cores indica que quando mais quente é a cor, menores são os valores de  $p$  ajustados encontrados. Os números da contagem (*count*) referem-se ao número de vezes que as proteínas relacionadas à uma determinada via foram identificadas no experimento.

#### 6.4. A COMUNICAÇÃO ENTRE O INTESTINO-CÉREBRO, MEDIADA PELO NERVO VAGO, É IMPORTANTE PARA CONECTAR VIAS BIOQUÍMICAS INTESTINAIS

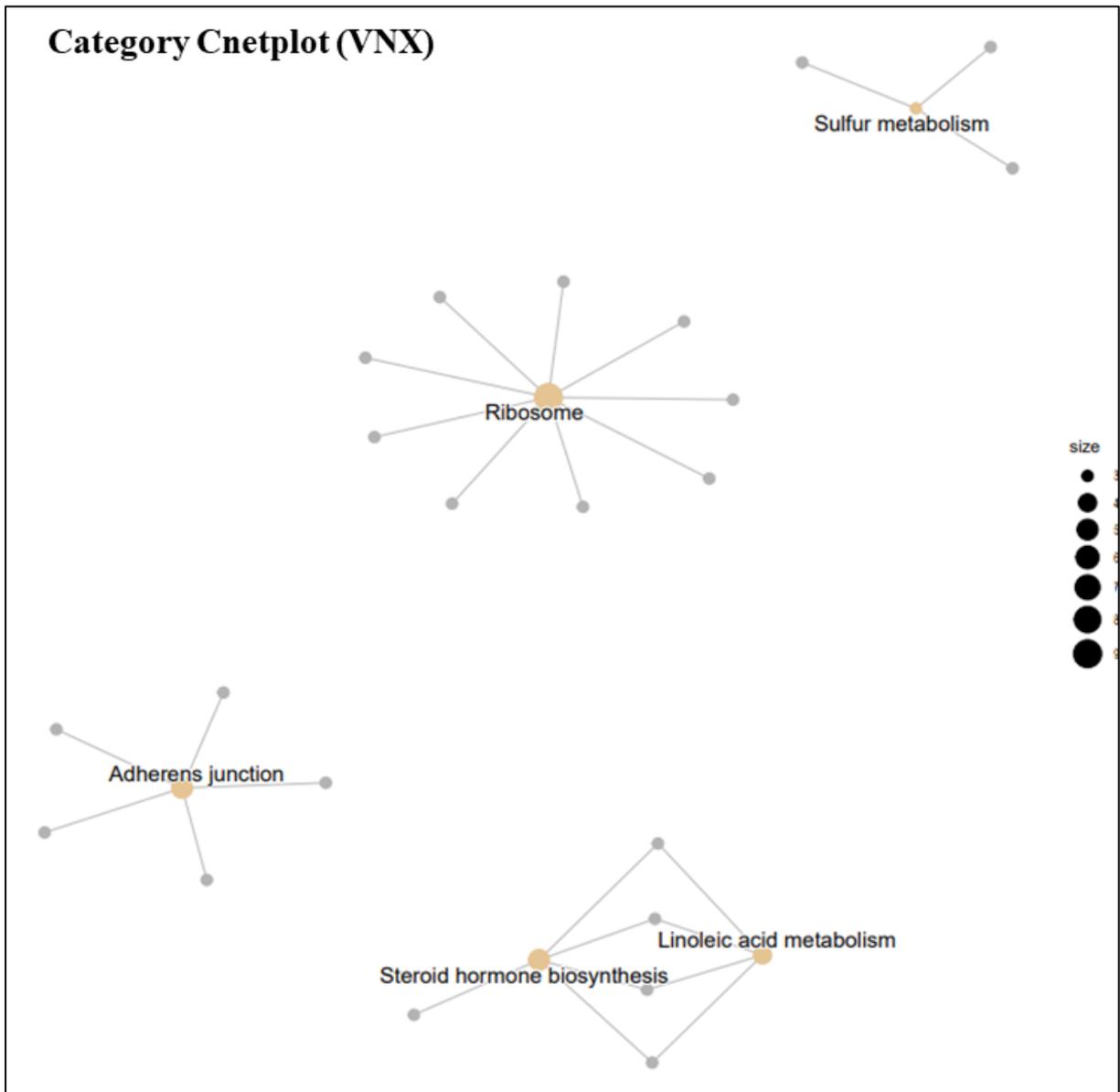
Para entender a relação entre as proteínas ritmicamente expressas e as vias enriquecidas utilizamos o diagrama de categoria de rede (do inglês *Category NetPlot*, cnetplote) (**Figuras 21 e 22**). Assim, constatamos que no grupo Sham as vias enriquecidas estão conectadas em uma grande rede de interação. Esta conexão é formada por proteínas que participam simultaneamente de mais de uma das vias enriquecidas (**Figura 21**).



**Figura 21 – Diagrama de categoria das redes (Cnetplot) do grupo Sham.** Este diagrama representa a conexão entre as vias bioquímicas devido a participação das proteínas em uma ou mais vias simultaneamente. Neste caso observamos que as vias estão conectadas entre si, formando uma rede. Esta interação formou dois agrupamentos, denominados módulos funcionais. Na parte superior da figura o módulo funcional formado está relacionado às vias metabólicas. Por outro lado, na parte inferior do diagrama, o módulo funcional refere-se,

principalmente, às vias de digestão/absorção. Os diâmetros dos círculos laranja indicam a representatividade das proteínas associadas àquelas vias na porção rítmica do proteoma.

Por outro lado, a rede de conexão entre as vias biológicas não existe nas no grupo VNX, exceto entre as vias de biossíntese de hormônios esteroides e metabolismo do ácido linoleico, as quais compartilham algumas proteínas (**Figura 22**).



**Figura 22 – Diagrama de categoria das redes (Cnetplot) do grupo VNX.** Este diagrama identifica como as vias bioquímicas enriquecidas estão relacionadas entre si devido ao compartilhamento uma ou mais proteínas. Quando a comunicação entre o eixo intestino-cérebro foi interrompida pela vagotomia (grupo VNX), apenas duas das vias enriquecidas estavam conectadas, formando apenas um pequeno módulo funcional. Os diâmetros dos círculos laranja indicam a representatividade das proteínas associadas àquelas vias na porção rítmica do proteoma.

Paralelamente, observamos que o agrupamento das vias enriquecidas no grupo Sham, formou 2 conjuntos biológicos denominados módulos funcionais (**Figura 21**). O menor módulo foi relacionado aos processos metabólicos e é composto pelas vias do metabolismo do

propanoato, metabolismo do carbono, glicólise e gliconeogênese. Por sua vez, outro módulo foi associado aos processos de absorção e digestão, sendo formado pelas vias reabsorção de cálcio regulada por fatores endócrinos e outros fatores, digestão e absorção de carboidratos, secreção biliar, absorção de minerais, via de sinalização do AMPc, absorção e digestão de proteínas e metabolismo do amido e da sacarose, (**Figura 21**). Contudo, no grupo VNX identificamos apenas um módulo funcional, formado pelas vias biossíntese dos hormônios esteroides e metabolismo do ácido linoleico (**Figura 22**).

A existência dos módulos funcionais pode indicar que as vias que o compõem possuem mecanismos de regulação semelhantes, participam de processos biológicos correlacionados ou que estão temporalmente interligadas.

#### 6.5. PANORAMA DA OSCILAÇÃO DAS PROTEÍNAS ENRIQUECIDAS NO PROTEOMA TOTAL DO ÍLEO

De forma inédita, fornecemos o panorama da oscilação circadiana e infradiana das proteínas associadas às vias enriquecidas no proteoma do íleo, com o objetivo de fornecer informações que serão relevantes para o entendimento futuro da cronobiologia intestinal. Estes resultados foram obtidos utilizando o teste estatístico de ritmicidade JTK. Este teste foi desenhado para identificar oscilações temporais em dados de larga escala e prediz a fase, amplitude e período destes ciclos (HUGHES; HOGENESCH; KORNACKER, 2010). Portanto, a seguir descrevemos os resultados mencionando o período e o horário de maior abundância das proteínas fornecidos pelo teste JTK.

A maioria das proteínas que integram as vias enriquecidas no grupo Sham apresentaram um ritmo circadiano característico, com período de 24 horas e abundância máxima no ZT18, fase escura do dia (**Figura 23**).

Na via glicólise/gliconeogênese (**Figura 23A**) a ritmicidade das proteínas aconteceu em ritmo circadiano, como no padrão descrito acima. Esta via foi constituída pelas proteínas enolase-beta (P21550, gene *Eno3*), fosfoenolpiruvato carboxiquinase citosólica GTP (Q9Z2V4, gene *Pck*), fosfoglicerato quinase 1 (P09411, gene *Pgk1*), aldolase B de de frutose-bifosfato (Q91Y97, gene *Aldob*) e acetil-coenzima A sintetase citoplasmática (Q9QXG4, gene *Acss2*). Interessantemente, a proteína Q9QXG4 participou de todas as vias do módulo funcional metabólico do grupo Sham.

De forma semelhante, na via metabolismo do propanoato (**Figura 23B**), a proteína peroxissomal acil-coenzima A oxidase 1 (Q9R0H0 *Acox1*) oscilou em um período de 24 horas, porém, sua acrofase ocorreu no ZT15. Não obstante, a abundância da proteína hidrolase de 3-hidroxiisobutiril-CoA, mitocondrial (Q8QZS1, *Hibch*) não apresentou ritmo circadiano, uma

vez que seu período foi de 18 horas e seu pico foi no ZT0. Esta proteína também foi relacionada à via metabolismo do carbono (**Figura 23C**). A proteína Q9R0H0 também participou simultaneamente das vias metabolismo do carbono (**Figura 23C**) e sinalização do AMPc (**Figura 23F**).

Além disso, as proteínas malato desidrogenase, mitocondrial (P08249, gene Mdh2) e dihidroxiacetona quinase dependente de ATP; FAD-AMP liase cíclico (Q8VC30, gene Dakda), integrantes da via metabolismo do carbono (**Figura 23 C**), oscilaram em ritmo circadiano, com abundância máxima nos ZTs 18 e 15, respectivamente.

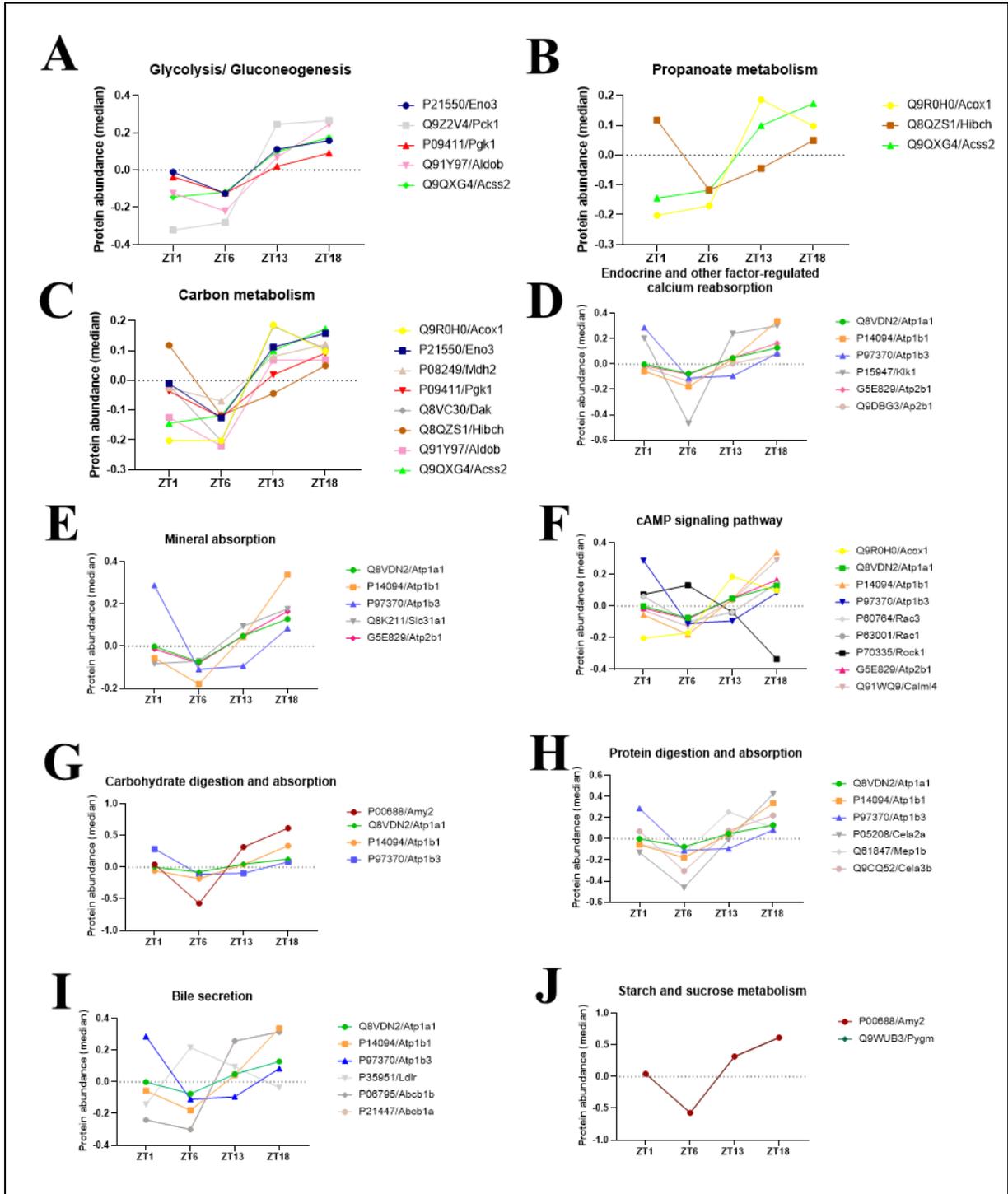
Por sua vez, as vias bioquímicas que participam do módulo funcional absorção/digestão do grupo Sham (**Figura 23D-J**), possuem pelo menos três proteínas em comum, salvo a via metabolismo do amido e da sacarose. A abundância de duas destas proteínas, subunidade alfa-1 de ATPase transportadora de sódio/potássio (Q8VDN2, gene Atp1a1) e subunidade beta-1 da ATPase transportadora de sódio/potássio (P14094, gene Atp1b1) exibiram ritmo circadiano padrão do grupo Sham. Porém, a flutuação da proteína subunidade beta-3 da ATPase transportadora de sódio/potássio (P97370, gene Atp1b3) não ocorreu em ritmo circadiano, uma vez que seu período foi de 18 horas e sua abundância máxima ocorreu no ZT0.

Neste módulo, as proteínas caliceína-1 (P15947, gene Klk1), ATPase 1 transportadora de cálcio da membrana plasmática (G5E829, gene Atp2b1), subunidade beta do complexo AP-2 (Q9DBG3, gene Ap2b1), integrantes da via reabsorção de cálcio dependente de fatores endócrinos e outros fatores (**Figura 23D**), proteína 1 de absorção de cobre de alta afinidade (Q8K211, gene Slc31a1), da via de absorção mineral (**Figura 23 E**), alfa-amilase pancreática (P00688, gene Amy2), da via absorção e digestão de carboidratos (**Figura 23G**) e glicogênio fosforilase, forma muscular (Q9WUB3, gene Pygm), da via metabolismo do amido e da sacarose (**Figura 23 J**), apresentaram ritmo circadiano, sendo sua acrofase no ZT18.

Particularmente, a abundância das proteínas substrato 1 de toxina botulínica C3 relacionado a Ras, substrato 3 de toxina botulínica C3 relacionado a Ras (P63001 e P60764, genes Rac1 e Rac3), proteína quinase 1 associada a Rho (P70335, gene Rock1) e proteína calmodulina tipo 4 (Q91WQ9, gene Calml4), exclusivas da via sinalização do AMPc (**Figura 23F**), oscilou em ritmo circadiano, entretanto, seus picos ocorreram nos ZTs 21, 6 e 18, respectivamente.

Similarmente, na via digestão e absorção de proteínas (**Figura 23H**), as proteínas calmodulina tipo 4 (P05208, gene Cela2a) e meprin A subunidade beta (Q61847, Mep1) oscilaram em um período de 24 horas, mas a abundância máxima foi detectada nos ZTs 18, 15 e 21, nesta ordem.

Finalmente, na via secreção biliar, as proteínas de resistência a múltiplas drogas 1A e 1B (P21447 e P06795, genes *Abcb1a* e *Abcb1b*) oscilaram exatamente como o padrão do ritmo circadiano do grupo Sham. Contudo, a abundância da proteína receptor de lipoproteína de baixa densidade (P35951, gene *Ldlr*) não exibiu ritmo circadiano, uma vez que sua flutuação ocorreu em um período de 18 horas e sua acrofase aconteceu no ZT9 (**Figura 23 I**).



**Figura 23—** Panorama dos ritmos de abundância do proteoma total do grupo Sham. Nestes gráficos estão representadas as medianas da oscilação da abundância das proteínas das vias A) glicólise/gliconeogênese, B) metabolismo do propanoato, C) metabolismo do carbono, D) reabsorção de cálcio regulada por fatores endócrinos e outros fatores, E) absorção mineral, F) via AMPc, G) digestão e absorção de carboidratos, H) digestão

e absorção de proteínas, I) secreção biliar e J) metabolismo do amido e da sacarose (neste gráfico as curvas da abundância das proteínas identificadas se sobrepõem). A maioria destas proteínas oscilam em um período de 24h, como mostrado pelo teste de ritmicidade JTK.

