

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

CAMILA DE FÁTIMA CARVALHO BRITO

**PAPEL DO NERVO VAGO NA REGULAÇÃO FISIOLÓGICA E CIRCADIANA
HEPÁTICA**

Belo Horizonte
2022

Camila de Fátima Carvalho Brito

**PAPEL DO NERVO VAGO NA REGULAÇÃO FISIOLÓGICA E CIRCADIANA
HEPÁTICA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas, com ênfase em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Oliveira

Belo Horizonte
2022

043

Brito, Camila de Fátima Carvalho.

Papel do nervo vago na regulação fisiológica e circadiana hepática
[manuscrito] / Camila de Fátima Carvalho Brito. – 2022.

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

Orientador: Prof. Dr. 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. Nervo Vago. 3. Fígado. 4. Relógios Biológicos. 5. Metabolismo.
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 FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE N° 353 DE CAMILA DE FÁTIMA CARVALHO BRITO

"Papel do Nervo Vago Na Regulação Fisiológica e Circadiana Hepática"

CAMILA DE FÁTIMA CARVALHO BRITO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **31 de janeiro de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni, FCA/UNICAMP
Prof. Dr. Alan Moreira Araújo, University of Flórida
Profa. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, ICB/UFMG
Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar, ICB/UFMG
Prof. Dr. André Gustavo de Oliveira, ICB/UFMG

Belo Horizonte, 31 de janeiro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Daniele Cristina de Aguiar**, **Professora do Magistério Superior**, em 01/02/2022, às 11:42, 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 **Marcio Alberto Torsoni**, **Usuário Externo**, em 01/02/2022, às 13:49, 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 **Andre Gustavo de Oliveira**, **Professor do Magistério Superior**, em 02/02/2022, às 06:37, 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 **Alan Moreira de Araujo**, **Usuário Externo**, em 02/02/2022, às 11:51, 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 **Silvia Carolina Guatimosim Fonseca**, **Professora do Magistério Superior**, em 22/02/2022, às 08:33, 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, informando o código verificador **1197420** e o código CRC **6B0EE894**.

*Dedico esta pesquisa aos MEUS PAIS
que sempre se doam por completo e
nunca medem esforços para que eu
realize meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em todo momento, por abrir caminhos, ser auxílio, conforto e proteção; por me permitir alcançar mais um objetivo de vida. Sem Ele eu nada seria.

Minha gratidão eterna àqueles que me deram as primeiras instruções, que me ajudaram a construir valores e personalidade, que são um apoio incondicional, que lutam incansavelmente pela minha felicidade e que me fortalecem a todo momento: meus pais, meus amores eternos.

Às minhas irmãs, Alzira e Estella, por sempre acreditarem em mim, demonstrarem seu amor e abdicarem de regalias em prol do meu bem-estar ao longo de todo esse tempo em que estive distante. À minha prima e mais nova irmã, Emanuela, pela torcida irrestrita, pelas risadas e pela companhia leve, mesmo que distante.

Agradeço à minha tia-madrinha, Clara (*in memoriam*), que com sua meiguice e amor sempre declarou sua torcida com tanta alegria por mim e pelos meus caminhos trilhados nos estudos.

Gratidão incondicional ao meu orientador, André Oliveira, por desde o início ter topado me receber em seu laboratório, me ajudado na adaptação, acreditado na minha determinação, pela paciência, pelas discussões necessárias, por me ouvir sempre que foi preciso, me ajudar a desenvolver pensamento crítico, pela amizade e por todo conhecimento adquirido.

Agradeço ao Laboratório de Circuitos Neurais da UFMG, o qual fiz parte ao longo desses 4 anos, pela companhia compartilhada e colaboração nos experimentos com os alunos Bruna Vaz, Gabriel Tófani, Lorena Rosa e Evelin. Agradeço especialmente à Roberta Cristelli, que, com sua imensa paciência, sempre me ajudou, compartilhando momentos dentro e fora da Universidade e por termos conseguido conviver em harmonia. Agradeço ainda à Doutora Denise Perez, pela colaboração no início do meu trabalho.

Agradeço à minha psicóloga Emanuely Aguiar por todo apoio psicológico, de extrema importância durante essa caminhada, pelo ensino sobre autoconhecimento e pela sua torcida pelo meu sucesso.

Minha gratidão a todos os meus amigos e amigas que sempre torceram verdadeiramente por mim, longe ou perto, que acompanharam a minha caminhada, que compreendem a amizade em seu sentido mais genuíno e que me fortaleceram nos momentos difíceis.

Agradeço aos Pesquisadores colaboradores deste trabalho, prof. Dra. Sílvia Guatimosim, prof. Dr. Thiago Verano-Braga, prof. Dra. Maristela Poletini, prof. Dr. Gustavo Menezes, prof. Dra. Adaliene Versiani M. Ferreira, prof. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite, prof. Dr. Valbert Cardoso e prof. Dra. Simone Odília.