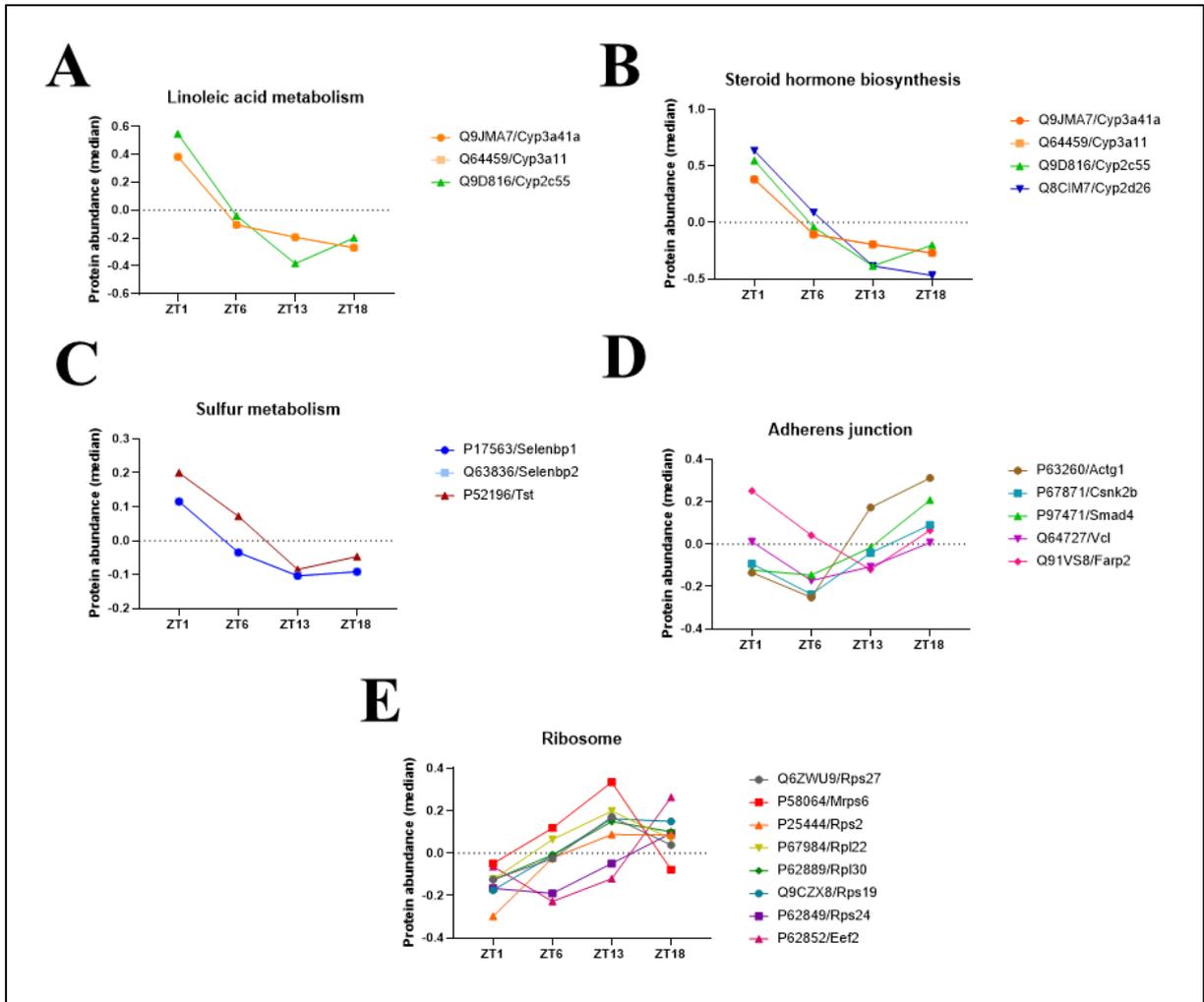
Em contrapartida, quando a comunicação do eixo intestino-cérebro foi interrompida pela vagotomia, o ritmo das proteínas foi desorganizado, ou seja, a abundância máxima destas proteínas ocorreu em diferentes horários do dia (**Figura 24**). Esta observação reforça sugestão de que os processos biológicos associados às proteínas que oscilaram no grupo VNX são independentes e temporalmente desconectados.

Entretanto, dentre as proteínas que oscilam no grupo VNX, todas apresentaram ritmo circadiano, exceto a vinculina (Q64727, gene Vcl), presente na via junções aderentes, que oscilou em um período infradiano, de 18 horas (**Figura 24D**).

As proteínas citocromo P450 3A11, citocromo P450 3A41 (Q64459 e Q9JMA7, genes Cyp3a11 e Cyp3a41a) e citocromo P450 2D26 (Q8CIM7, gene Cyp2d26) das vias ácido linoleico (**Figura 24A**) e biossíntese de hormônios esteroides (**Figura 24B**), bem com as proteínas 1 e 2 de ligação ao selênio (P17563 e Q63836, genes Selenbp1 e Selenbp2) e tiosulfato sulfúrio transferase (P52196, gene Tst), da via metabolismo do enxofre (**Figura 24C**) apresentaram abundância máxima no ZT3.

Por outro lado, as proteínas da via junções aderentes (**Figura 24D**), são mais abundantes no final da fase escura e início da fase clara. Desta forma, as proteínas actina citoplasmática 2 (P63260, gene Actg1) e mães contra homólogo 4 decapentaplégico (P97471, gene Smad4), bem como a proteína subunidade beta de caseína quinase II (P67871, gene Csnk2b) e FERM, RhoGEF proteína 2 contendo domínio *pleckstrin* (Q91VS8, gene Farp2) exibiram acrofase nos ZTs 18, 21 e 0, respectivamente.

Similarmente, as proteínas relacionadas à via do ribossomo (**Figura 24E**) foram mais abundantes na fase escura do dia, em horários alternados. Por exemplo a abundância máxima das proteínas ribossômicas 40S S27 (Q6ZWU9, gene Rps27) e 28S S6 mitocondrial (P58064, gene Mrps6) ocorreu no ZT12. No entanto, as proteínas ribossômicas 40S S2 (P25444, gene Rps2), 60S L22 (P67984, gene Rpl22), 60S L30 (P62889, gene Rpl30), 40S S19 (Q9CZX8, gene Rps19) e fator de alongamento 2 (P58252, gene Eef2) foram mais abundantes no ZT15, enquanto a acrofase da proteína ribossômica 40S S24 (P62849, gene Rps24) aconteceu no ZT18.



**Figura 24 – Panorama dos ritmos de abundância do proteoma total do grupo VNX.** Nestes gráficos estão representadas as medianas da abundância das proteínas nas vias A) ácido linoleico, B) biossíntese de hormônios esteroides, C) metabolismo do enxofre, D) junções aderentes e E) ribossomo.

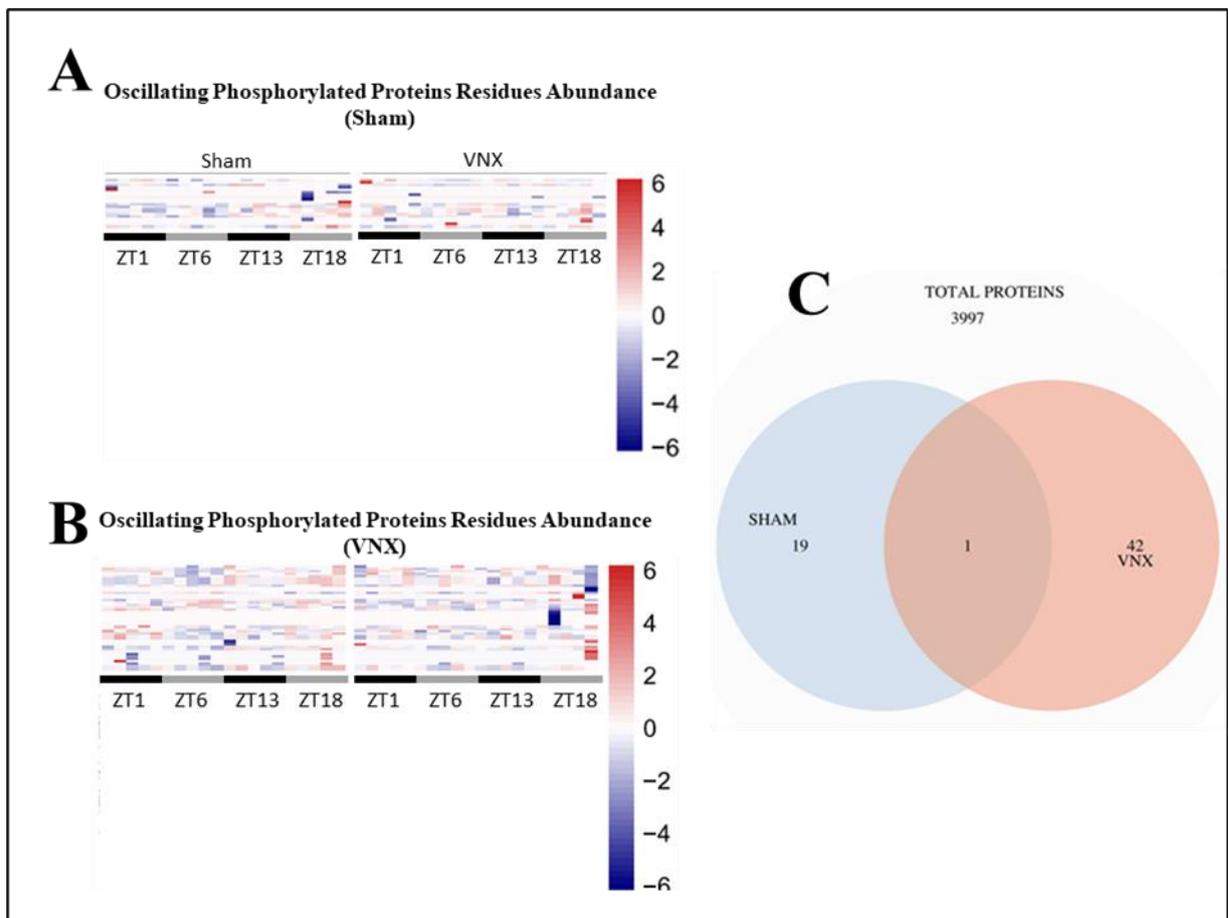
Em resumo, o nervo vago organiza os ritmos circadianos e infradianos proteínas intestinais, as quais são geralmente mais abundantes na fase escura do dia, no ZT18 (grupo Sham). Conseqüentemente, na ausência da sinalização vagal, outras proteínas oscilam ao longo do dia e exibem o pico de abundância em diferentes horários do dia.

## 6.6. O NERVO VAGO MODULA A FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS INTESTINAIS AO LONGO DO DIA

Os ritmos circadianos são determinados por mecanismos regulatórios que ocorrem no nível transcricional, traducional e pós traducional (JANICH *et al.*, 2015; MAUVOISIN *et al.*, 2014; ROBLES; COX; MANN, 2014; ROBLES; HUMPHREY; MANN, 2017b). Estudos recentes demonstraram que a modificação pós traducional de fosforilação é crucial para determinar o ritmo biológico de diversas espécies (BAKER *et al.*, 2009b; REISCHL; KRAMER, 2011b; ROBLES; HUMPHREY; MANN, 2017b). À vista disso, investigamos o

cenário de fosforilação das proteínas intestinais ao longo do dia e se o nervo vago participa deste processo.

Assim, encontramos 3997 proteínas fosforiladas no intestino, das quais apenas 19 (0,47% do fosfoproteoma) apresentaram flutuação temporal da abundância dos resíduos fosforilados, em condições fisiológicas normais (grupo Sham), como indicado pelo teste de ritmicidade JTK, (**Figura 25**). Novamente, a vagotomia interrompeu este ritmo e, simultaneamente, provocou a ritmicidade dos resíduos fosforilados de outras 42 proteínas. Portanto, o nervo vago também exerce controle sobre a ritmicidade do fosfoproteoma intestinal (**Figura 25**).



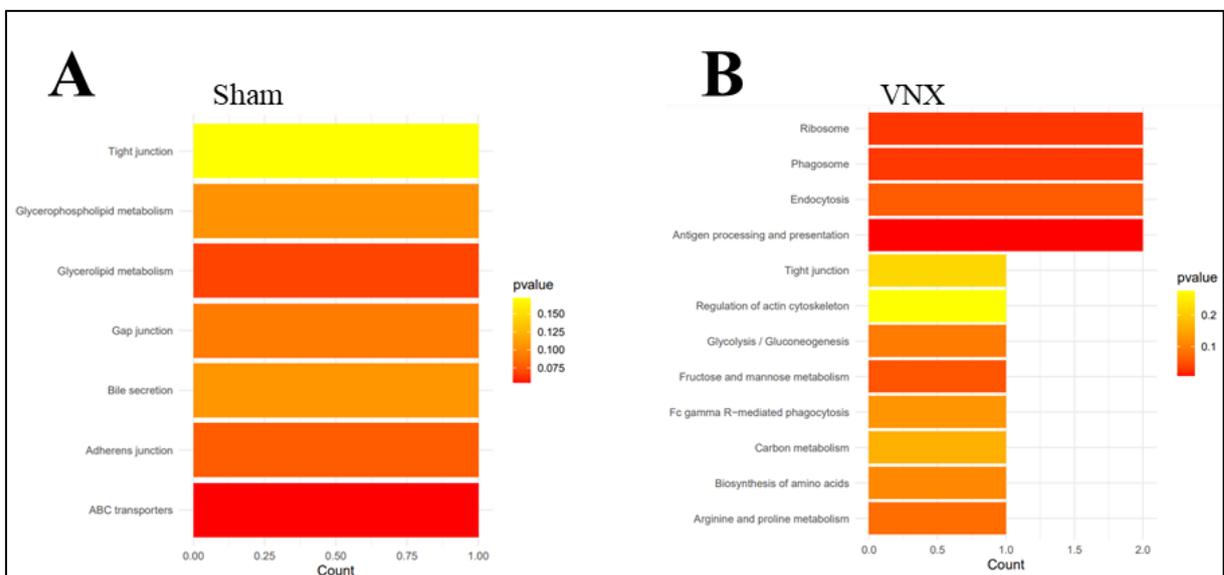
**Figura 25 – O nervo vago regula ritmo de fosforilação das proteínas do íleo.** Os mapas de calor, nos quais as cores quentes referem-se à maior intensidade de abundância dos resíduos fosforilados e as cores frias à menor intensidade, representam a oscilação dos resíduos fosforilados ao longo do dia nos grupos A) Sham e B) VNX. O diagrama de cores demonstra que os resíduos fosforilados diferem entre estes grupos, assim como está representado pelo diagrama de Venn (C).

### 6.7. ENRIQUECIMENTO DE VIAS RELACIONADAS AOS FOSFOPEPTÍDEOS QUE OSCILAM AO LONGO DO DIA

Posteriormente, identificamos que os resíduos fosforilados oscilantes do grupo Sham estavam associadas às vias bioquímicas junções estreitas, junções de oclusão e junções aderentes, bem como as vias metabolismo dos glicolipídios e fosfoglicolipídios e as vias de

secreção biliar e transportadores ABC (**Figura 26A**). Curiosamente, a via de secreção biliar foi significativamente representada na análise do proteoma total e do fosfoproteoma.

Em contrapartida, no grupo vagotomizado, identificamos o enriquecimento de vias relacionadas às funções imunológicas (vias fagossomo, endocitose, apresentação e processamento de antígenos, regulação do citoesqueleto de actina e fagocitose mediada pelo receptor gama FC), assim como as vias metabólicas (metabolismo da frutose e da manose, glicólise/gliconeogênese, metabolismo do carbono, metabolismo da arginina e prolina e biossíntese de aminoácidos). Além disso, no grupo vagotomizado também foram enriquecidas as vias junções estreitas e ribossomo (**Figura 26B**).



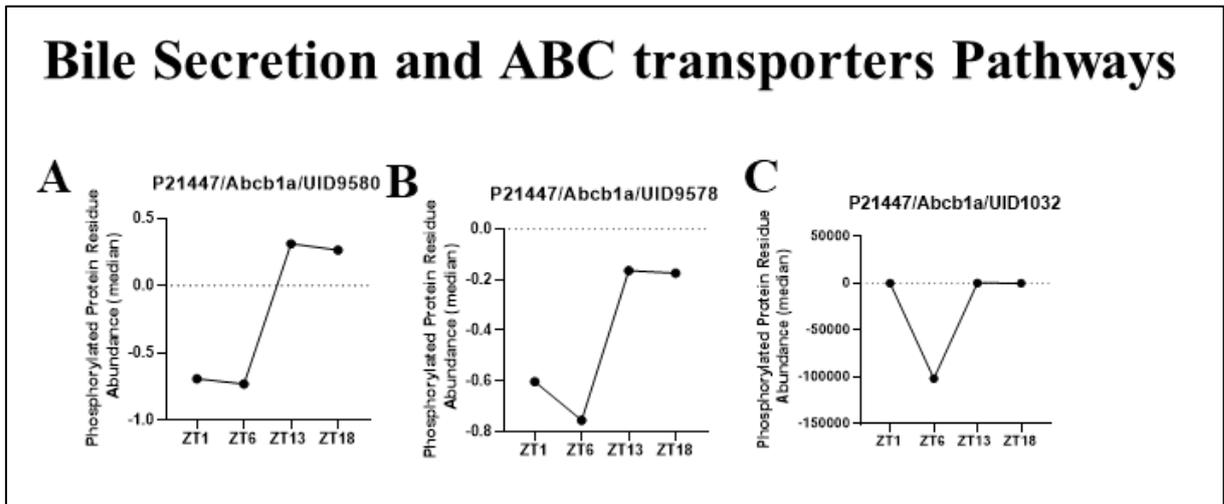
**Figura 26 – Enriquecimento de vias relacionadas aos fosfopeptídeos que flutuaram temporalmente.** O diagrama de cores reflete a abundância dos resíduos fosforilados, onde as cores quentes representam a maior concentração destes resíduos e vice-versa, nos grupos A) Sham e B) VNX. Os números da contagem (*count*) referem-se ao número de vezes que os resíduos fosforilados associados à uma determinada via foram identificados no experimento.

## 6.8. RITMO DE FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS AO LONGO DO DIA

Em seguida, investigamos em maior detalhe, qual é a dinâmica de oscilação dos resíduos proteicos fosforilados relacionados às vias enriquecidas.