Agradeço aos alunos do programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, Núbia Nunes, Amanda Carla Oliveira e Lucas Rodrigues, pela colaboração e contribuição ao meu trabalho.

Agradeço a todos os professores e pesquisadores do programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Agradeço aos amigos e funcionários do programa Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

Agradeço também aos Professores Doutores que fizeram parte da minha banca de Qualificação: Sílvia Guatimosin, Thiago Verano-Braga e Caio Fagundes.

Agradeço às agências de fomento Capes, Fapemig e CNPq.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

BRITO, C.F.C. **Papel do nervo vago na regulação fisiológica e circadiana hepática.** Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2022,101f.

Introdução: O relógio biológico adapta a fisiologia do corpo a ciclos diários de 24 horas, antecipando e coordenando as respostas fisiológicas de acordo com as pistas ambientais. A luz é classicamente referida como a principal pista na sincronização dos ritmos circadianos, mas estudos recentes indicam que a alimentação/horário da alimentação também é um importante regulador dos relógios periféricos e da oscilação das funções fisiológicas ao longo do dia. O fígado apresenta um relógio interno que ajusta os processos fisiológicos à sua hora do dia relevante e o desalinhamento de suas funções rítmicas pode implicar em complicações hepáticas. No entanto, os componentes e os circuitos envolvidos na sincronização de seu relógio periférico através do alimento não são bem compreendidos. **Hipótese:** Como o nervo vago é uma importante fonte de inervação sensorial e motora para o fígado, e também atinge o relógio mestre no sistema nervoso central, formulamos a hipótese de que esse circuito neural poderia estar envolvido na sincronização do relógio biológico e funções fisiológicas rítmicas no fígado. **Métodos:** Para testar nossa hipótese, performamos vagotomia cervical lateral (VNX) em animais mantidos sob ciclo de luz normal e alimentados com dieta *ad libitum*. Realizamos ensaios de expressão gênica (RT-PCR) para genes de relógio, análise global de proteomas e validação fisiológica de funções hepáticas, em condições de dieta padrão e rica em carboidratos/lipídeos, em diferentes pontos do dia. **Resultados:** A VNX alterou os níveis de mRNA dos genes de relógio *Bmal1*, *Clock*, *Ror- α* e *Rev-Erba* no ZT6. Por outro lado, a VNX não impactou os ciclos diários de temperatura corporal e atividade locomotora – saídas clássicas do relógio biológico central. A VNX alterou a ritmicidade de glicose sérica e estoque de glicogênio hepático, em condições de dieta normal. Essas alterações não foram acompanhadas por mudanças na atividade alimentar, motilidade intestinal e absorção de nutrientes. Diferentes vias funcionais do fígado foram alteradas pela VNX, conforme revelado pela proteômica no ZT6. O impacto metabólico mostrou-se proeminente, com aumento na glicólise e biossíntese de ácidos graxos (etapas de iniciação e alongamento) paralelamente à redução da beta-oxidação no grupo VNX. Para validar a relevância biológica dessas descobertas, acompanhamos camundongos VNX por 5 semanas após a cirurgia. Os animais VNX acumularam lipídeos no fígado, mesmo quando alimentados com dieta padrão. Ao introduzirmos dietas ricas em carboidratos refinados (HC) e rica em ácido graxo (HFD),

notamos que o acúmulo de gordura hepática nos animais VNX tornou-se mais acentuado ainda. **Conclusão:** Juntos, nossos resultados apontam um papel autonômico parassimpático relevante sobre a regulação do relógio periférico hepático, possivelmente de modo independente do relógio central e da modulação da absorção de nutrientes, estando envolvido no controle do metabolismo do fígado durante o dia. Ainda, a redução do tônus colinérgico associada à cronodisrupção hepática, predispõe à esteatose, sendo esse acúmulo exacerbado na presença de um estresse metabólico.

Palavras-chave: Nervo vago, fígado, relógio biológico, metabolismo.

ABSTRACT

BRITO, C.F.C. **Role of the vagus nerve in hepatic physiological and circadian regulation.**

Doctoral thesis. Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, 2022,101f.

Introduction: The biological clock adapts the body's physiology to daily 24-hour cycles, anticipating and coordinating physiological responses according to environmental cues. Light is classically referred to as the main clue in the synchronization of circadian rhythms, but recent studies indicate that feeding/feeding schedule is also an important regulator of peripheral clocks and the oscillation of physiological functions throughout the day. The liver has an internal clock that adjusts physiological processes to its relevant time of day, and misalignment of its rhythmic functions can lead to liver complications. However, the components and circuitry involved in synchronizing your peripheral clock through food are not well understood. **Hypothesis:** As the vagus nerve is an important source of sensory and motor innervation to the liver, and also reaches the master clock in the central nervous system, we hypothesized that this neural circuit could be involved in biological clock synchronization and rhythmic physiological functions in the liver. **Methods:** To test our hypothesis, we performed lateral cervical vagotomy (VNX) in animals maintained under a normal light cycle and fed an *ad libitum* diet. We performed gene expression assays (RT-PCR) for clock genes, global proteome analysis and physiological validation of liver functions, under standard and carbohydrate/lipid-rich diet conditions, at different times of the day. **Results:** VNX altered the mRNA levels of the *Bmal1*, *Clock*, *Ror- α* and *Rev-Erb α* clock genes in ZT6. On the other hand, VNX did not impact the daily cycles of corporal temperature and locomotor activity – classic outputs from the central biological clock. VNX altered the rhythmicity of serum glucose and hepatic glycogen stores under normal diet conditions. These changes were not accompanied by changes in food activity, intestinal motility and nutrient absorption. Different functional pathways in the liver were altered by VNX, as revealed by proteomics in ZT6. The metabolic impact was shown to be prominent, with an increase in glycolysis and fatty acid biosynthesis (initiation and elongation steps) in parallel with the reduction of beta-oxidation in the VNX group. To validate the biological relevance of these findings, we followed VNX mice for 5 weeks after surgery. VNX animals accumulated lipids in the liver, even when fed a standard diet. When we introduced diets rich in refined carbohydrates (HC) and rich in fatty acid (HFD), we noticed that the accumulation of liver fat in VNX animals became even more pronounced. **Conclusion:** Together, our results point to a relevant parasympathetic autonomic

role on the regulation of the hepatic peripheral clock, possibly independent of the central clock and the modulation of nutrient absorption, being involved in the control of liver metabolism during the day. Furthermore, the reduction in cholinergic tone associated with hepatic chronodisruption predisposes to steatosis, and this accumulation is exacerbated in the presence of metabolic stress.

Keywords: Vagus nerve, liver, biological clock, metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diferenças anatômicas entre o fígado de humano e de roedor.

Figura 2. Desenho esquemático do fígado humano.

Figura 3. Diagrama esquemático mostrando a organização anatômica da inervação aferente vagal e espinhal do fígado de rato e órgãos associados e suas representações centrais.

Figura 4. Inervação aferente vagal subdiafragmática.

Figura 5: A maquinaria molecular do relógio biológico em mamíferos.

Figura 6. Interação entre relógios periféricos e centrais.

Figura 7. *Inputs* do sistema de relógio circadiano (luz e alimentos) e algumas funções biológicas reguladas pelos relógios central e periféricos.

Figura 8. Desenho esquemático da hipótese do trabalho.

Figura 9. Delineamento dos experimentos usando o modelo de vagotomia cervical esquerda.

Figura 10. Acompanhamento dos animais Sham e VNX, ao longo de 8 semanas, alimentados com dieta padrão e dieta rica em carboidratos (HC).

Figura 11. Acompanhamento dos animais Sham e VNX, ao longo de 4 semanas, alimentados com dieta padrão e dieta rica em gordura (HFD).

Figura 12. Desenho experimental dos grupos VNX e seu controle para o experimento que avalia gordura hepática através do marcador de lipídeos bodipy, fazendo uso da técnica de microscopia intravital.

Figura 13. Expressão do mRNA dos genes do relógio *Bmal1* e *Clock* dosados em amostra de fígado de animais sham (n=6) e vagotomizados (n=5). *p<0,05 e **p<0,01.

Figura 14. Expressão do mRNA dos genes do relógio *Rora* e *Rev-Erba* dosados em amostra de fígado de animais sham (n=6) e vagotomizados (n=5). *p<0,05 e **p<0,01.

Figura 15. Expressão do mRNA dos genes do relógio *Per1*, *Per2* e *Cry1* dosados em amostra de fígado de animais sham (n=6) e vagotomizados (n=5).

Figura 16: Medida telemétrica da Tc e atividade locomotora de animais Sham (n=6) ou submetidos a vagotomia (n=5), durante 14 dias.

Figura 17. Avaliação da alimentação (nutriente) ou do comportamento alimentar nas alterações em genes do relógio hepático no modelo de vagotomia.

Figura 18. O circuito do nervo vago e o arrastamento circadiano regulam o metabolismo do fígado.

Figura 19. O circuito do nervo vago e o arrastamento circadiano regulam a glicólise e o metabolismo dos ácidos graxos.

Figura 20. A ausência do tônuscolinérgico em conjunto com o desalinhamento circadiano hepático podem estar envolvidos no acúmulo de lipídios no fígado.

Figura 21. Acompanhamento do peso de animais e consumo alimentar durante tratamento com dieta rica em carboidratos (HC).

Figura 22. A ausência do tônuscolinérgico em conjunto com o desalinamento circadiano hepático podem estar envolvidos no acúmulo de lipídios no fígado.