Desta forma, observamos que a maioria dos resíduos fosforilados do grupo Sham oscilaram em ritmo circadiano, ou seja, em um período de aproximadamente 24 horas, sendo o pico de abundância destes resíduos em horários aleatórios (**Figuras 27-37**).

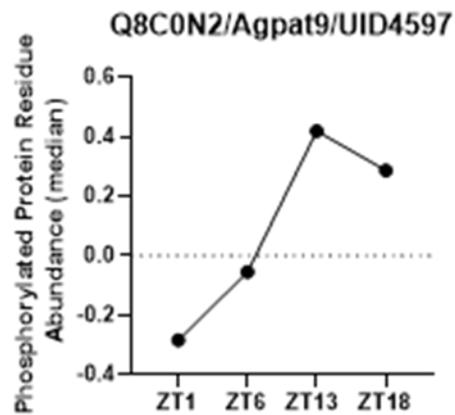
Nas vias secreção biliar e transportadores ABC encontramos três resíduos fosforilados da proteína 1A multirresistente a drogas (P21447, gene *Abcb1a*) que oscilaram em um período de 24 horas. Os resíduos fosforilados UID9580 (**Figura 27A**), UID9578 e UID1032 (**Figura 27B e C**) oscilaram em um período de 24 horas e apresentaram abundância máxima nos ZT15 e ZT18, respectivamente.



**Figura 27 – Oscilação dos fosfopeptídeos associados às vias secreção biliar e transportadores ABC.** Na proteína 1A multirresistente a drogas todos os resíduos oscilaram em ritmo circadiano. O resíduo fosforilado A) UID9580 apresentou o pico da abundância no ZT15. Por outro lado, a abundância máxima dos resíduos fosforilados B) UID9578 e C) UID1032 ocorreu no ZT18.

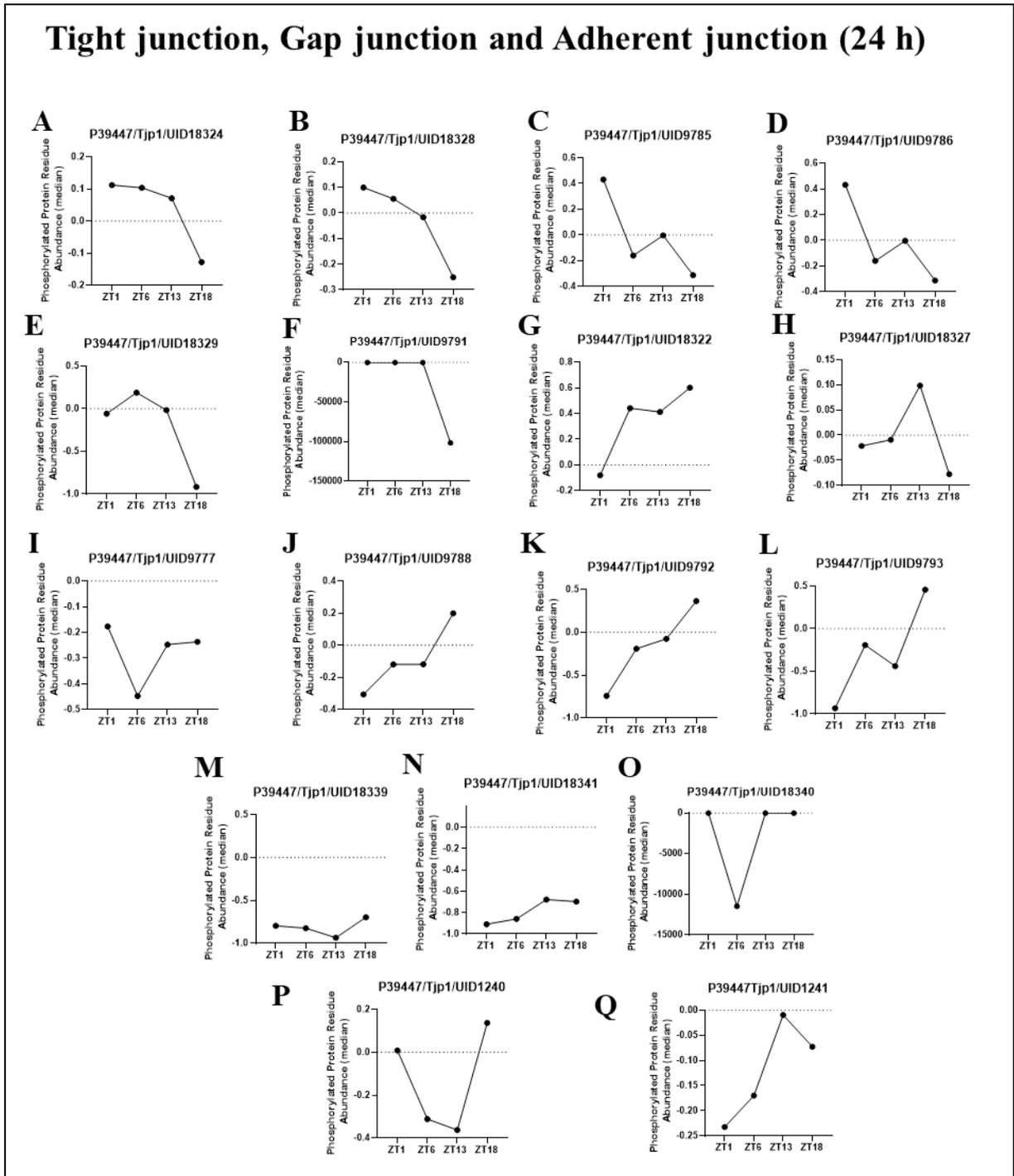
Apenas um resíduo fosforilado (UID4597) da proteína glicerol-3-fosfato aciltransferase 3 (Q8C0N2, gene *Agpat9*), presente nas vias metabolismo dos glicolípídios e fosfoglicolípídeos, oscilou em um período de 24 horas e sua acrofase ocorreu no ZT15 (**Figura 28**).

# Glycerolipid metabolism and Glycerophospholipid metabolism



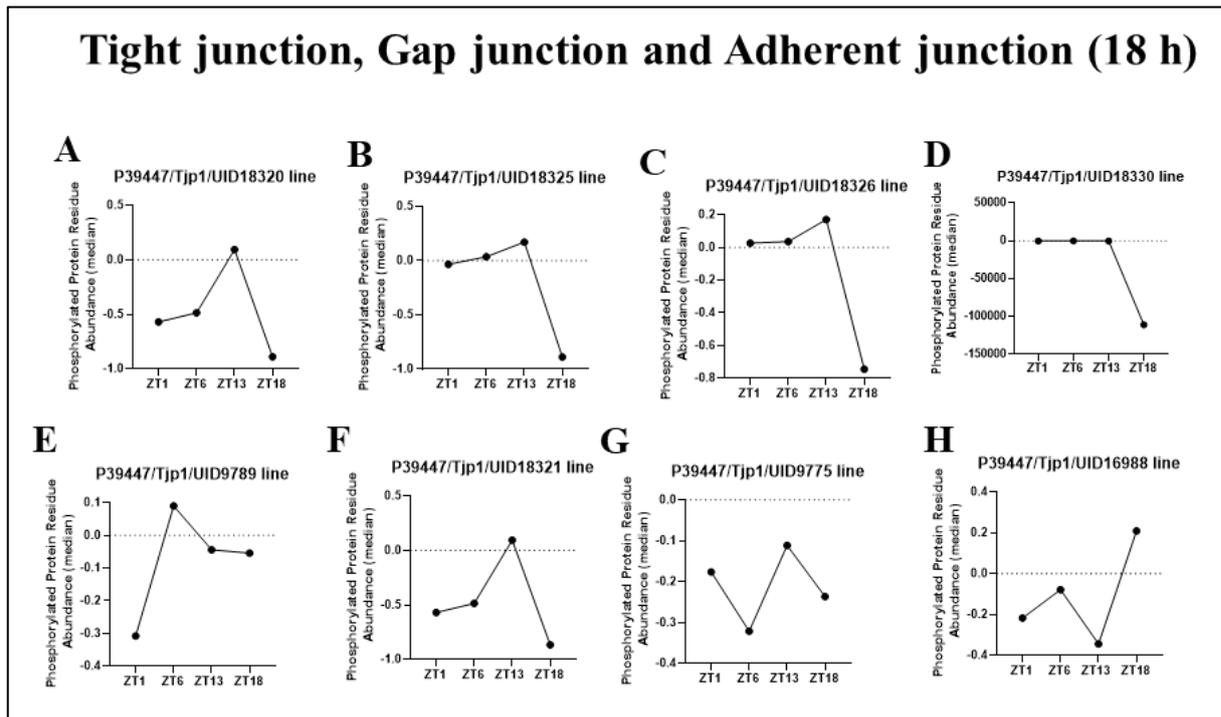
**Figura 28**– Flutuação temporal dos fosfopeptídeos relacionados às vias do metabolismo e glicerolípídeos e glicerofosfolípídeos. A proteína glicerol-3-fosfato aciltransferase 3 apresentou apenas um resíduo fosforilado (UID4597) que oscilou em ritmo circadiano, com acrofase no ZT15.

Em oposição, identificamos 17 resíduos fosforilados da proteína de junção estreita ZO-1 (P39447, gene Tjp1) relacionada às vias junções estreitas, de oclusão e aderentes (**Figura 29**), oscilando ritmo circadiano. A abundância máxima destes resíduos aconteceu em horários aleatórios.



**Figura 29 – Oscilação dos fosfopeptídeos associados às vias junções estreitas, junções de oclusão e junções de aderência.** Na proteína de junção estreita ZO-1, 17 resíduos fosforilados oscilaram em um período de 24 horas. Porém, o pico de abundância destes resíduos foi bastante diverso. Assim, os resíduos A) UID18324, B) UID18328, C) UID9785 e D) UID9786 estavam mais abundantes no ZT6. O resíduo fosforilado E) UID18329 foi mais frequente no ZT9. Por sua vez os resíduos fosforilados F) UID9791, G) UID18322 e H) UID18327 apresentaram sua acrofase no ZT12. Os resíduos fosforilados I) UID9777, (J) UID9788, (K) UID9792, (L) UID9793, M) UID18339 e N) UID18341 foram mais abundantes no ZT18. O resíduo O) UID18340 apresentou acrofase no ZT21. Finalmente, os resíduos fosforilados P) UID1240 e Q) UID1241 exibiram maior abundância nos ZT0 e ZT15, respectivamente.

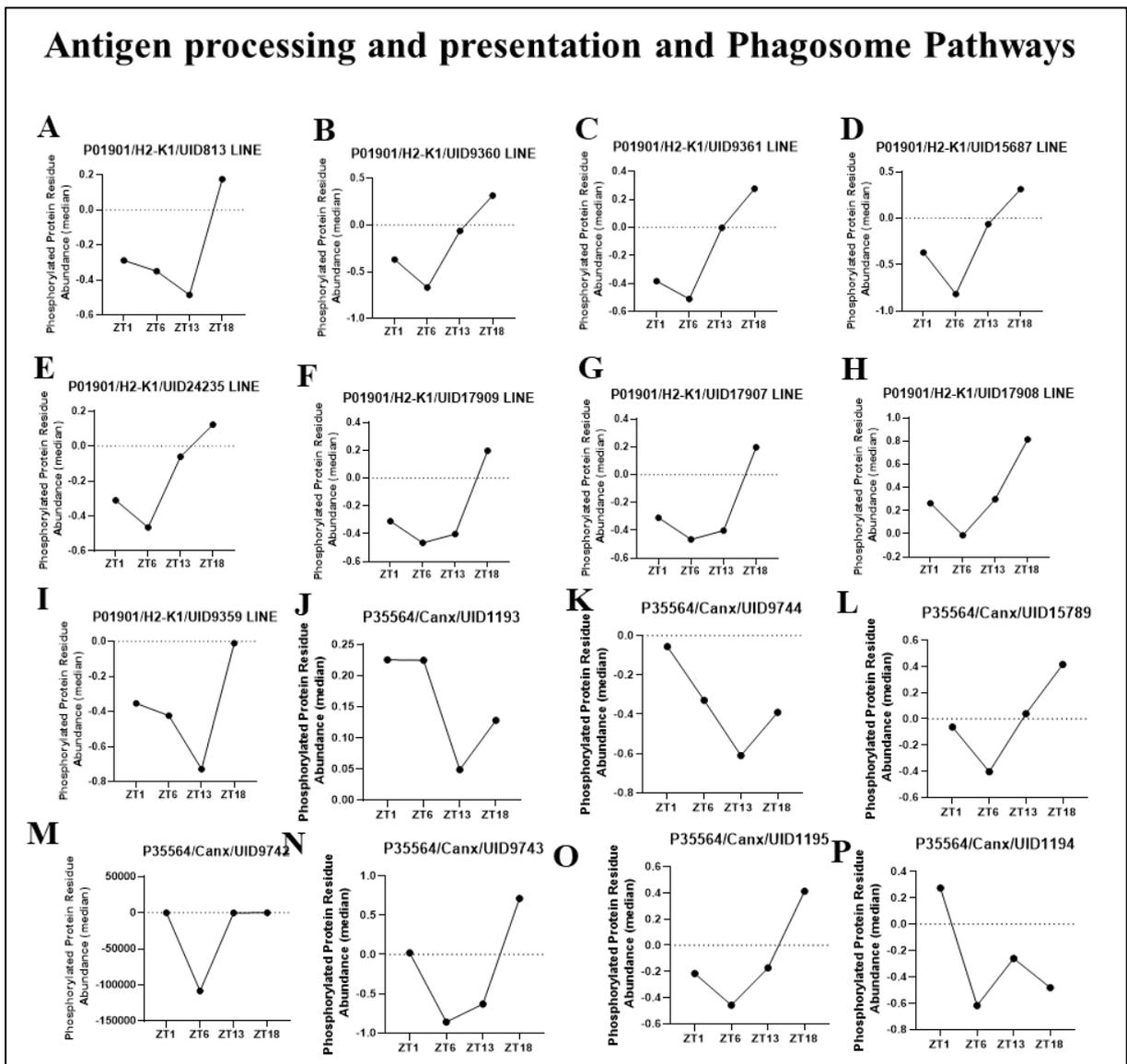
A fosforilação rítmica da proteína de junção estreita ZO-1 é tão importante que outros oito resíduos desta proteína flutuaram ao longo do dia, porém em um período de 18 horas e, portanto, em ritmo infradiano (**Figura 30**). A maior abundância dos resíduos fosforilados (UID18320, UID18325, UID18326 e UID18330) ocorreu no ZT 12 (**Figura 30 A-D**). Os outros resíduos (UID9789, UID18321, UID9775 e UID 16888) apresentaram abundância máxima em horários aleatórios (**Figura 30 E-H**).



**Figura 30 – Flutuação temporal dos fosfopeptídeos associados às vias junções estreitas, junções de oclusão e junções aderentes.** Os resíduos fosforilados da proteína de junção estreita ZO-1 A) UID18320, B) UID18325, C) UID18326 e D) UID18330 foram mais abundantes no ZT12, enquanto os resíduos fosforilados E) UID9789 e F) UID18321 apresentaram sua acrofase no ZT9. Finalmente, o pico de abundância dos resíduos fosforilados G) UID9775 e H) UID16988 ocorreu nos ZT3 e ZT15, respectivamente.

Paralelamente, estudamos o cenário dos resíduos fosforilados associados às vias enriquecidas no fosfoproteoma do intestino dos camundongos vagotomizados. Assim, identificamos a proteína antígeno de histocompatibilidade H-2 classe I (P01901, gene H2-K1), integrante das vias processamento e apresentação de antígenos e fagossomo (**Figura 31**), bem como da via endocitose (**Figura 32**), teve 9 resíduos fosforilados (UID913, UID9360, UID9361, UID15687, UID24235, UID17909, UID17907, UID17908 e UID9359) que oscilaram em ritmo circadiano, com a acrofase nos ZTs 18 e 0 (**Figuras 31 A-I e 32 A-I**). Similarmente, a proteína calnexina (P35564, gene Canx), a qual participa das vias processamento e apresentação de antígenos e fagossomo, apresentou 6 resíduos fosforilados (UID1193, UID1195, UID9742, UID9743, UID9744 e UID15789) cuja abundância flutuou circadianamente e foi máxima nos ZTs 6,18 ou 21 (**Figura 31 J-O**) e um resíduo fosforilado

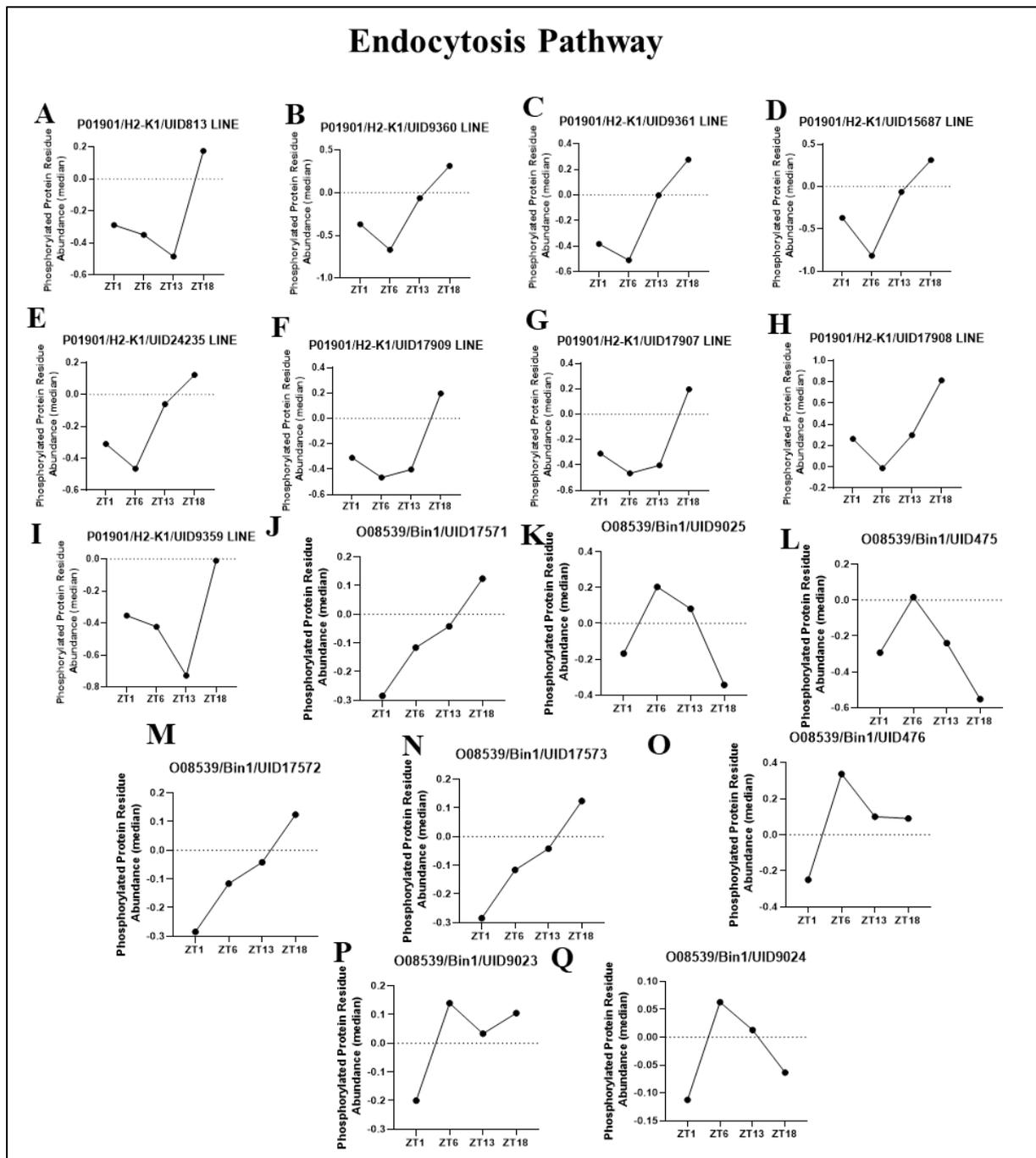
(UID1194) que oscilou em um período de 18 horas, com abundância máxima no ZT0 (**Figura 31P**).