Figura 23. Avaliação dos parâmetros peso corporal (**A**), glicose sérica no ZT6 (**B**), colesterol total sérico no ZT6 (**C**) e triglicerídeos sérico no ZT6 (**D**) de animais VNX e seu controle, em dieta padrão e dieta hiperlipídica. * $p < 0,03$ e ** $p < 0,01$.

Figura 24. Dosagem de glicemia em animais dos grupos sham (n=6) e vagotomizados (n=6) ao longo do dia, utilizando o kit comercial de monitorização de glicemia ACCU-CHEK (Roche Diabetes Care). * $p < 0,05$.

Figura 25. A: Quantificação de glicogênio hepático pela coloração de PAS em animais dos grupos sham (n=6) e vagotomizados (n=6) no ZT6. **B:** Corte histológico representativo do estoque de glicogênio de animais VNX e seu controle.

Figura 26. Dosagem de colesterol total no plasma de animais dos grupos sham (n=6) e vagotomizados (n=6) ao longo do dia, pelo método imunoenzimático ELISA.

LISTA DE TABELA

Tabela: Sequências de genes usados no ensaio de RT-PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAA-1 – 3-cetoacil-CoA tiolase ou acetil-coenzima aciltransferase 1

ACACA – Acetyl-CoA carboxylase 1

ACC2 – Acetyl-CoA carboxylase 2

ACOX-1 – Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1

ACSL5 – Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 5

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrópico

ALDOB – Fructose-bisphosphate aldolase B

ANOVA – Análise de Variância

ARC – Núcleo arqueado do hipotálamo

ARNTL – Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1

ATP – Adenosine triphosphate

BMAL1 – “brain and muscle ARNT-like”

cAMP – Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate

CCG – Clock-controlled genes

CCK – Cholecystokinin

CLOCK – Circadian locomotor output cycles protein kaput

CPT-1 – Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform

CRY1/2 – Cryptochrome-1/2

DMH – Hipotálamo Dorsomedial

DMN – Núcleo Motor Dorsal do Vago

DTPA – Ácido dietilenoaminopentacético

FASN – Fatty acid synthase

FBP – Fructose-1,6-bisphosphatase 1

FFA – Free Fatty Acid

FT – Flow through

G6F – glicose-6-fosfato

GAPDH – Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GCK – Hexokinase-4

GLP-1 – Glucagon-like peptide 1

GLUT2 – Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2

GPI-1 – Glucose-6-phosphate isomerase

HC – High Carbohydrate

HDAC – Histone deacetylase

HFD – High Fat Diet

LCFA-CoA – Long-chain fatty-acid-CoA ligase

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa

LH – Hipotálamo Lateral

MAFLD – Metabolic dysfunction associated fatty liver disease

MALDI-TOF – Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

NAFLD – Nonalcoholic Fatty Liver Disease

NAMPT – Nicotinamide phosphoribosyltransferase

NASH – Nonalcoholic Steatohepatitis

NCOR – Nuclear receptor corepressor

NEFA – Ácidos graxos não esterificados

NPCs – Células residentes não-parenquimais

NSQ – Núcleo Supraquiasmático

NTS – Núcleo do Trato Solitário

PBN – Núcleo Parabraquial

PCK-1 – Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP]

PDH – Pyruvate dehydrogenase

PEP – Phosphoenolpyruvate

PER 1/2 – Period circadian protein homolog 1/2

PFKL – ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type

PGC1 – Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

PGK-1 – Phosphoglycerate kinase 1

PK – Pyruvate kinase

PKA – Protein kinase A

PKLR – Pyruvate kinase

POMC – Pró-opiomelanocortin

PPARs – Peroxisome proliferator-activated receptor alpha

PVN – Núcleo Paraventricular

PYY – Peptide YY

REVERB – Nuclear receptor subfamily 1 group D member 2

ROR – Nuclear receptor ROR

RT-PCR – Reverse transcription polymerase chain reaction

SIRT1 – NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1

SNC – Sistema Nervoso Central

Tc – Temperatura corporal

TG – Triglicéridos

TTFL – Transcription translation feedback loop

VNX – Vagotomia

ZT – Zeitgeber

$\alpha 7$ nAChR – Receptores alpha 7 de Acetilcolina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
1.1 O Fígado.....	18
<i>1.1.1 Conceito, anatomia e funções.....</i>	<i>18</i>
<i>1.1.2 Inervação hepática.....</i>	<i>20</i>
1.2 O nervo vago.....	24
<i>1.2.1 Transmissão de sinais vagais pelo eixo cérebro-fígado.....</i>	<i>26</i>
1.3 O relógio biológico.....	27
<i>1.3.1 O sistema circadiano e o balanço do sistema nervoso autonômico.....</i>	<i>30</i>
<i>1.3.2 As funções do relógio biológico na fisiologia.....</i>	<i>32</i>
1.4 O relógio hepático.....	34
<i>1.4.1 Cross-talk entre relógio biológico e funções hepáticas.....</i>	<i>35</i>
<i>1.4.2 Cronodisrupção e doenças hepáticas.....</i>	<i>36</i>
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	39
2.1 Hipótese.....	39
2.2 Objetivo Geral.....	39
2.3 Objetivos específicos.....	39
3. METODOLOGIA.....	40
3.1 Animais.....	40
3.2 Vagotomia unilateral cervical.....	40
3.3 RT-PCR.....	41
3.4 Ensaio de Telemetria.....	42
3.5 Protocolo cintilográfico: Determinação da absorção intestinal ao longo do dia.....	42
3.6 Determinação do trânsito intestinal.....	43
3.7 Proteômica.....	44
3.8 Ensaios bioquímicos e histologia hepática.....	48
3.9 Desafio com dieta rica em carboidratos refinados (HC).....	49
3.10 Desafio com dieta rica em gordura (HFD).....	50
3.11 Microscopia confocal intravital.....	51
3.12 Análise Estatística.....	52

4. RESULTADOS.....	53
4.1 Análise da expressão circadiana de genes de relógio no fígado em condições fisiológicas e estudo de possíveis variações circadianas dos componentes do relógio hepático moduladas pelo circuito neural colinérgico.....	53
4.2 A alteração circadiana hepática causada pela vagotomia possivelmente é independente do relógio biológico central e pode equalizar fatores originados no próprio trato gastrointestinal	55
4.3 Análise por Proteômica de processos fisiológicos associados ao fígado que podem ter relação com a desregulação do relógio biológico e deficiência do tônus colinérgico.....	57
4.4 Ensaio para validação da relevância biológica da proteômica através da avaliação de possíveis alterações em parâmetros metabólicos, coordenados pelo fígado, que apresentam regulação circadiana, no modelo de redução de tônus colinérgico	
provocado	
pela	
vagotomia.....	60
5 DISCUSSÃO.....	67
6 CONCLUSÃO.....	80
7 REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO	

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O fígado é um órgão multifuncional responsável por integrar, auxiliar e gerir funções fisiológicas essenciais para a manutenção da homeostase do organismo, atuando, de modo geral, como órgão imunológico, como centro metabólico, como agente desintoxicante, bem como sintetizador de proteínas. Devido as suas diversificadas funções, desequilíbrios neste órgão acarretam distúrbios que representam um conjunto heterogêneo de doenças. A disfunção metabólica associada à doença hepática gordurosa (MAFLD), por exemplo, é frequentemente considerada como a principal manifestação hepática da Síndrome Metabólica e ocorre em muitos países com uma prevalência de 20–40% da população adulta (YOUNOSSI *et al.*, 2016). A MAFLD, termo recentemente proposto (ESLAM *et al.*, 2020; FOUAD *et al.*, 2020), compreende um amplo espectro de doenças que vai desde esteatose simples até esteatohepatite não alcoólica (NASH), a forma agressiva e inflamatória da MAFLD (BRUNT *et al.*, 2011), podendo progredir para cirrose e câncer hepático (FAN; PEDERSEN, 2021). Apesar de os mecanismos da patogênese da MAFLD serem bastante complexos, sabe-se que o acúmulo de gordura hepática compreende um desbalanço na regulação do metabolismo lipídico pelo fígado, com consideráveis alterações nas vias de lipogênese hepática e da oxidação lipídica nos hepatócitos.

Um aumento na prevalência da síndrome metabólica foi observado pela primeira vez em nações "ocidentalizadas" que seguem um estilo de vida ocidental. O estilo de vida ocidental é caracterizado por hábitos de vida adversos, incluindo o consumo de dietas ricas em gordura e carne vermelha, pobre em fibras, estilo de vida sedentário e disritmia circadiana. Todos esses hábitos são postulados por desregular o eixo metabólico e levar à inflamação crônica e à síndrome metabólica (ZHENG; LEY; HU, 2018).

Sabe-se que funções hepáticas relacionadas ao papel imunológico, ao metabolismo de carboidratos e lipídeos, desintoxicação e síntese de componentes essenciais do soro devem se adaptar a um ambiente sistêmico que muda ritmicamente. O fígado apresenta um sistema interno, o relógio circadiano, que ajusta os processos fisiológicos à sua hora do dia relevante, sendo usado para antecipar mudanças sistêmicas e ambientais recorrentes essenciais para o correto funcionamento do organismo. Esse relógio é capaz de atuar de modo cooperativo, mas também independente de informações do relógio central, tendo como importante sinalizador de seu ritmo autônomo o nutriente ou horário da alimentação. Por conta disso, além das alterações no tempo de exposição à luz – principal pista ambiental do relógio central –, o tipo de dieta e o consumo exagerado de alimentos podem interromper os ritmos circadianos,

resultando em disfunção celular e orgânica, incluindo disfunção metabólica (BISHEHSARI; VOIGT; KESHAVARZIAN, 2020).