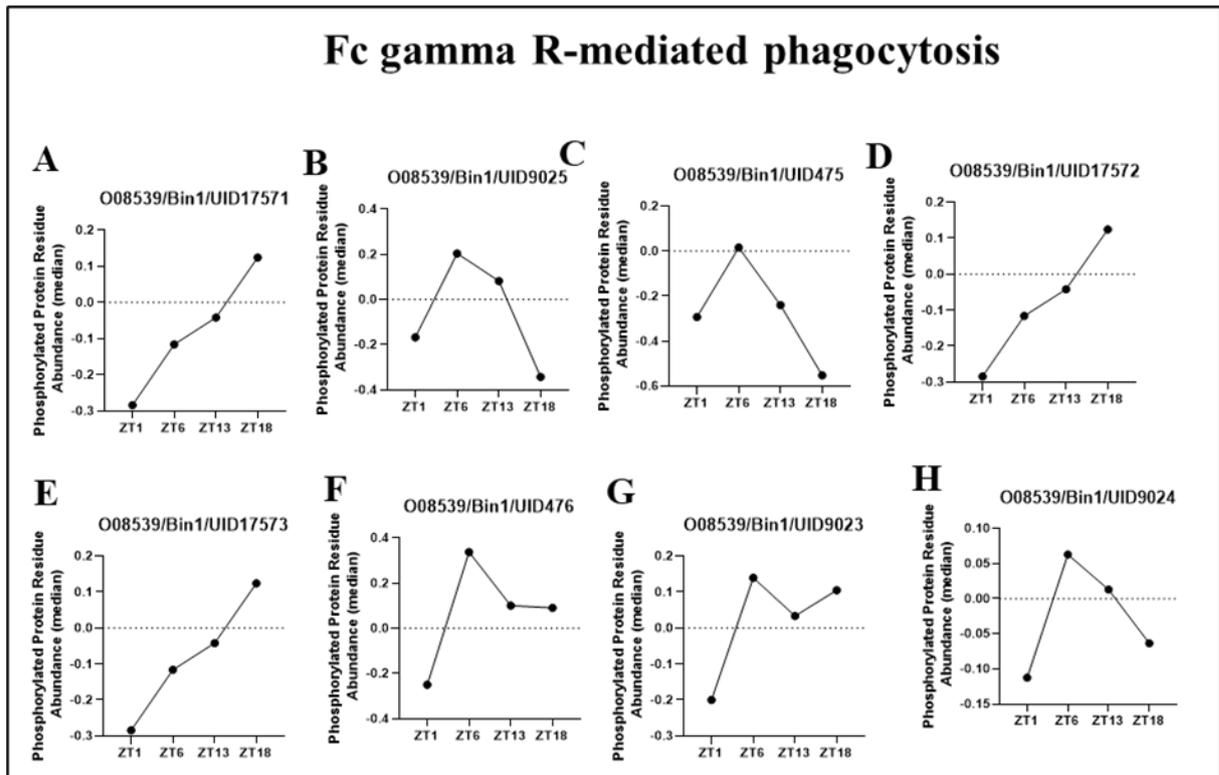
**Figura 31: Flutuação temporal dos fosfopeptídeos associados às vias de apresentação e processamento de antígenos e fagossomo.** A proteína antígeno de histocompatibilidade H-2 classe I apresentou resíduos fosforilados A) UID913, B) UID9360, C) UID9361, D) UID15687, E) UID24235, F) UID17909 e G) UID17907, com abundância em ritmo circadiano e pico no ZT18, enquanto os resíduos fosforilados H) UID17908 e I) UID9359 foram mais abundantes no ZT0. A outra proteína relacionada à estas vias, calnexina, teve 6 resíduos fosforilados que oscilou em um período de 24 horas. Dentre esses, os resíduos fosforilados J) UID1193 e K) UID9744 apresentaram abundância máxima no ZT6 no ZT6, L) UID15789 foi mais abundante no ZT18, M) UID9742, N) UID 9743 e O) UID1195 apresentaram acrofase no ZT 21. O outro resíduo fosforilado P) UID1193 da calnexina flutuou em um período de 18 horas e o pico de sua abundância foi no ZT0.

Por sua vez, a proteína de interação dependente da Myc box 1 (O08539, gene Bin1), componente das vias endocitose (figura 31) e fagocitose mediada pelo receptor gama FC (**Figura 32**), apresentou 5 resíduos fosforilados (UID17571, UID9025, UID475, UID17572 e 17573) que oscilaram em ritmo circadiano, com acrofase nos ZTs 0, 9 12 e 18. Os outros

resíduos fosforilados desta proteína (UID476, UID9023 e UID9024) oscilaram em um período de 18 horas e a acrofase ocorreu no ZT9.

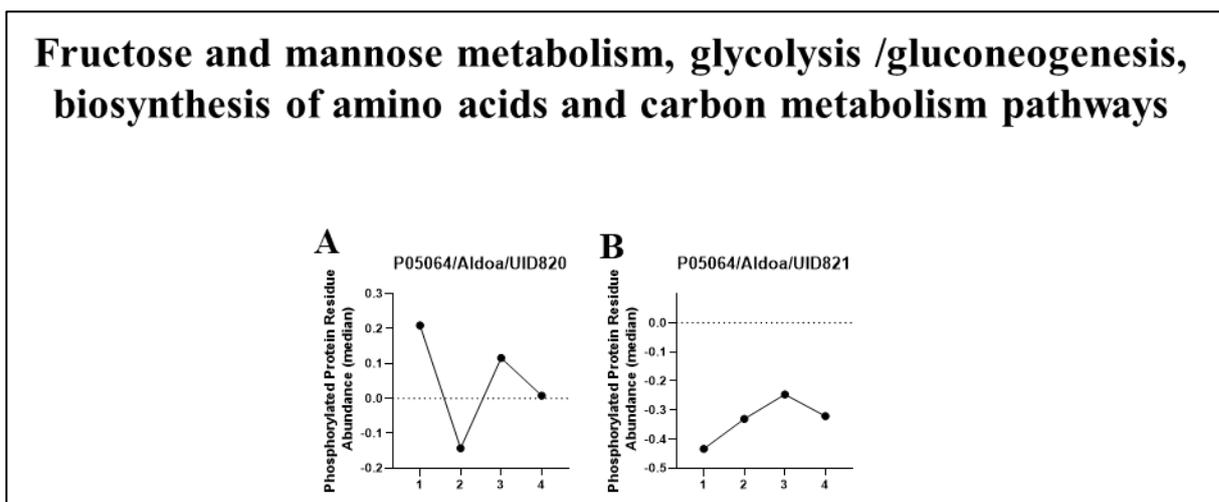


**Figura 32– Ritmicidade dos fosfopeptídeos relacionados à via endocitose.** A oscilação dos resíduos fosforilados da proteína antígeno de histocompatibilidade H-2 classe I (A-I) foi descrita na figura 30. Por sua vez, na proteína de interação dependente da Myc box 1, o resíduo fosforilado J) UID17571 foi mais abundante no ZT0, K) UID9025 apresentou acrofase no ZT9, L) UID475 teve o pico de abundância no ZT12, enquanto a abundância máxima dos resíduos fosforilados M) UID17572 e N) UID17573 ocorreu no ZT18, todos estes resíduos oscilaram em ritmo circadiano. Por outro lado, os resíduos fosforilados O) UID476, P) UID9023 e Q) UID9024 exibiram ritmo de abundância com período de 18 horas e pico no ZT9.



**Figura 33 – Oscilação dos fosfopeptídeos associados à via fagocitose mediada por receptor gama FC.** Os ritmos dos resíduos proteicos da proteína de interação dependente da Myc box 1 (A-H) foram descritos na figura 31 (J-Q, respectivamente).

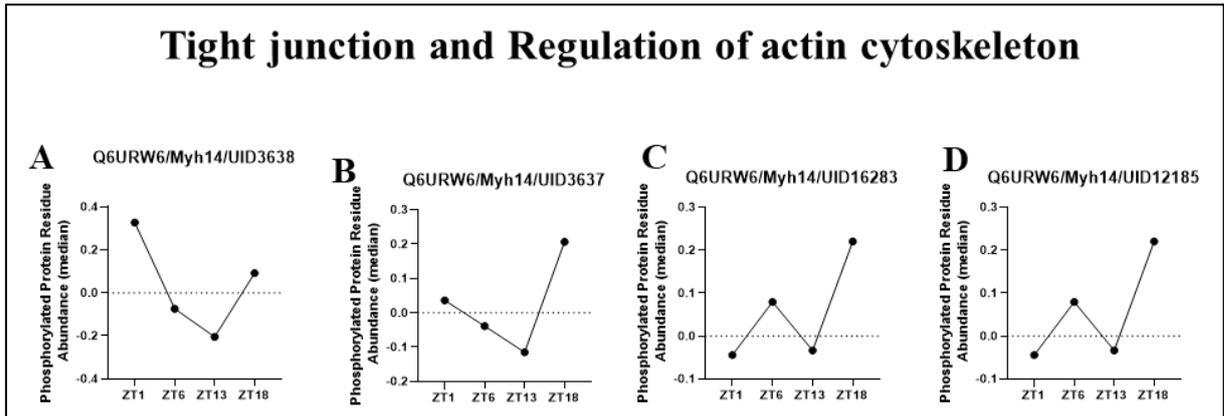
Além disso, as vias metabolismo da manose e frutose, glicólise e gliconeogênese, biossíntese de aminoácidos e metabolismo do carbono foram associadas à proteína aldolase A de frutose-bifosfato (P05064, gene Aldoa), a qual exibiu apenas dois resíduos fosforilados, sendo que o resíduo UID820 oscilou em um período de 18 h e acrofase no ZT15 (**Figura 34A**) e o resíduo UID 821 flutuou em um período de 24 horas e o pico ocorreu no ZT18 (**Figura 34B**).



**Figura 34 – Oscilação dos fosfopeptídeos relacionados às vias metabolismo da manose e frutose, glicólise e gliconeogênese, biossíntese de aminoácidos e metabolismo do carbono.** Nestas vias a proteína aldolase A de frutose-bifosfato apresentou a flutuação temporal de dois resíduos fosforilados. Um destes resíduos,

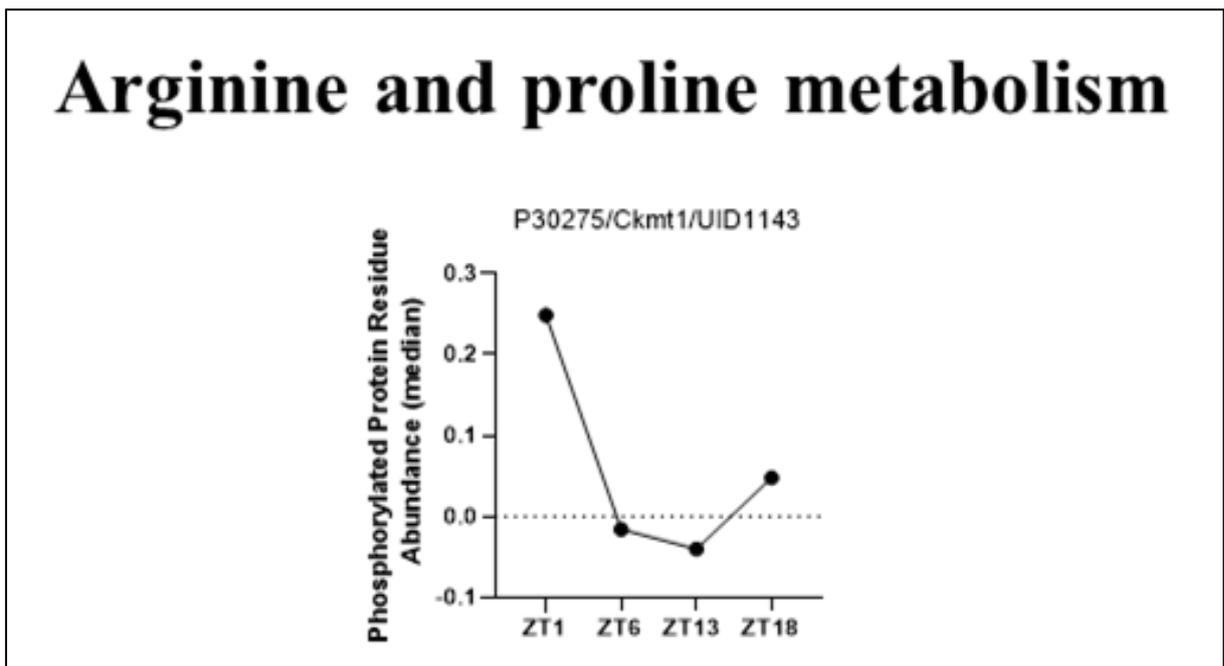
A) UID820, oscilou em um período de 18 horas e a abundância máxima ocorreu no ZT15. A abundância do segundo resíduo fosforilado, B) UID820, é circadiana e o pico ocorreu no ZT18.

Nas vias junções estreitas e regulação do citoesqueleto de actina, a proteína miosina-14 (Q6URW6, gene Myh14) apenas um resíduo fosforilado (UID3638) apresentou ritmo circadiano e o pico de abundância foi no ZT1 (**Figura 35A**). A abundância dos outros resíduos fosforilados desta proteína (UID3637, UID16283 e UID12185) flutuou em um período de 18 horas e o pico nos ZT3 e ZT6 (**Figura 35 B-D**).



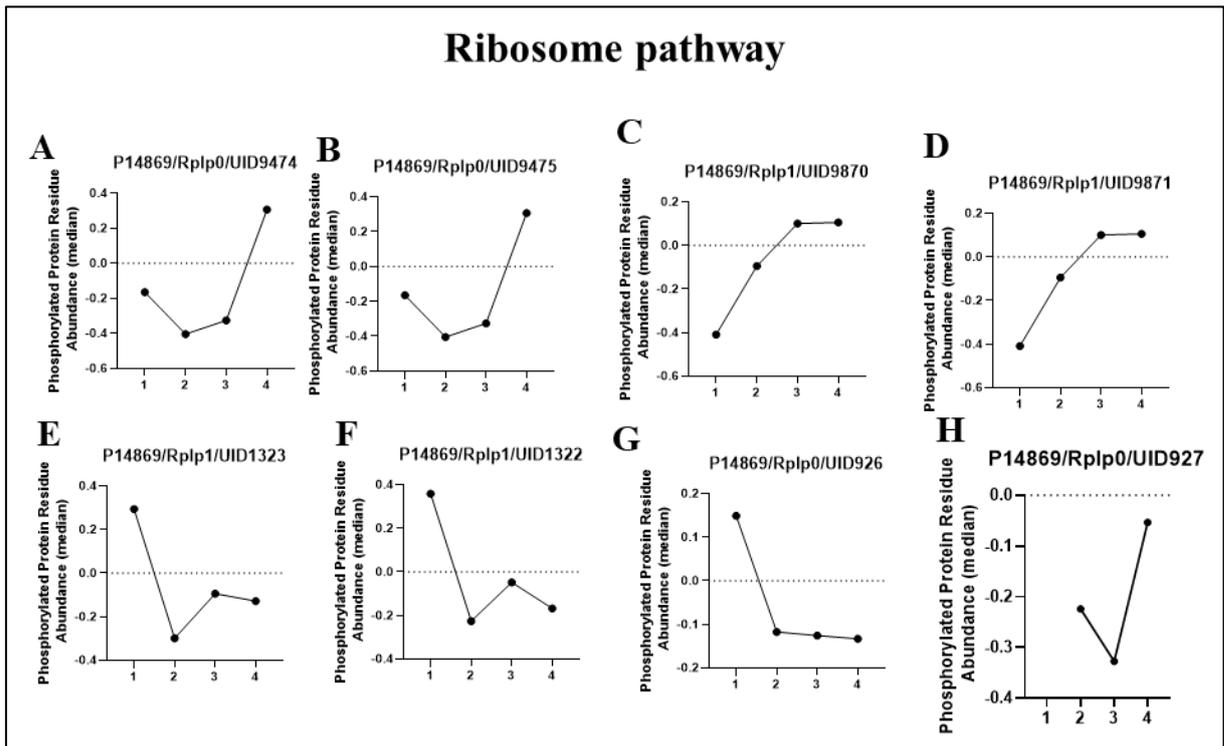
**Figura 35 – Ritmicidade dos fosfopeptídeos relacionados às vias junções estreitas e regulação do citoesqueleto de actina.** Na proteína miosina-14 o resíduo fosforilado A) UID3638 oscilou circadianamente e a abundância máxima ocorreu no ZT0. Os demais resíduos fosforilados desta proteína oscilaram em um período de 18 horas e o pico da abundância do resíduo B) UID3637 ocorreu no ZT3, enquanto a abundância máxima dos peptídeos C) UID16283 e D) UID12185 ocorreu no ZT6.