Para que o fígado desempenhe suas funções rítmicas com maestria, a comunicação com o resto do corpo é essencial e ocorre através de sinais humorais e neurais. Nesse sentido, o sistema nervoso autônomo tem papel fundamental na modulação desses eventos (JENSEN; ALPINI; GLASER, 2013). Um bom exemplo a destacar, pois, é a sinalização parassimpática vagal na manutenção da homeostase de energia, uma vez que o nervo vago é capaz de conduzir informações sobre a presença de nutrientes no lúmen intestinal, de maneira rápida e bastante eficiente, para o cérebro e de volta para os órgãos gastrointestinais, incluindo o fígado. Estudos de cronobiologia também já relataram (CAILOTTO *et al.*, 2008, 2009) a participação da sinalização autonômica na condução de informações do relógio biológico central para a sincronização dos relógios de tecidos periféricos, todavia, ainda é pouco explorado se e como esses circuitos neurais, como o vagal, participam da regulação autônoma de relógios periféricos. Nesse ensejo, apesar da associação entre o relógio circadiano molecular hepático e o metabolismo serem bem estabelecidos (BASS; TAKAHASHI, 2010; PANDA *et al.*, 2002), há escassez de trabalhos que investiguem se a sinalização colinérgica mediada pelo nervo vago pode ser um elo que atue sobre as funções circadianas hepáticas.

Além do grande impacto do estilo de vida moderna sobre funções circadianas de órgãos periféricos, como o fígado, tem sido postulado que complicações hepáticas relacionadas à MAFLD também são previstas para se tornar a indicação mais frequente para transplante de fígado na próxima década (MANTOVANI *et al.*, 2020). Ademais, também há relatos sobre pacientes transplantados terem uma frequência aumentada em desenvolver esteatose hepática de novo (PERITO *et al.*, 2017), chamando a atenção para o papel da inervação hepática, que não é reconstituída em virtude do transplante, na integridade central e sistêmica regulando o metabolismo do novo órgão.

O objetivo deste trabalho é, portanto, investigar se o circuito neural mediado pelo nervo vago exerce um papel na regulação do relógio periférico hepático e os impactos da deficiência desse circuito sobre a fisiologia do fígado. Os resultados obtidos poderão representar um avanço significativo no conhecimento básico da fisiologia hepática, bem como no conhecimento da interação entre circuitos neurais, ritmos circadianos periféricos e funções hepáticas. Por fim, o trabalho contribuirá com novas possibilidades na abordagem da síndrome metabólica e suas manifestações no fígado.

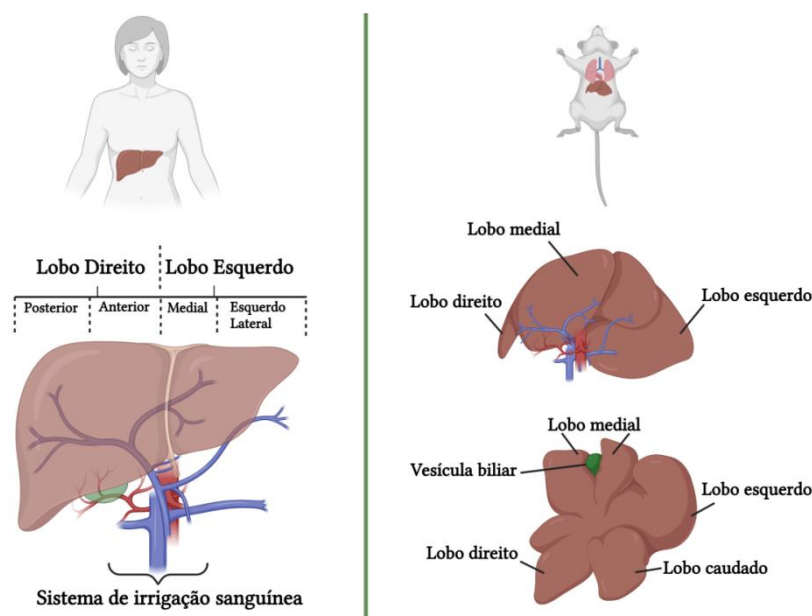
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O fígado

1.1.1 Conceito, anatomia e funções

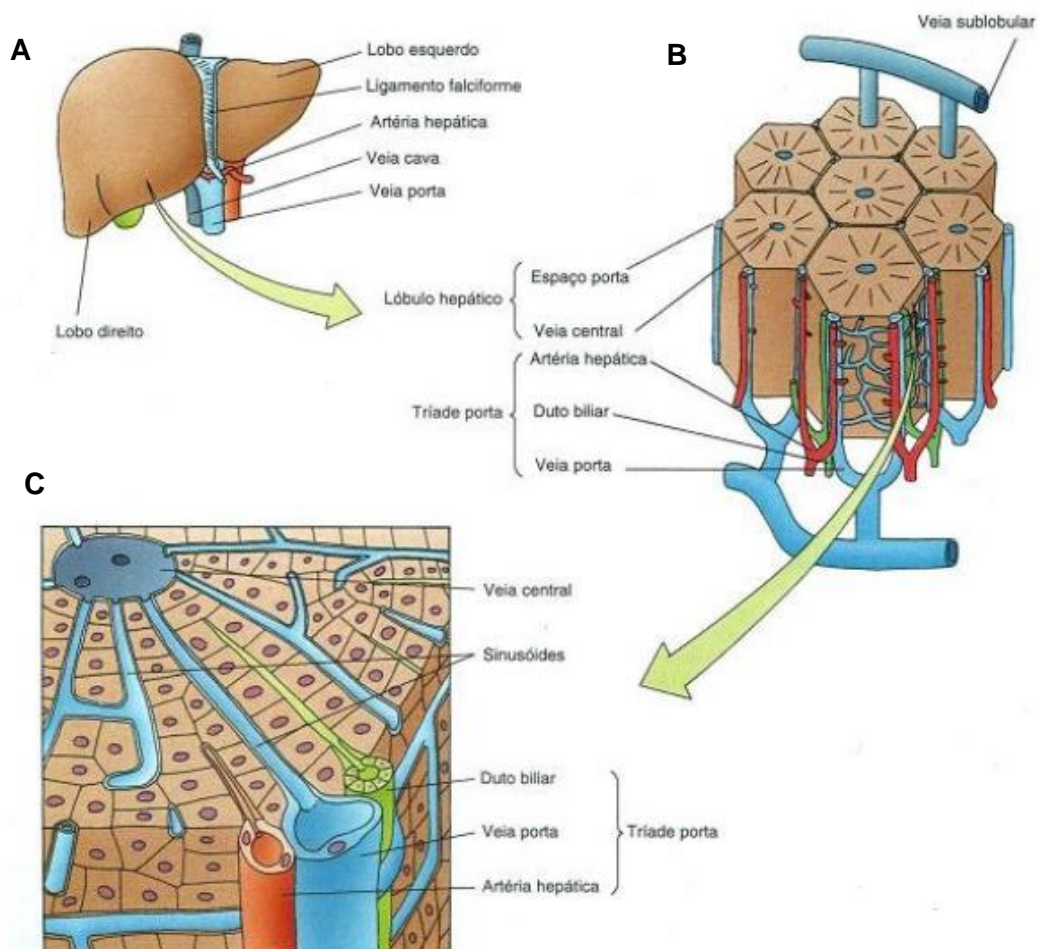
O fígado é um dos maiores órgãos sólidos no organismo, compreendendo aproximadamente 2% do peso corporal total em humanos e 5% em camundongos. Em um homem adulto o peso do fígado varia entre 1,4 a 1,6 kg, enquanto que em mulheres varia de 1,2 a 1,4 kg. Este órgão está localizado na parte superior direita do abdome entre o diafragma e o estômago. O fígado possui cinco ligamentos com a parede anterior do abdome e mais dois com o estômago, os quais permitem sua fixação ao corpo. Anatomicamente, existem quatro porções hepáticas: lobos direito, esquerdo, medial e caudato, sendo o direito o maior deles. Os vasos que se conectam ao fígado são a artéria hepática, veia porta e as veias hepáticas. Em roedores, ele está localizado na parte mais cranial da cavidade abdominal imediatamente atrás do diafragma e macroscopicamente pode ser didaticamente subdividido em quatro lobos, separados de maneira incompleta: mediano, esquerdo, direito e caudado. Sua superfície externa é revestida por uma fina camada de tecido conjuntivo, também conhecida como cápsula de Glisson, e que, por sua vez, é recoberta pelo peritônio. O hilo hepático (*porta hepatis*) é bem definido e serve de passagem para os ductos hepáticos (direito, esquerdo e comum) e para os vasos sanguíneos que irrigam ou drenam o órgão (VOLLMAR; MENGER, 2009) (Figura 1).

Figura 1. Diferenças anatômicas entre o fígado de humano e de roedor.



O fígado tem um duplo sistema de irrigação sanguínea. A veia porta, que transporta o sangue drenado dos leitos capilares do tubo digestivo, baço e pâncreas, é responsável pelo suprimento de 75% de todo o sangue que chega ao fígado. É interessante ressaltar que esse sangue é rico em nutrientes, mas é pobre em oxigênio e pode conter toxinas e micro-organismos invasores. A artéria hepática, ramo do tronco celíaco, transporta sangue bem oxigenado e fornece os outros 25% do aporte sanguíneo do fígado. O sangue proveniente dessas duas origens distintas se mistura durante a passagem nos capilares sinusoides hepáticos. Por fim, o sangue é drenado, pela veia central, dos capilares sinusoides no lóbulo hepático que se unem para formar as veias sublobulares ou intercalares que, finalmente, desembocam nas veias hepáticas. O sangue retorna ao coração através da veia cava inferior (JENNE; KUBES, 2013; VOLLMAR; MENGER, 2009) (Figura 2).