Por sua vez, a via do metabolismo da prolina e arginina foi associada à proteína creatina quinase tipo U, mitocondrial (P30275, gene Ckmt1). O resíduo fosforilado desta proteína (UID1143) oscilou em um período de 18 horas e abundância máxima no ZT0 (**Figura 36**).



**Figura 36 – Oscilação temporal do fosfopeptídeo associado às vias metabolismo da prolina e arginina.** O resíduo fosforilado UID1143 da proteína creatina quinase tipo U flutuou em um ritmo infradiano de 18 horas e a abundância máxima ocorreu no ZT0.

Finalmente, na via do ribossomo, a proteína ribossômica ácida 60S P0 (UID926, genes Rplp0 e Rplp1) teve 4 resíduos fosforilados em ritmo circadiano (UID9474, UID9475, UID9870 e UID9871) a acrofase aconteceu nos ZTs 15 e 18 (**Figura 37A-D**). Outros resíduos fosforilados (UID1323, UID1322, UID926 e UID927) exibiram ritmicidade ao longo do dia, porém o período de oscilação foi 18 horas e a acrofase ocorreu no ZT0 (**Figura 37 E-H**).



**Figura 37 – Oscilação dos fosfopeptídeos associados à via do ribossomo.** Nesta proteína, ribossômica ácida 60S P0, os resíduos fosforilados A) UID9474 e B) UID9475, codificados pelo gene Rplp0, oscilaram em ritmo circadiano com abundância máxima no ZT18, enquanto os resíduos fosforilados C) UID9870 e D) UID9871, ambos codificados pelo gene Rplp1, também flutuaram em um período de 24 horas, porém a acrofase ocorreu no ZT15. Os resíduos fosforilados E) UID1323, F) UID1322, G) UID926 e H) UID927 flutuaram em ritmo infradiano de 18 horas e a abundância máxima ocorreu no ZT0.

Portanto, neste trabalho mostramos o panorama da organização temporal dos resíduos fosforilados e das proteínas intestinais. Surpreendentemente a maioria destes resíduos fosforilados e proteínas exibiram ritmo circadiano, o qual foi interrompido na ausência da comunicação intestino-cérebro mediada pelo ramo esquerdo do nervo vago.

## 6. DISCUSSÃO

O lúmen intestinal é um canal de comunicação entre o ambiente externo e os órgãos internos de um indivíduo, sendo exposto diariamente a diversas substâncias tóxicas, patógenos e nutrientes advindos da alimentação, além dos trilhões de microrganismos comensais que o habitam, denominados microbiota. Assim, o intestino precisa exercer simultaneamente suas funções clássicas (digestão, absorção e secreção), impedir a penetração de substâncias tóxicas e patógenos, e montar uma resposta adaptativa e tolerogênica à microbiota. Um sistema complexo e paradoxal como é o trato gastrointestinal precisa ser regulado por mecanismos refinados que integram a microbiota, sinais hormonais e neurais, bem como o ciclo circadiano. No presente trabalho, utilizando espectrometria de massa, detectamos que a expressão e fosforilação de algumas proteínas intestinais oscilam ao longo do dia em ritmos de aproximadamente 18 e 24 horas, sincronizados com os ciclos claro/escuro e alimentação/jejum de camundongos. Surpreendentemente, constatamos que estes ritmos são regulados pela comunicação intestino cérebro, uma vez que são abolidos diante da interrupção desta comunicação por vagotomia. Além disso, identificamos quais são as proteínas e fosfoproteínas que oscilam ritmicamente e que elas estão associadas às funções de digestão/absorção, barreira intestinal e metabolismo de nutrientes. Portanto, expandimos o conhecimento acerca das proteínas que oscilam ao longo do dia sob a regulação do nervo vago.

As proteínas e fosfopeptídeos que oscilaram ritmicamente no intestino de camundongos com inervação vagal intacta, foram enriquecidos em algumas vias bioquímicas importantes para a fisiologia do intestino: digestão e absorção de carboidratos e proteínas, reabsorção de cálcio regulada por fatores endócrinos e outros fatores, via de sinalização da adenosina 3,5-monofosfato cíclico (AMPC), absorção mineral, via dos transportadores ABC, metabolismo do carbono, metabolismo do amido e da sacarose, metabolismo do propanoato, metabolismo dos glicolipídios e fosfoglicolipídeos, gliconeogênese/glicólise, secreção biliar, junções estreitas, junções de oclusão e junções aderentes. A oscilação ritmica destas proteínas e fosfopeptídeos pode ser um indício de que as funções relacionadas às vias enriquecidas flutuam de forma semelhante ao longo do dia. Porém, não podemos inferir que a oscilação circadiana do proteoma e fosfoproteoma determina a ritmicidade dos processos biológicos a que estão associados, salvo se experimentalmente comprovado (STANGHERLIN; SEINKMANE; O'NEILL, 2021).

A regulação circadiana da digestão e absorção de carboidratos, proteínas e lipídeos ocorre devido à expressão ritmica de enzimas digestivas e receptores de nutrientes presentes na membrana apical dos enterócitos, a qual é máxima na fase escura ou de atividade do ciclo, quando estas funções precisam estar ativas para otimizar a ingestão dos nutrientes (HUSSAIN,

2014; MARTCHENKO et al., 2020; PÁCHA; SUMOVÁ, 2013; PAN et al., 2004a; PAN; HUSSAIN, 2007, 2009; VOIGT; FORSYTH; KESHAVARZIAN, 2019a). Desta forma, o ritmo circadiano de absorção dos dipeptídeos e tripeptídeos resultantes da hidrólise das proteínas no lúmen intestinal é ditado pelo ritmo de expressão dos transportadores de peptídeos de alta capacidade, baixa afinidade tipo 1 (PEPT1) e canal de sódio (NHE3), bem como pelo ritmo da troca de prótons por este canal (SLÁDEK et al., 2007). O mecanismo pelo qual o ritmo do PEPT1 é regulado ainda é controverso, mas sabe-se que o ritmo circadiano dos ácidos biliares pode regular indiretamente a ritmicidade deste transportador, uma vez que existe uma correlação entre a maior concentração destes ácidos e a menor concentração de PEPT1 (OKAMURA et al., 2014). Semelhantemente, absorção de carboidratos monossacarídeos (glicose, frutose, galactose) acontece por meio de transportadores como o transportador de glicose dependente de sódio (SGLT/2) e os transportadores de glicose 3 e 5 (GUT5 e GLUT3), os quais são mais expressos na fase escura do dia e oscilam de acordo com a disponibilidade de alimentos. Por sua vez, a digestão de lipídeos da dieta (triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol) começa pela emulsão por sais biliares no lúmen intestinal (HUSSAIN, 2014; MARTCHENKO et al., 2020; PAN et al., 2004b) seguida da digestão por lipases. O produto da digestão dos lipídeos é capturado na membrana apical dos enterócitos e secretados pela membrana basal, ambos processos ocorrem em ritmo circadiano e são máximos na fase escurado do ciclo, coincidindo com o período de maior atividade dos roedores (MARTCHENKO et al., 2020; PAN; HUSSAIN, 2007, 2009) Neste trabalho, acrescentamos que a comunicação colinérgica intestino-cérebro regula a flutuação ao longo do dia das proteínas ATPase transportadora de sódio/potássio subunidade alfa-1 de (Q8VDN2, gene *Atp1a1*), subunidade beta-1 (P14094, gene *Atp1b1*) e subunidade beta-3 (P97370, gene *Atp1b3*), enriquecidas nas vias de digestão e absorção de macronutrientes. Ainda, este circuito neural regulou o ritmo de expressão das proteínas calmodulina tipo 4 (P05208, gene *Cela2a*) e meprin A subunidade beta (Q61847, *Mep1*), enriquecidas na via digestão e absorção de proteínas, bem como a proteína alfa-amilase pancreática (P00688, gene *Amy2*), enriquecida na via absorção e digestão de carboidratos. A modulação parassimpática sobre o ritmo circadiano de componentes da via de absorção de carboidratos é corroborada pelo trabalho de Tavakkolizadeh e colaboradores que relataram a participação do nervo vago sobre a expressão circadiana de do transportador de glicose tipo 2 (GLUT2) no intestino delgado (TAVAKKOLIZADEH et al., 2005). Interessantemente, a maioria destas proteínas e fosfopeptídeos oscilaram em um período de 24 horas e estavam mais abundantes na fase escura

do ciclo, quando as funções de digestão e absorção de nutrientes precisam estar ativas para otimizar a nutrição.

Concomitantemente, o mesmo ritmo foi observado para as proteínas enriquecidas em nas vias de reabsorção de cálcio dependente de fatores endócrinos e outros fatores (calicreína-1 (P15947, gene *Klk1*), ATPase 1 transportadora de cálcio da membrana plasmática (G5E829, gene *Atp2b1*), subunidade beta do complexo AP-2 (Q9DBG3, gene *Ap2b1*)), via da absorção mineral (proteína 1 de absorção de cobre de alta afinidade (Q8K211, gene *Slc31a1*)), via do metabolismo do amido e da sacarose (proteína glicogênio fosforilase, forma muscular (Q9WUB3, gene *Pygm*)) e via da glicólise/gliconeogênese (proteína enolase-beta (P21550, gene *Eno3*), fosfoenolpiruvato carboxiquinase citosólica GTP (Q9Z2V4, gene *Pck*), fosfoglicerato quinase 1 (P09411, gene *Pgk1*), aldolase B de frutose-bifosfato (Q91Y97, gene *Aldob*) e acetil-coenzima A sintetase citoplasmática (Q9QXG4, gene *Acss2*)), via do metabolismo do propanoato (proteína peroxissomal acil-coenzima A oxidase 1 (Q9R0H0 *Acox1*), metabolismo do carbono (proteínas malato desidrogenase, mitocondrial (P08249, gene *Mdh2*) e dihidroxiacetona quinase dependente de ATP; FAD-AMP liase cíclico (Q8VC30, gene *Dakda*)) e via sinalização do AMPc (proteínas substrato 1 de toxina botulínica C3 relacionado a Ras, substrato 3 de toxina botulínica C3 relacionado a Ras (P63001 e P60764, genes *Rac1* e *Rac3*), proteína quinase 1 associada a Rho (P70335, gene *Rock1*) e proteína calmodulina tipo 4 (Q91WQ9, gene *Calml4*)). Apenas um resíduo fosforilado na via metabolismo dos glicolipídios e fosfoglicolipídeos oscilou em um período de 24 horas.

Interessantemente, a via de secreção biliar foi enriquecida tanto no proteoma como no fosfoproteoma do íleo, indicando a importância da regulação vagal sobre o ritmo circadiano desta via. O íleo é o sítio de reabsorção dos ácidos biliares secretados no intestino pela vesícula biliar (YU et al., 2020) e de metabolização destas substâncias pela microbiota (GRASSET; BURCELIN, 2019; WAHLSTRÖM et al., 2016). Os metabólitos da microbiota ativam receptores nucleares como o receptor farnesoide X (FXR) e receptores de superfície acoplados às proteínas G (LI; CHIANG, 2014; STANIMIROV; STANKOV; MIKOV, 2015; YU et al., 2020), os quais são expressos em ritmo circadiano e estão envolvidos no metabolismo da glicose, lipídeos, ácidos biliares, medicamentos, substratos de energia e respostas imunes. Portanto, a regulação do ritmo circadiano dos ácidos biliares é essencial para prevenir a progressão da diabetes, obesidade, colestase e doenças metabólicas (FROY, 2012; RAJANI; JIA, 2018; SHETTY et al., 2018; SHI et al., 2013; YU et al., 2020). Neste trabalho, identificamos que o eixo intestino cérebro regula a flutuação diária de proteínas enriquecidas na via de secreção biliar (resistência a múltiplas drogas 1A e 1B (P21447 e P06795, genes

Abcb1a e Abcb1b) e receptor de lipoproteína de baixa densidade (P35951, gene Ldlr). Em adição, identificamos que o circuito parassimpático modula a oscilação circadiana de três resíduos fosforilados da proteína 1A multirresistente a drogas (P21447, gene Abcb1a), enriquecidos nas vias secreção biliar e transportadores ABC.

Por sua vez, a oscilação diária da função de barreira epitelial é bem documentada e pode ocorrer devido ao efeito direto da regulação circadiana sob a expressão das proteínas das junções estreitas ou pelo movimento das junções estreitas entre a membrana e compartimentos intracelulares (OH-OKA et al., 2014; SUMMA et al., 2013a; VOIGT et al., 2018; VOIGT; FORSYTH; KESHAVARZIAN, 2019b). Assim, estudos prévios demonstraram que as proteínas de junções estreitas, ocludina e claudulina 1, são expressas em ritmo circadiano no cólon, devido à ligação rítmica do heterodímero BMAL1/CLOCK nos promotores responsivos dos genes destas proteínas (MARTCHENKO et al., 2020; OH-OKA et al., 2014). Consequentemente, a função destas proteínas para a barreira contra a absorção de substâncias tóxicas e patógenos do lúmen também flutua ao longo do dia e sua máxima ativação coincide com o período de maior atividade do animal. O aumento da permeabilidade intestinal devido às alterações do ritmo circadiano foi demonstrado em modelos animais de desregulação genética da cronobiologia e em camundongos mantidos em ambientes com inversão do ciclo claro/escuro, uma vez que ambos apresentaram translocação exacerbada de agentes pró-inflamatórios e predisposição a doenças metabólicas (MARTCHENKO et al., 2020; OH-OKA et al., 2014; SUMMA et al., 2013b). Em conformidade com a relevância do ritmo circadiano para a barreira epitelial, detectamos a proteína de junção estreita ZO-1 (P39447, gene Tjp1), relacionada às junções estreitas, junções de oclusão e junções aderentes, é fosforilada em 25 resíduos ao longo do dia, por intermédio da comunicação parassimpática entre o intestino e o cérebro.

Em síntese, neste trabalho evidenciamos que o circuito vagal entre o intestino e cérebro é um importante regulador da oscilação da expressão e fosforilação das proteínas intestinais, as quais estão relacionadas a funções fisiológicas clássicas do intestino. Contudo, outros fatores podem influenciar direta ou indiretamente esta regulação mediada pelo nervo vago. Classicamente, a luz é a principal pista ambiental capaz de resetar o ciclo circadiano dos animais (TEICHMAN et al., 2020; WU et al., 2018). Os raios luminosos incidem em células fotorreceptoras da retina ((MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012), as quais transportam as informações dos sinais luminosos para o relógio central, no núcleo supraquiasmático, no hipotálamo lateral (CHEN; BADEA; HATTAR, 2011; GÜLER et al., 2008; MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012). Este núcleo é composto por aproximadamente 20.000

neurônios que possuem características únicas como ritmo circadiano autossustentado e sincronização espontânea de sua atividade de disparo e expressão gênica (CASSONE et al., 1993; MAZUSKI et al., 2018a; 2002; WELSH et al., 1995). Os ritmos gerados pelos neurônios do SCN são mantidos por alças de retroalimentação de expressão dos genes do relógio (CASSONE et al., 1993; MAZUSKI et al., 2018b; MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012; REFINETTI, 2010; REPERT; WEAVER, 2002; WELSH et al., 1995) e são enviados para os órgãos periféricos por meio de sinais neurais (simpáticos e parassimpáticos) (KALSBECK et al., 2010; MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012; UYAMA et al., 1999) e hormonais. As oscilações da temperatura do ambiente também podem influenciar os ritmos circadianos. Entretanto, para os mamíferos, os ciclos de temperatura externa não são tão relevantes (MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012; REFINETTI, 2010).

Por outro lado, a microbiota intestinal é fundamental para os ritmos biológicos. Ao mesmo tempo em que a microbiota modula o ritmo circadiano do hospedeiro, a oscilação da composição e abundância da comunidade bacteriana intestinal é determinada pelos ritmos do hospedeiro (LEONE et al., 2015; LIANG; BUSHMAN; FITZGERALD, 2015; MUKHERJI et al., 2013; TEICHMAN et al., 2020; THAISS et al., 2014; ZARRINPAR et al., 2014). Um grande número de gêneros e espécies bacterianas, bem como a comunidade microbiana como um todo, exibe um comportamento oscilatório em resposta ao horário do dia (KACZMAREK; MUSAAD; HOLSCHER, 2017; LEONE et al., 2015; LIANG; BUSHMAN; FITZGERALD, 2015; TEICHMAN et al., 2020; THAISS et al., 2014; ZARRINPAR et al., 2014) e da alimentação (KACZMAREK; MUSAAD; HOLSCHER, 2017; LEONE et al., 2015; LIANG; BUSHMAN; FITZGERALD, 2015; TEICHMAN et al., 2020; THAISS et al., 2014; ZARRINPAR et al., 2014).

Interessantemente, a agenda alimentar, restrita a determinados períodos, é capaz de restaurar a ritmicidade da microbiota que havia sido interrompida em camundongos knockout para genes do relógio, previamente alimentados *ad libitum* (TEICHMAN et al., 2020; THAISS et al., 2014). Outro estudo mostrou que a dieta rica em gorduras altera a oscilação da microbiota de camundongos. Porém, quando a administração da mesma dieta acontece em horários preestabelecidos a ritmicidade da microbiota não é alterada (TEICHMAN et al., 2020; ZARRINPAR et al., 2014). Além disso, os metabólitos produzidos pela microbiota oscilam ao longo do dia e podem alterar a expressão dos genes do relógio em órgãos periféricos e no SCN do hospedeiro (LEONE et al., 2015).

Os ciclos de alimentação/jejum são extremamente importantes para a sincronização dos ritmos circadianos intestinais, uma vez que este órgão é o primeiro ponto de contato com os

nutrientes provenientes da dieta. Este alinhamento é independente dos sinais luminosos provenientes do SCN, uma vez que roedores submetidos à dieta agendada e mantidos em escuro constante ou animais com o SCN lesionado continuam exibindo oscilações circadiana no comportamento e fisiologia (MARCHANT; MISTLBERGER, 1997; MARTCHENKO et al., 2020; STEPHAN; SWANN; SISK, 1979). Especificamente, o horário da alimentação pode recuperar a flutuação da expressão gênica de vários transcritos, em um período de 24 horas, em camundongos com os genes do relógio alterados (isto é, *Cry1/2* null mice) (ASHER; SASSONE-CORSI, 2015; VOLLMERS et al., 2009). Além do horário, a composição da dieta possui um impacto na ritmicidade do comportamento alimentar em camundongos e ratos (ASHER; SASSONE-CORSI, 2015; HARIRI; THIBAUT, 2011; KOHSAKA et al., 2007). A dieta rica em gordura altera a expressão dos genes do relógio e impacta o ciclo alimentação/jejum, fazendo com que os animais consumam maior porcentagem das calorias diárias durante a fase clara do ciclo, semelhante ao que acontece com os camundongos deficientes para os genes *Clock* (ASHER; SASSONE-CORSI, 2015; KOHSAKA et al., 2007). Entretanto, a oscilação circadiana dos genes do relógio pode ser restaurada se a dieta rica em gorduras for oferecida exclusivamente durante a fase de atividade do animal (HATORI et al., 2012).

Os ciclos de alimentação/jejum expõem o lúmen intestinal a uma miríade de sinais potencialmente reguladores do ritmo circadiano periférico, como por exemplo distensão dos músculos intestinais, nutrientes, hormônios, microbiota e produtos da microbiota. Quanto aos estímulos desencadeados pelos alimentos, a nutrição é um preditor melhor das propriedades da comida do que o paladar, cheiro ou volume da comida consumida para a sincronização dos ritmos circadianos. Estudos mostraram que ratos anósmicos ou com o sistema olfativo intacto apresentam atividade antecipatória à alimentação semelhantes (COLEMAN; HAY, 1990; DAVIDSON, A. J. et al., 2003; DAVIDSON, ALEC J. et al., 2001) e que uma quantidade maior de comida palatável, não nutritiva, não é capaz de sincronizar o ritmo circadiano (DAVIDSON, A. J. et al., 2003; STEPHAN, 1997). Todavia, no mínimo 25 calorias precisam ser consumidas para alterar a fase do relógio biológico em ratos, independente do volume da comida. Além disso, a glicose é uma pista ambiental sincronizadora mais potente do que óleo vegetal (DAVIDSON, A. J. et al., 2003; STEPHAN; DAVIDSON, 1998). O contato dos nutrientes com o lúmen intestinal resulta na secreção de hormônios, como por exemplo, peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1 (GLP-1) e peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), produzidos pelas células enteroendócrinas L e K respectivamente, e desencadeiam a secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas, atenuando os níveis de glicose após a refeição (BAGGIO;

DRUCKER, 2007; HAYES et al., 2014; HAYES; DE JONGHE; KANOSKI, 2010; HOLST, 2007).

Em adição, a interação da microbiota com os alimentos gera outros sinais que podem sincronizar o ritmo circadiano, como os metabólitos resultantes da digestão de fibras e nutrientes (principalmente butirato, propionato e lactato), (GRASSET; BURCELIN, 2019; STRANDWITZ et al., 2019), ácidos biliares modificados (GRASSET; BURCELIN, 2019; WAHLSTRÖM et al., 2016), ou mesmo os próprios componentes bacterianos, como os lipopolissacarídeo (LPS) e peptidoglicanos, por exemplo (AMAR et al., 2008; FOURNEL et al., 2017; GRASSET; BURCELIN, 2019).

Curiosamente, todos estes sinais podem ser identificados e integrados por fibras vagais aferentes, que possuem terminações nervosas no trato gastrointestinal, e convergidos para o sistema nervoso central. Para tanto, o nervo vago expressa em seus terminais aferentes muitos tipos de receptores capazes de identificar uma miríade de sinais sobre o ambiente metabólico, imunológico, químico e físico (SANT'AMBROGIO; WIDDICOMBE, 2001; THOMPSON; MASTITSKAYA; HOLDER, 2019). As terminações nervosas vagais interganglionares laminares estão localizadas no tecido capsular conectivo do gânglio do plexo mioentérico, entre as camadas musculares longitudinal e circular (BERTHOUD, 2008; BERTHOUD; NEUHUBER, 2000) e respondem à tensão muscular gerada pela contração das camadas musculares (BERTHOUD, 2008; ZAGORODNYUK; CHEN; BROOKES, 2001). Na mucosa gástrica, as fibras aferentes vagais são capazes de detectar hormônios liberados localmente como a leptina e grelina (BERTHOUD, 2008; BROBERGER et al., 1999; MORIARTY et al., 1997; PATTERSON; ZHENG; BERTHOUD, 2002). No intestino delgado, a presença do receptor de CCK nas terminações vagais aferentes sugere que os nutrientes luminiais, particularmente ácidos graxos de cadeia longa e proteínas, ativam as fibras aferentes vagais via liberação de CCK pelas células enteroendócrinas adjacentes (BERTHOUD, 2008; GEARY, 2004; LAL et al., 2001; RAYBOULD et al., 2006; SMITH; JEROME; NORGREN, 1985). Por sua vez, os componentes bacterianos como o LPS ativam os receptores presentes nas terminações vagais (BONAZ; BAZIN; PELLISSIER, 2018; GOEHLER et al., 1999) e corpos celulares do gânglio nodoso (BONAZ; BAZIN; PELLISSIER, 2018; HOSOI et al., 2005). Ainda, estes estímulos presentes no lúmen intestinal podem ser transmitidos às fibras aferentes vagais pelas células enteroendócrinas, por meio do circuito neuroepitelial (BOHÓRQUEZ et al., 2015). As células enteroendócrinas são biossensores polimodais que monitoram o ambiente intestinal utilizando receptores especializados como o receptor de estímulos irritantes (canal iônico potencial receptor transiente A1 (TRPVA1)), receptor olfatório 558 (detector de

metabólitos microbianos) e o receptor adrenérgico  $\alpha 2A$  (identificador de stress relacionado às catecolaminas) (BELLONO et al., 2017; WORTHINGTON; REIMANN; GRIBBLE, 2018). Quando ativadas, estas células formam projeções citoplasmáticas denominadas neurópodes que se aproximam e fazem sinapse com as fibras aferentes vagais, transmitindo as informações sobre o lúmen intestinal em milissegundos para o nervo vago (BOHÓRQUEZ et al., 2015; KAELEBERER et al., 2018).

Por sua vez, a relação entre o nervo vago e o ciclo circadiano fica evidenciada pela expressão dos genes do relógio nos corpos celulares dos neurônios aferentes vagais, localizados no gânglio nodoso, e pela flutuação da sensibilidade destes neurônios ao longo do dia em resposta aos estímulos alimentares (KENTISH et al., 2013; PAGE, 2021). O ritmo de flutuação da mecanossensibilidade é inverso à frequência, ao tamanho da refeição e, conseqüentemente, ao conteúdo estomacal (KENTISH et al., 2013, 2016; PAGE, 2021). No gânglio nodoso existem 18 tipos diferentes de neurônios, altamente especializados (sensores de químicos, pressão, distensão, tensão e volume), e que apresentam características moleculares e genéticas bem específicas (KUPARI et al., 2019). Portanto, é plausível inferir que a atividade dos neurônios vagais aferentes que inervam o intestino também oscila ao longo do dia e de acordo com os estímulos luminais a que são expostos.

Portanto, a comunicação intestino-cérebro pode exercer sua regulação sobre os ritmos biológicos intestinais de forma direta, ou pode servir como condutora de sinais sincronizadores do ritmo circadiano para o sistema nervoso central, onde estas informações podem ser processadas (inclusive no SCN) e transformadas em respostas fisiológicas e comportamentais adaptativas aos eventos que ocorrem no intestino ao longo do dia.

Contudo, quando a comunicação intestino-cérebro é interrompida pela vagotomia ocorre a desorganização dos ritmos de expressão e fosforilação das proteínas intestinais. Nesta condição, as fosfoproteínas enriquecidas nas vias referentes aos processos imunológicos (fagossomo, processamento e apresentação de antígenos, fagocitose mediada por receptores gama FC, endocitose e regulação do citoesqueleto de actina), processos metabólicos (via pentose fosfato, metabolismo da frutose e manose, metabolismo da prolina e arginina, biossíntese de aminoácidos, metabolismo do carbono, glicólise e gliconeogênese), bem como às vias do ribossomo e junções estreitas, começam a oscilar ao longo do dia. Provavelmente a flutuação da fosfoproteínas relacionadas ao sistema imunológico resulta em um ambiente intestinal pró-inflamatório. Isso se deve ao fato de que o nervo vago interage com o sistema imunológico por meio do reflexo colinérgico anti-inflamatório, primeiramente descrito por Borovikova e colaboradores (BOROVIKOVA et al., 2000). A ativação deste circuito resulta na

diminuição da expressão das citocinas pró inflamatórias, por uma ação indireta nos macrófagos do baço (ROSAS-BALLINA, M. et al., 2011; ROSAS-BALLINA, MAURICIO et al., 2008). Posteriormente, nosso grupo de pesquisa descreveu o ramo hepático do circuito colinérgico anti-inflamatório, que em condições fisiológicas normais, aumenta a atividade de fagocitose das células de Kupffer, enquanto diante de um estímulo imunológico (sepse induzida por ligadura e punção do ceco) eleva o *clearance* bacteriano, promove um perfil anti-inflamatório e pro-regenerativo no fígado e reduz a mortalidade dos animais (FONSECA et al., 2019). No intestino, os neurônios vagais fazem sinapses com neurônios colinérgicos do sistema nervo entérico. A acetilcolina liberada por estas células neurais ligam-se aos receptores nicotínicos colinérgicos presentes na superfície dos macrófagos residentes (MATTEOLI et al., 2014), reduzindo a expressão de citocinas pró- inflamatórias e o recrutamento de células do sistema imune para o intestino (DE JONGE et al., 2005; GOVERSE; STAKENBORG; MATTEOLI, 2016). Na ausência da sinalização colinérgica, o sistema nervoso simpático pode ser ativado com maior intensidade, exacerbando o perfil pró-inflamatório dos macrófagos da lâmina própria (GABANYI et al., 2016).

Finalmente, apesar da identificação de ritmos estatisticamente significativos da expressão e fosforilação das proteínas, estas flutuações representam apenas o comportamento clássico do proteoma e fosfoproteoma intestinal ao longo do dia. Apenas 4,12% das 3277 proteínas e 0,47% das 3997 fosfoproteínas detectadas no íleo apresentaram ritmicidade ao longo do dia, nos animais com inervação vagal intacta (grupo Sham). Este fato se deve às limitações do teste de ritmicidade JTK utilizado neste trabalho, as quais também foram reportadas por outro grupo de pesquisa (WANG et al., 2018). O teste de ritmicidade JTK assume que a amostra dos dados é não-paramétrica e foi criado para analisar as oscilações rítmicas em larga escala. Simplificadamente, no teste JTK as medianas dos valores de abundância das proteínas em cada ponto (ZT) são organizadas em ordem crescente (HUGHES; HOGENESCH; KORNACKER, 2010). Neste teste, a hipótese é considerada nula quando a mediana é idêntica em dois pontos consecutivos e a hipótese alternativa é considerada válida quando a mediana for diferente entre os pontos consecutivos (HUGHES; HOGENESCH; KORNACKER, 2010). Dessa forma, o teste JTK identifica os ciclos em que as proteínas oscilam entre todos os pontos do experimento, mas não detecta os ritmos que diferem deste padrão e que podem ser extremamente importantes para a fisiologia do intestino e do organismo como um todo. Portanto, sugerimos fortemente que estes dados sejam também analisados por outros métodos estatísticos que considerem a oscilação das proteínas em apenas um ou mais pontos do ciclo.

## **7. CONCLUSÃO**

Neste trabalho reportamos que a comunicação intestino-cérebro, mediada pelo nervo vago, organiza temporalmente as proteínas e fosfoproteínas associadas a funções intestinais básicas, como digestão/absorção, metabolismo de nutrientes e barreira intestinal, de forma que o pico de abundância e fosforilação das proteínas coincida com o período de maior atividade e alimentação dos camundongos. Importaneamente, identificamos a ritmicidade, até então inexplorada, de diversas proteínas relacionadas estas funções. Portanto, este trabalho expandiu o conhecimento sobre os ritmos biológicos do intestino e possibilitará, no futuro, a formulação e investigação de novas hipóteses.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A, Reyes *et al.* Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, v. 466, n. 7304, p. 334–338, 15 jul. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20631792/>>. Acesso em: 13 set. 2021.
- AGUILAR-ARNAL, Lorena *et al.* Cycles in spatial and temporal chromosomal organization driven by the circadian clock. *Nature Structural and Molecular Biology*, v. 20, n. 10, p. 1206–1215, 22 set. 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nsmb.2667>>. Acesso em: 12 out. 2021.
- ALLAIRE, Joannie M. *et al.* *The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity*. *Trends in Immunology*. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 1 set. 2018
- ASHER, Gad; SASSONE-CORSI, Paolo. *Time for food: The intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock*. *Cell*. [S.l.]: Cell Press. , 26 mar. 2015
- BABIC, Tanja; BROWNING, Kirsteen N. The role of vagal neurocircuits in the regulation of nausea and vomiting. *European Journal of Pharmacology*, v. 722, n. 1, p. 38–47, 5 jan. 2014.
- BAKER, Christopher L. *et al.* Quantitative Proteomics Reveals a Dynamic Interactome and Phase-Specific Phosphorylation in the Neurospora Circadian Clock. *Molecular Cell*, v. 34, n. 3, p. 354–363, 15 maio 2009a.
- BAKER, Christopher L. *et al.* Quantitative Proteomics Reveals a Dynamic Interactome and Phase-Specific Phosphorylation in the Neurospora Circadian Clock. *Molecular Cell*, v. 34, n. 3, p. 354–363, 15 maio 2009b.
- BELLONO, Nicholas W. *et al.* Enterochromaffin Cells Are Gut Chemosensors that Couple to Sensory Neural Pathways. *Cell*, v. 170, n. 1, p. 185- 198.e16, 2017.
- BERCIK, Premysl *et al.* Chronic Gastrointestinal Inflammation Induces Anxiety-Like Behavior and Alters Central Nervous System Biochemistry in Mice. *Gastroenterology*, v. 139, n. 6, p. 2102- 2112.e1, 1 dez. 2010. Disponível em: <<http://www.gastrojournal.org/article/S0016508510010061/fulltext>>. Acesso em: 14 fev. 2022.
- BERTHOUD, H R; CARLSON, Neil R; POWLEY, Terry L. Topography of efferent vagal innervation of the rat gastrointestinal tract. *The American journal of physiology*, v. 260, n. 1 Pt 2, p. R200-7, 1991. Disponível em: <<http://ajpregu.physiology.org/content/260/1/R200.abstract>>.
- BERTHOUD, Hans Rudolf *et al.* Distribution and structure of vagal afferent intraganglionic laminar endings (IGLEs) in the rat gastrointestinal tract. *Anatomy and Embryology*, v. 195, n. 2, p. 183–191, 1997.
- BERTHOUD, Hans Rudolf; NEUHUBER, Winfried L. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, v. 85, n. 1–3, p. 1–17, 2000.
- BEUMER, Joep *et al.* High-Resolution mRNA and Secretome Atlas of Human Enteroendocrine Cells. *Cell*, v. 181, n. 6, p. 1291- 1306.e19, 2020.
- BOHÓRQUEZ, Diego V. *et al.* An enteroendocrine cell - Enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, 2014.
- BOHÓRQUEZ, Diego V. *et al.* Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells. *Journal of Clinical Investigation*, v. 125, n. 2, p. 782–786, 2 fev. 2015.
- BONAZ, Bruno; BAZIN, Thomas; PELLISSIER, Sonia. *The vagus nerve at the interface of*

- the microbiota-gut-brain axis. Frontiers in Neuroscience*. [S.l.]: Frontiers Media S.A. , 7 fev. 2018
- BREIT, Sigrid *et al.* Vagus Nerve as Modulator of the Brain–Gut Axis in Psychiatric and Inflammatory Disorders. *Frontiers in Psychiatry*, v. 0, n. MAR, p. 44, 13 mar. 2018.
- BROOKES, Simon J.H. *et al.* Extrinsic primary afferent signalling in the gut. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrgastro.2013.29>>. Acesso em: 7 jul. 2021. , 26 maio 2013
- BUIJS, Ruud M.; KALSBECK, Andries. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 2, n. 7, p. 521–526, 2001.
- BURDYGA, Galina *et al.* Ghrelin receptors in rat and human nodose ganglia: Putative role in regulating CB-1 and MCH receptor abundance. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 290, n. 6, jun. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16423919/>>. Acesso em: 5 jul. 2021.
- CÂMARA, Richard; GRIESSENAUER, Christoph J. Anatomy of the Vagus Nerve. *Nerves and Nerve Injuries*. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2015. v. 1. p. 385–397.
- CANI, P. D. *et al.* Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*, v. 57, n. 6, p. 1470–1481, 1 jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305141>>. Acesso em: 7 mar. 2018.
- CHELAKKOT, Chaithanya; GHIM, Jaewang; RYU, Sung Ho. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & Molecular Medicine 2018 50:8*, v. 50, n. 8, p. 1–9, 16 ago. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s12276-018-0126-x>>. Acesso em: 16 fev. 2022.
- CHEN, Jing *et al.* A Vagal-NTS Neural Pathway that Stimulates Feeding. *Current Biology*, v. 30, n. 20, p. 3986–3998.e5, 19 out. 2020. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S096098222031143X/fulltext>>. Acesso em: 6 abr. 2021.
- CHO, Hyun Jung *et al.* Differences in hormone localisation patterns of K and L type enteroendocrine cells in the mouse and pig small intestine and colon. *Cell and Tissue Research*, v. 359, n. 2, p. 693–698, 1 fev. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25378285/>>. Acesso em: 20 out. 2021.
- CIFANI, Paolo; KENTISIS, Alex. Towards comprehensive and quantitative proteomics for diagnosis and therapy of human disease. *Proteomics*, v. 17, n. 1–2, 1 jan. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25378285/>>. Acesso em: 7 dez. 2021.
- COLEMAN, Grahame J.; HAY, Margaret. Anticipatory wheel-running in behaviorally anosmic rats. *Physiology and Behavior*, v. 47, n. 6, p. 1145–1151, 1990. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2395919/>>. Acesso em: 11 out. 2021.
- COLLINS, Stephen M.; SURETTE, Michael; BERCIK, Premysl. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, n. 11, p. 735–742, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2876>>.
- COSTA, Giovanni. Shift work and occupational medicine: An overview. *Occupational Medicine*, v. 53, n. 2, p. 83–88, mar. 2003.
- CROSNIER, Cécile; STAMATAKI, Despina; LEWIS, Julian. Organizing cell renewal in the intestine: Stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews Genetics*. [S.l.: s.n.], maio 2006
- CRYAN, John F.; DINAN, Timothy G. *Mind-altering microorganisms: The impact of the gut*

- microbiota on brain and behaviour. Nature Reviews Neuroscience*. [S.l.]: Nat Rev Neurosci. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22968153/>>. Acesso em: 13 set. 2021. , out. 2012
- DAVIDSON, A. J. *et al.* Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? *Genes, Brain and Behavior*, v. 2, n. 1, p. 32–39, fev. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12882317/>>. Acesso em: 11 nov. 2020.
- DAVIDSON, Alec J. *et al.* Food-anticipatory activity persists after olfactory bulb ablation in the rat. *Physiology and Behavior*, v. 72, n. 1–2, p. 231–235, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11240001/>>. Acesso em: 11 out. 2021.
- DAVIS, Elizabeth A. *et al.* Ghrelin Signaling Affects Feeding Behavior, Metabolism, and Memory through the Vagus Nerve. *Current Biology*, v. 30, n. 22, p. 4510–4518.e6, 16 nov. 2020. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0960982220312598/fulltext>>. Acesso em: 6 abr. 2021.
- DIDIERLAURENT, Arnaud *et al.* *How the gut senses its content. Cellular Microbiology*. [S.l.]: Cell Microbiol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11896763/>>. Acesso em: 15 out. 2021. , 2002
- ECKBURG, Paul B. *et al.* Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 10 jun. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15831718/>>. Acesso em: 13 set. 2021.
- EDGAR, Rachel S. *et al.* Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature*, v. 485, n. 7399, p. 459–464, 24 maio 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22622569/>>. Acesso em: 5 out. 2021.
- EGEROD, Kristoffer L. *et al.* A major lineage of enteroendocrine cells coexpress CCK, secretin, GIP, GLP-1, PYY, and neurotensin but not somatostatin. *Endocrinology*, v. 153, n. 12, p. 5782–5795, 1 dez. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23064014/>>. Acesso em: 20 out. 2021.
- FONKEN, Laura K. *et al.* 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*, v. 107, n. 43, p. 18664–18669, 26 out. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20937863/>>. Acesso em: 5 out. 2021.
- FONSECA, R.C. *et al.* Vagus nerve regulates the phagocytic and secretory activity of resident macrophages in the liver. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 81, 2019.
- FORSYTHE, Paul; KUNZE, Wolfgang; BIENENSTOCK, John. Moody microbes or fecal phrenology: what do we know about the microbiota-gut-brain axis? *BMC Medicine* 2016 14:1, v. 14, n. 1, p. 1–14, 19 abr. 2016. Disponível em: <<https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-016-0604-8>>. Acesso em: 13 set. 2021.
- FURNESS, J. B. Parasympathetic Nervous System. *Encyclopedia of Neuroscience*, p. 445–446, 1 jan. 2009.
- FURNESS, JB. *The enteric nervous system and neurogastroenterology. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. [S.l.]: Nat Rev Gastroenterol Hepatol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22392290/>>. Acesso em: 21 set. 2021. , maio 2012
- FURNESS, John B. *et al.* The gut as a sensory organ. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, v. 10, n. 12, p. 729–740, 1 dez. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24061204/>>. Acesso em: 24 set. 2021.

- GERBE, François *et al.* Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*, v. 529, n. 7585, p. 226–230, 13 jan. 2016.
- GERHART-HINES, Zachary; LAZAR, Mitchell A. *Circadian metabolism in the light of evolution. Endocrine Reviews*. [S.l.]: Endocr Rev. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25927923/>>. Acesso em: 13 out. 2021. , 2015
- GERSHON, Michael D. The second brain : the scientific basis of gut instinct and a groundbreaking new understanding of nervous disorders of the stomach and intestine. p. 314, 1998.
- GONZÁLEZ-ARANCIBIA, Camila *et al.* Do your gut microbes affect your brain dopamine? *Psychopharmacology* 2019 236:5, v. 236, n. 5, p. 1611–1622, 17 maio 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00213-019-05265-5>>. Acesso em: 17 fev. 2022.
- GRIBBLE, Fiona M.; REIMANN, Frank. *Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. Annual Review of Physiology*. [S.l.]: Annual Reviews. , 10 fev. 2016
- GROFF, Jordan; VASUDEVAN, Srikanth; YAGHOUBY, Farid. Vagus Nerve Stimulation Unequally Disturbs Circadian Variation of Cardiac Rhythms in Male and Female Rats. 1 jul. 2020, [S.l.]: Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 1 jul. 2020. p. 3384–3387.
- GUIDA, F. *et al.* Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 67, p. 230–245, 1 jan. 2018.
- HABIB, Abdella M. *et al.* Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry. *Endocrinology*, v. 153, n. 7, p. 3054–3065, 8 jun. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC22685263/?tool=EBI>>. Acesso em: 20 out. 2021.
- HÅKANSON, R. *et al.* Histamine in endocrine cells in the stomach - A survey of several species using a panel of histamine antibodies. *Histochemistry*, v. 86, n. 1, p. 5–17, jan. 1986. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2878908/>>. Acesso em: 20 out. 2021.
- HAN, Wenfei *et al.* A Neural Circuit for Gut-Induced Reward. *Cell*, v. 175, n. 3, p. 665-678.e23, 18 out. 2018.
- HARDIN, Paul E. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. *Advances in Genetics*. [S.l.]: Adv Genet, 2011. v. 74. p. 141–173. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21924977/>>. Acesso em: 12 out. 2021.
- HARIRI, Niloofar; THIBAUT, Louise. Dietary obesity caused by a specific circadian eating pattern. *Chronobiology International*, v. 28, n. 3, p. 216–228, abr. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21452917/>>. Acesso em: 11 out. 2021.
- HAUS, Erhard; SMOLENSKY, Michael. Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer causes & control : CCC*, v. 17, n. 4, p. 489–500, maio 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16596302/>>. Acesso em: 4 abr. 2022.
- HOLLAND, Amy Marie *et al.* The enteric nervous system in gastrointestinal disease etiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 78, n. 10, p. 4713, 1 maio 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34195951/>>. Acesso em: 21 set. 2021.
- HOOGERWERF, Willemijntje A. *Biologic clocks and the gut. Current Gastroenterology Reports*. [S.l.: s.n.]. , out. 2006
- HOOGERWERF, Willemijntje A. *et al.* Clock gene expression in the murine gastrointestinal

tract: endogenous rhythmicity and effects of a feeding regimen. *Gastroenterology*, v. 133, n. 4, p. 1250–1260, 2007a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17919497/>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

HOOGERWERF, Willemijntje A. *et al.* Clock Gene Expression in the Murine Gastrointestinal Tract: Endogenous Rhythmicity and Effects of a Feeding Regimen. *Gastroenterology*, v. 133, n. 4, p. 1250–1260, 2007b.

HOOGERWERF, Willemijntje A. *Role of biological rhythms in gastrointestinal health and disease. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. [S.l.]: Rev Endocr Metab Disord. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19798581/>>. Acesso em: 12 out. 2021. , dez. 2009

HOOGERWERF, Willemijntje A. *Role of clock genes in gastrointestinal motility. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. [S.l.]: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20558764/>>. Acesso em: 11 out. 2021. , set. 2010

HOWITT, Michael R. *et al.* Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science*, v. 351, n. 6279, p. 1329–1333, 18 mar. 2016.

HUCH, Meritxell *et al.* Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell*, v. 160, n. 1–2, p. 299–312, 2015.

HUGHES, Michael E.; HOGENESCH, John B.; KORNACKER, Karl. JTK\_CYCLE: an efficient nonparametric algorithm for detecting rhythmic components in genome-scale data sets. *Journal of biological rhythms*, v. 25, n. 5, p. 372–380, out. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20876817/>>. Acesso em: 26 jan. 2022.

HURLEY, Jennifer M. *et al.* Circadian Proteomic Analysis Uncovers Mechanisms of Post-Transcriptional Regulation in Metabolic Pathways. *Cell Systems*, v. 7, n. 6, p. 613- 626.e5, 26 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30553726/>>. Acesso em: 26 jan. 2022.

HUSSAIN, M. Mahmood; PAN, Xiaoyue. *Clock genes, intestinal transport and plasma lipid homeostasis. Trends in Endocrinology and Metabolism*. [S.l.]: Trends Endocrinol Metab. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19349191/>>. Acesso em: 11 out. 2021. , maio 2009

HUTCHISON, Alan L. *et al.* Improved Statistical Methods Enable Greater Sensitivity in Rhythm Detection for Genome-Wide Data. *PLoS Computational Biology*, v. 11, n. 3, 20 mar. 2015.

JANICH, Peggy *et al.* Ribosome profiling reveals the rhythmic liver transcriptome and circadian clock regulation by upstream open reading frames. *Genome Research*, v. 25, n. 12, p. 1848–1859, 1 dez. 2015. Disponível em: <<https://genome.cshlp.org/content/25/12/1848.full>>. Acesso em: 13 out. 2021.

JOHANSSON, Malin E.V.; HANSSON, Gunnar C. *Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. Nature Reviews Immunology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 out. 2016

JOHNSON, Joel O. Autonomic Nervous System Physiology. *Pharmacology and Physiology for Anesthesia: Foundations and Clinical Application*, p. 208–217, 1 jan. 2013.

JOLY, Amélie; LEULIER, François; DE VADDER, Filipe. Microbial Modulation of the Development and Physiology of the Enteric Nervous System. *Trends in Microbiology*, v. 29, n. 8, p. 686–699, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.11.007>>.

- KACZMAREK, Jennifer L.; MUSAAD, Salma M.A.; HOLSCHER, Hannah D. Time of day and eating behaviors are associated with the composition and function of the human gastrointestinal microbiota. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 106, n. 5, p. 1220–1231, 1 nov. 2017.
- KAELBERER, Melanie Maya *et al.* A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Science*, v. 361, n. 6408, 21 set. 2018.
- KARPOWICZ, Phillip *et al.* The Circadian Clock Gates the Intestinal Stem Cell Regenerative State. *Cell Reports*, v. 3, n. 4, p. 996–1004, 25 abr. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23583176/>>. Acesso em: 12 out. 2021.
- KEITA, Å V.; SÖDERHOLM, J. D. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterology and Motility*, v. 22, n. 7, p. 718–733, 2010.
- KENTISH, Stephen J. *et al.* Circadian variation in gastric vagal afferent mechanosensitivity. *Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 49, p. 19238–19242, 4 dez. 2013. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/content/33/49/19238>>. Acesso em: 7 abr. 2021.
- KENTISH, Stephen J.; PAGE, Amanda J. *The role of gastrointestinal vagal afferent fibres in obesity*. *Journal of Physiology*. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/jphysiol.2014.278226>>. Acesso em: 12 out. 2021. , 15 fev. 2015
- KIM, Sangjune *et al.* Transneuronal Propagation of Pathologic  $\alpha$ -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. *Neuron*, v. 103, n. 4, p. 627- 641.e7, 21 ago. 2019.
- KLARER, Melanie *et al.* Abdominal vagal deafferentation alters affective behaviors in rats. *Journal of Affective Disorders*, v. 252, p. 404–412, 1 jun. 2019.
- KNUTSSON, Anders. Health disorders of shift workers. *Occupational Medicine*, v. 53, n. 2, p. 103–108, 1 mar. 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/occmed/article/53/2/103/1519795>>. Acesso em: 4 abr. 2022.
- KOHSAKA, Akira *et al.* High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. *Cell Metabolism*, v. 6, n. 5, p. 414–421, 7 nov. 2007.
- KOIKE, Nobuya *et al.* Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*, v. 338, n. 6105, p. 349–354, 19 out. 2012. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1226339>>. Acesso em: 12 out. 2021.
- KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. *Gut clock: Implication of circadian rhythms in the gastrointestinal tract*. *Journal of Physiology and Pharmacology*. [S.l.: s.n.], , abr. 2011
- KRUG, Susanne M. *et al.* Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Molecular Biology of the Cell*, v. 20, n. 16, p. 3713–3724, 15 ago. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19277931/>>. Acesso em: 15 out. 2021.
- KU, S. K.; LEE, H. S.; LEE, J. H. An immunohistochemical study of the gastrointestinal endocrine cells in the C57BL/6 mice. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, v. 32, n. 1, p. 21–28, 1 fev. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12733269/>>. Acesso em: 20 out. 2021.
- KUPARI, Jussi *et al.* An Atlas of Vagal Sensory Neurons and Their Molecular Specialization. *Cell Reports*, v. 27, n. 8, p. 2508- 2523.e4, 21 maio 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.096>>. Acesso em: 6 abr. 2021.
- LAMBERTS, R. *et al.* Somatostatin cells in rat antral mucosa: qualitative and quantitative

ultrastructural analyses in different states of gastric acid secretion. *Histochemistry*, v. 95, n. 4, p. 373–382, fev. 1991.

LANDRY, Glenn J.; MISTLBERGER, Ralph E. *Food entrainment: Methodological issues. Journal of Biological Rhythms*. [S.l.]: J Biol Rhythms. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18057323/>>. Acesso em: 11 out. 2021. , dez. 2007

LEONE, Vanessa *et al.* Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. *Cell Host and Microbe*, v. 17, n. 5, p. 681–689, 13 maio 2015.

LIANG, Xue; BUSHMAN, Frederic D.; FITZGERALD, Garret A. Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 33, p. 10479–10484, 18 ago. 2015. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/112/33/10479>>. Acesso em: 12 jul. 2021.

LIU, Simeng *et al.* Altered gut microbiota and short chain fatty acids in Chinese children with autism spectrum disorder. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 1 dez. 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202301912629?via%3Dihub>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

MAHMOUDI ANDEHKORDI, Siamak *et al.* Altered bile acid profile associates with cognitive impairment in Alzheimer’s disease—An emerging role for gut microbiome. *Alzheimer’s and Dementia*, v. 15, n. 1, p. 76–92, 1 jan. 2019.

MANAKER, Scott; FOGARTY, Patrick F. Raphespinal and reticulospinal neurons project to the dorsal vagal complex in the rat. *Experimental Brain Research*, v. 106, n. 1, p. 79–92, set. 1995. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00241358>>. Acesso em: 25 mar. 2021.

MANISCALCO, J. W.; RINAMAN, L. *Vagal interoceptive modulation of motivated behavior. Physiology*. [S.l.]: American Physiological Society. Disponível em: <[www.physiologyonline.org](http://www.physiologyonline.org)>. Acesso em: 7 abr. 2021. , 1 mar. 2018

MARCHANT, Elliott G.; MISTLBERGER, Ralph E. Anticipation and entrainment to feeding time in intact and SCN-ablated C57BL/6j mice. *Brain Research*, v. 765, n. 2, p. 273–282, 15 ago. 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9313900/>>. Acesso em: 11 nov. 2020.

MARGOLIS, Kara Gross; GERSHON, Michael D. *Enteric Neuronal Regulation of Intestinal Inflammation. Trends in Neurosciences*. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 1 set. 2016

MARTCHENKO, Alexandre *et al.* *Circadian Rhythms and the Gastrointestinal Tract: Relationship to Metabolism and Gut Hormones. Endocrinology (United States)*. [S.l.]: Endocrinology. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32954405/>>. Acesso em: 13 out. 2021. , 1 dez. 2020

MAUVOISIN, Daniel *et al.* Circadian clock-dependent and -independent rhythmic proteomes implement distinct diurnal functions in mouse liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 1, p. 167–172, 7 jan. 2014. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/111/1/167>>. Acesso em: 13 out. 2021.

MAYER, Emeran A. Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nature Reviews Neuroscience 2011 12:8*, v. 12, n. 8, p. 453–466, 13 jul. 2011. Disponível em:

<<https://www.nature.com/articles/nrn3071>>. Acesso em: 23 ago. 2021.

MISTLBERGER, Ralph E. Circadian food-anticipatory activity: Formal models and physiological mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 18, n. 2, p. 171–195, 1994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8058212/>>. Acesso em: 11 out. 2021.

MITIC, Laura L.; VAN ITALLIE, Christina M.; ANDERSON, James M. *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: Lessons from mutant animals and proteins. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. [S.l.]: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10915631/>>. Acesso em: 15 out. 2021. , 2000

MOHAWK, Jennifer A.; GREEN, Carla B.; TAKAHASHI, Joseph S. Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. *Annual Review of Neuroscience*, v. 35, n. 1, p. 445–462, 21 jul. 2012.

MOORE, Sean R. *et al.* Robust circadian rhythms in organoid cultures from Period2::Luciferase mouse small intestine. *DMM Disease Models and Mechanisms*, v. 7, n. 9, p. 1123–1130, 1 set. 2014.

MOWAT, Allan M.; AGACE, William W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, v. 14, n. 10, p. 667–685, 2014.

MUKHERJI, Atish *et al.* Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs. *Cell*, v. 153, n. 4, p. 812–827, 9 maio 2013.

NIEUWENHUIS, Rudolf; VOOGD, Jan; VAN HUIJZEN, Christian. *The Human Central Nervous System: A Synopsis and Atlas - Rudolf Nieuwenhuys, Jan Voogd, Christiaan van Huijzen - Google Books*. Disponível em: <[https://books.google.pt/books?hl=en&lr=&id=vAiFe7gZLhoC&oi=fnd&pg=PA2&dq=human+central+nervous+system&ots=tD0Vbf6CPt&sig=IEylsNj69L3btf4qbcWjwD-6wg&redir\\_esc=y#v=onepage&q=human+central+nervous+system&f=false](https://books.google.pt/books?hl=en&lr=&id=vAiFe7gZLhoC&oi=fnd&pg=PA2&dq=human+central+nervous+system&ots=tD0Vbf6CPt&sig=IEylsNj69L3btf4qbcWjwD-6wg&redir_esc=y#v=onepage&q=human+central+nervous+system&f=false)>. Acesso em: 3 ago. 2021.

NUSRAT, A.; TURNER, J. R.; MADARA, J. L. *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: Nutrients, cytokines, and immune cells. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. [S.l.]: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11052980/>>. Acesso em: 15 out. 2021. , 2000

ODENWALD, Matthew A.; TURNER, Jerrold R. The intestinal epithelial barrier: A therapeutic target? *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, v. 14, n. 1, p. 9, 1 jan. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27111111/>>. Acesso em: 6 maio 2022.

OHDO, Shigehiro. *Chronotherapeutic strategy: Rhythm monitoring, manipulation and disruption. Advanced Drug Delivery Reviews*. [S.l.]: Adv Drug Deliv Rev. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20188774/>>. Acesso em: 11 out. 2021. , jul. 2010

OHNO, Hiroshi. *Intestinal M cells. Journal of Biochemistry*. [S.l.]: Oxford University Press. , 1 nov. 2015

PAGE, Amanda J. *Gastrointestinal vagal afferents and food intake: Relevance of circadian rhythms. Nutrients*. [S.l.]: MDPI AG. , 1 mar. 2021

PANDA, Satchidananda; HOGENESCH, John B.; KAY, Steve A. *Circadian rhythms from flies to human. Nature*. [S.l.]: Nature. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12015613/>>. Acesso em: 12 out. 2021. , 16 maio 2002

- PARASRAM, Kathyani; KARPOWICZ, Phillip. Time after time: circadian clock regulation of intestinal stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 77, n. 7, p. 1267–1288, 1 abr. 2020.
- PAVLOV, Valentin A.; TRACEY, Kevin J. The vagus nerve and the inflammatory reflex - Linking immunity and metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 8, n. 12, p. 743–754, 2012.
- PELLISSIER, Sonia *et al.* Relationship between Vagal Tone, Cortisol, TNF-alpha, epinephrine and negative affects in Crohn's disease and irritable bowel syndrome. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, 1 set. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25207649/>>. Acesso em: 13 set. 2021.
- PERELIS, Mark *et al.* Pancreatic b cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion. *Science*, v. 350, n. 6261, 6 nov. 2015. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/>>. Acesso em: 9 jul. 2021.
- PONDA, Prashant; MAYER, Lloyd. Mucosal Epithelium in Health and Disease. *Current Molecular Medicine*, v. 5, n. 6, p. 549–556, 30 ago. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16178766/>>. Acesso em: 15 out. 2021.
- POTTEN, Christopher S. *et al.* CIRCADIAN RHYTHMS OF PRESUMPTIVE STEM CELLS IN THREE DIFFERENT EPITHELIA OF THE MOUSE. *Cell Proliferation*, v. 10, n. 6, p. 557–568, 1977. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/922804/>>. Acesso em: 12 out. 2021.
- PRECHTL, James C.; POWLEY, Terry L. The fiber composition of the abdominal vagus of the rat. *Anatomy and Embryology*, v. 181, n. 2, p. 101–115, fev. 1990. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00198950>>. Acesso em: 26 mar. 2021.
- PREITNER, Nicolas *et al.* The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, v. 110, n. 2, p. 251–260, 26 jul. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12150932/>>. Acesso em: 12 out. 2021.
- PREUSS, Fabian *et al.* Adverse effects of chronic circadian desynchronization in animals in a “challenging” environments. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 295, n. 6, dez. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18843092/>>. Acesso em: 12 out. 2021.
- QANDEEL, Hisham G. *et al.* Role of vagal innervation in diurnal rhythm of intestinal peptide transporter 1 (PEPT1). *Journal of Gastrointestinal Surgery*, v. 13, n. 11, p. 1976–1985, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19707837/>>. Acesso em: 11 out. 2021.
- REA, Paul. Vagus Nerve. *Clinical Anatomy of the Cranial Nerves*. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 105–116.
- REDGRAVE, J. *et al.* Safety and tolerability of Transcutaneous Vagus Nerve stimulation in humans; a systematic review. *Brain Stimulation*, v. 11, n. 6, p. 1225–1238, 1 nov. 2018.
- REIMAND, Jüri *et al.* Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nature Protocols* 2019 14:2, v. 14, n. 2, p. 482–517, 21 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41596-018-0103-9>>. Acesso em: 3 fev. 2022.
- REISCHL, Silke; KRAMER, Achim. Kinases and phosphatases in the mammalian circadian clock. *FEBS Letters*, v. 585, n. 10, p. 1393–1399, 20 maio 2011a.
- REISCHL, Silke; KRAMER, Achim. Kinases and phosphatases in the mammalian circadian

clock. *FEBS Letters*, v. 585, n. 10, p. 1393–1399, 20 maio 2011b.

ROBLES, Maria S.; COX, Jürgen; MANN, Matthias. In-Vivo Quantitative Proteomics Reveals a Key Contribution of Post-Transcriptional Mechanisms to the Circadian Regulation of Liver Metabolism. *PLOS Genetics*, v. 10, n. 1, p. e1004047, jan. 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1004047>>. Acesso em: 13 out. 2021.

ROBLES, Maria S.; HUMPHREY, Sean J.; MANN, Matthias. Phosphorylation Is a Central Mechanism for Circadian Control of Metabolism and Physiology. *Cell Metabolism*, v. 25, n. 1, p. 118–127, 10 jan. 2017a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27818261/>>. Acesso em: 27 out. 2021.

ROBLES, Maria S.; HUMPHREY, Sean J.; MANN, Matthias. Phosphorylation Is a Central Mechanism for Circadian Control of Metabolism and Physiology. *Cell Metabolism*, v. 25, n. 1, p. 118–127, 10 jan. 2017b.

RODRÍGUEZ-COLMAN, Maria J. *et al.* Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function. *Nature*, v. 543, n. 7645, p. 424–427, 16 mar. 2017.

ROENNEBERG, Till *et al.* Social jetlag and obesity. *Current biology : CB*, v. 22, n. 10, p. 939–943, 22 maio 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22578422/>>. Acesso em: 4 abr. 2022.

ROGES, Richard C. *et al.* Afferent projections to the dorsal motor nucleus of the vagus. *Brain Research Bulletin*, v. 5, n. 4, p. 365–373, 1 jul. 1980.

RUFFOLI, Riccardo *et al.* The chemical neuroanatomy of vagus nerve stimulation. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 42, n. 4, p. 288–296, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2010.12.002>>.

SANDERSON, Ian R.; WALKER, W. Allan. *Uptake and transport of macromolecules by the intestine: Possible role in clinical disorders (an update)*. *Gastroenterology*. [S.l.]: Gastroenterology. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8425707/>>. Acesso em: 15 out. 2021. , 1993

SARKAR, Amar *et al.* Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria–Gut–Brain Signals. *Trends in Neurosciences*, v. 39, n. 11, p. 763–781, 1 nov. 2016. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0166223616301138/fulltext>>. Acesso em: 13 set. 2021.

SATO, Trey K. *et al.* A functional genomics strategy reveals rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, v. 43, n. 4, p. 527–537, 19 ago. 2004.

SAVARINO, V *et al.* Circadian gastric acidity in Helicobacter pylori positive ulcer patients with and without gastric metaplasia in the duodenum. *Gut*, v. 39, n. 4, p. 508–512, 1996. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC1383261/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/90000000/)>. Acesso em: 12 out. 2021.

SCHWARTZ, Michael W. *et al.* Central nervous system control of food intake. *Nature*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/35007534>>. Acesso em: 12 out. 2021. , 6 abr. 2000

SHARMA, Dilip *et al.* Recent updates on GLP-1 agonists: Current advancements & challenges. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. [S.l.]: Biomed Pharmacother. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30372907/>>. Acesso em: 19 out. 2021. , 1 dez. 2018

SJÖLUND, K. *et al.* Endocrine Cells in Human Intestine: An Immunocytochemical Study. *Gastroenterology*, v. 85, n. 5, p. 1120–1130, 1983.

SOLLARS, Patricia J.; PICKARD, Gary E. *The Neurobiology of Circadian Rhythms*.

*Psychiatric Clinics of North America*. [S.l.]: W.B. Saunders. , 1 dez. 2015

SPENCE, Jason R.; LAUF, Ryan; SHROYER, Noah F. *Vertebrate intestinal endoderm development*. *Developmental Dynamics*. [S.l: s.n.]. , mar. 2011

STEPHAN, Friedrich K. Calories affect zeitgeber properties of the feeding entrained circadian oscillator. *Physiology and Behavior*, v. 62, n. 5, p. 995–1002, 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9333192/>>. Acesso em: 11 out. 2021.

STEPHAN, Friedrich K.; DAVIDSON, Alec J. Glucose, but not fat, phase shifts the feeding-entrained circadian clock. *Physiology and Behavior*, v. 65, n. 2, p. 277–288, 15 nov. 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9855477/>>. Acesso em: 11 out. 2021.

STEPHAN, Friedrich K.; SWANN, Jennifer M.; SISK, Cheryl L. Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behavioral and Neural Biology*, v. 25, n. 4, p. 545–554, 1979.

STIEDL, O.; HAGER, T. Cardiovascular Conditioning: Neural Substrates. *The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, p. 226–235, 1 jan. 2017.

STRANDWITZ, Philip *et al.* GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nature Microbiology*, v. 4, n. 3, p. 396–403, 1 mar. 2019.

SUAREZ, Andrea N. *et al.* Gut vagal sensory signaling regulates hippocampus function through multi-order pathways. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

SULLI, Gabriele *et al.* Training the Circadian Clock, Clocking the Drugs, and Drugging the Clock to Prevent, Manage, and Treat Chronic Diseases. *Trends in pharmacological sciences*, v. 39, n. 9, p. 812–827, 1 set. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30060890/>>. Acesso em: 4 abr. 2022.

SVENDSEN, Berit *et al.* An analysis of cosecretion and coexpression of gut hormones from male rat proximal and distal small intestine. *Endocrinology*, v. 156, n. 3, p. 847–857, 1 mar. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25535831/>>. Acesso em: 20 out. 2021.

TACHÉ, Yvette; STENGEL, Andreas. *Regulation of food intake: The gastric X/A-like endocrine cell in the spotlight*. *Current Gastroenterology Reports*. [S.l.]: Curr Gastroenterol Rep. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19903420/>>. Acesso em: 20 out. 2021. , dez. 2009

TAKAHASHI, Joseph S. *Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock*. *Nature Reviews Genetics*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrg.2016.150>>. Acesso em: 9 jul. 2021. , 1 mar. 2017

TAVAKKOLIZADEH, Ali *et al.* Differential role of vagus nerve in maintaining diurnal gene expression rhythms in the proximal small intestine. *Journal of Surgical Research*, v. 129, n. 1, p. 73–78, nov. 2005.

TEICHMAN, Emily M. *et al.* *When Rhythms Meet the Blues: Circadian Interactions with the Microbiota-Gut-Brain Axis*. *Cell Metabolism*. [S.l.]: Cell Press. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.02.008>>. Acesso em: 6 abr. 2021. , 3 mar. 2020

THAISS, Christoph A. *et al.* Transkingdom Control of Microbiota Diurnal Oscillations Promotes Metabolic Homeostasis. *Cell*, v. 159, n. 3, p. 514–529, 23 out. 2014. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0092867414012367/fulltext>>. Acesso em: 21 set. 2021.

THAISS, Christoph A. *et al.* Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host Transcriptome Oscillations. *Cell*, v. 167, n. 6, p. 1495–1510.e12, 1 dez. 2016.

- THEODORAKIS, Michael J. *et al.* Human duodenal enteroendocrine cells: Source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 290, n. 3, mar. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16219666/>>. Acesso em: 20 out. 2021.
- THINGHOLM, Tine E. *et al.* Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nature Protocols* 2006 1:4, v. 1, n. 4, p. 1929–1935, 22 nov. 2006. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nprot.2006.185>>. Acesso em: 27 jan. 2022.
- THOMPSON, Nicole; MASTITSKAYA, Svetlana; HOLDER, David. *Avoiding off-target effects in electrical stimulation of the cervical vagus nerve: Neuroanatomical tracing techniques to study fascicular anatomy of the vagus nerve. Journal of Neuroscience Methods*. [S.l.]: Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.108325>>. Acesso em: 23 mar. 2021. , 1 set. 2019
- THÖNES, Sven; OBERFELD, Daniel. Time perception in depression: A meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, v. 175, p. 359–372, 1 abr. 2015. Disponível em: <<https://khepri-node.dev.meta-infra.org/papers/time-perception-in-depression-a-meta-analysis/25665496>>. Acesso em: 3 dez. 2021.
- TOGNINI, Paola *et al.* *Circadian Coordination of Antimicrobial Responses. Cell Host and Microbe*. [S.l.]: Cell Press. , 9 ago. 2017
- TORRES-ROSAS, Rafael *et al.* Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. *Nature Medicine*, v. 20, n. 3, p. 291–295, 2014.
- Vagus Nerve , Nuclei, course, branches, structures supplied and lesion , Anatomy QA*. Disponível em: <<https://anatomyqa.com/vagus-nerve/>>. Acesso em: 17 fev. 2022.
- VAN DE WOUW, Marcel *et al.* Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain–gut axis alterations. *Journal of Physiology*, v. 596, n. 20, p. 4923–4944, 15 out. 2018. Disponível em: <<https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/JP276431>>. Acesso em: 12 jul. 2021.
- VAN DER FLIER, Laurens G.; CLEVERS, Hans. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology*, v. 71, n. 1, p. 241–260, mar. 2009.
- VOIGT, Robin M.; FORSYTH, Christopher B.; KESHAVARZIAN, Ali. Circadian rhythms: a regulator of gastrointestinal health and dysfunction. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*, v. 13, n. 5, p. 411–424, 4 maio 2019.
- VOLLMERS, Christopher *et al.* Circadian oscillations of protein-coding and regulatory RNAs in a highly dynamic mammalian liver epigenome. *Cell Metabolism*, v. 16, n. 6, p. 833–845, 5 dez. 2012.
- VOLLMERS, Christopher *et al.* 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*, v. 106, n. 50, p. 21453–21458, 15 dez. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19940241/>>. Acesso em: 11 out. 2021.
- VON MOLTKE, Jakob *et al.* Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature*, v. 529, n. 7585, p. 221–225, 14 jan. 2016.
- WATSON, C J; ROWLAND, M; WARHURST, G. Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 281, n. 2 50-2, 2001. Disponível em: <[www.ajpcell.org](http://www.ajpcell.org)>. Acesso em: 15 out. 2021.

WATSON, Charles. Motor Nuclei of the Cranial Nerves. *The Mouse Nervous System*, p. 490–498, 1 jan. 2012.

WEAVER, Cyprian. Localization of parasympathetic preganglionic cell bodies innervating the pancreas within the vagal nucleus and nucleus ambiguus of the rat brain stem: evidence of dual innervation based on the retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Journal of the Autonomic Nervous System*, v. 2, n. 1, p. 61–69, 1980.

WORTHINGTON, J. J.; REIMANN, F.; GRIBBLE, F. M. *Enteroendocrine cells-sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity*. *Mucosal Immunology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 jan. 2018

WU, Gang *et al.* MetaCycle: an integrated R package to evaluate periodicity in large scale data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 32, n. 21, p. 3351–3353, 1 nov. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27378304/>>. Acesso em: 26 jan. 2022.

XU, Zhiwei *et al.* Is Diurnal Temperature Range a Risk Factor for Childhood Diarrhea? *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, 28 maio 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23724083/>>. Acesso em: 12 out. 2021.

YOO, Bryan B.; MAZMANIAN, Sarkis K. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity*, v. 46, n. 6, p. 910–926, 20 jun. 2017. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1074761317302273/fulltext>>. Acesso em: 6 maio 2022.

YU, Xiaofei *et al.* TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science*, v. 342, n. 6159, p. 727–730, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24202171/>>. Acesso em: 5 out. 2021.

YUAN, Hsiangkuo; SILBERSTEIN, Stephen D. *Vagus Nerve and Vagus Nerve Stimulation, a Comprehensive Review: Part II. Headache*. [S.l.]: Blackwell Publishing Inc. , 1 fev. 2016

ZARRINPAR, Amir *et al.* Diet and feeding pattern affect the diurnal dynamics of the gut microbiome. *Cell Metabolism*, v. 20, n. 6, p. 1006–1017, 2 dez. 2014.

ZHANG, Ray *et al.* 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*, v. 111, n. 45, p. 16219–16224, 11 nov. 2014. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/111/45/16219>>. Acesso em: 12 out. 2021.