Figura 2. Desenho esquemático do fígado humano. A: anatomia macroscópica do fígado. B: lóbulos hepáticos. C: Parte de um lóbulo hepático em maior aumento.



Fonte: (HIATT, JAMES L., 2007)

O lóbulo hepático é a unidade histológica estrutural básica do fígado e possui a forma de um hexágono. Essa estrutura é delimitada por septos de tecido conjuntivo originados da cápsula de Glisson e é composta por fileiras de hepatócitos intercaladas por capilares do tipo sinusóide, além de células estreladas (ou células de Ito) e macrófagos residentes (ou células de Kupffer). Também são descritas outras populações de células do sistema imunológico no fígado, como células dendríticas, linfócitos e células *natural killer* (NK). Os hepatócitos representam a grande maioria das células hepáticas e exercem uma parte relevante das funções metabólicas e secretoras do fígado. Por outro lado, as células de Kupffer, que se situam na parede dos sinusoides hepáticos apresentam capacidade fagocítica, secretória e metabólica. Por essa razão e por estarem em contato direto com o sangue, essas células desempenham a função de identificar micro-organismos invasores e, por meio da fagocitose, eliminá-los da microcirculação hepática. Os macrófagos residentes, em conjunto com as células endoteliais, células dendríticas, células de Ito, além de linfócitos T, B e NK constituem a população de células residentes não-parenquimais (NPCs) do fígado (JENNE; KUBES, 2013). Os colangiócitos alinham os canais biliares que coletam a bile produzida pelos hepatócitos e canalizam para a vesícula biliar; as células endoteliais revestem os vasos sanguíneos hepáticos; as células estreladas são células tipo fibroblastos ativadas por estímulo inflamatório para depositar colágeno e facilitar o reparo – um processo que pode resultar em cicatrizes hepáticas, ou fibrose, no caso de inflamação crônica (BECKWITT *et al.*, 2018). Todos esses componentes celulares trabalham de modo coordenado para realizar as mais diversas funções hepáticas.

O fígado desempenha inúmeras funções essenciais para a homeostasia do organismo, tais como regulação do metabolismo de carboidratos e lipídeos, produção de lipoproteínas, fatores sanguíneos, hormônios, produção de bile (RUI, 2014), além de desempenhar várias funções imunológicas (CURTIS *et al.*, 2015). As células parenquimatosas, principalmente os hepatócitos, são responsáveis pela atividade metabólica do fígado, produção e liberação de proteínas de fase aguda, produção de proteínas plasmáticas e a integração de vários componentes do metabolismo de glicose, lipídios, nitrogênio e oxidativo (BECKWITT *et al.*, 2018).

1.1.2 Inervação hepática

O fígado é um órgão importante em nosso corpo devido ao seu papel na manutenção da homeostase e na vigilância imunológica. A comunicação com o resto do corpo é essencial para o desempenho de suas funções e ocorre através de sinais humorais e neurais. O sistema

nervoso autônomo tem papel fundamental na modulação de numerosos eventos fisiológicos do fígado (JENSEN; ALPINI; GLASER, 2013), como na regulação do compartimento neuroendócrino hepático (ROSKAMS *et al.*, 2004), metabolismo da glicose (PÜSCHEL, 2004), ritmo circadiano (MUKHERJI *et al.*, 2019b; SHIBATA, 2004), hidratação das células hepáticas e conteúdo osmolítico (HÄUSSINGER, 2004), regeneração hepática (COLLE *et al.*, 2004), reparo hepático (OBEN; DIEHL, 2004) e sistema imunológico (CHAVAN; PAVLOV; TRACEY, 2017; KANDILIS *et al.*, 2015). O aumento da frequência de transplantes de fígado despertou interesse no estudo da inervação hepática, no entanto, a observação de que o fígado continua funcionando bem, mesmo após a desnervação, levou à visão de que o impacto da inervação hepática é altamente limitado (TIMMERMANS; GEERTS, 2005). Essa visão mudou nas últimas décadas, principalmente devido ao fato de os pacientes transplantados terem uma frequência aumentada de desenvolver esteatose hepática (PERITO *et al.*, 2017), aumentada chance de desenvolverem obesidade, dislipidemia, hipertensão e diabetes mellitus anos após o transplante (BIANCHI *et al.*, 2008; LARYEA *et al.*, 2007), bem como após publicações de revisões detalhadas enfatizando os aspectos morfológicos e funcionais da inervação hepática (BARJA; MATHISON, 1984; BERTHOUD, HANS RUDOLF, 2004; HORN; FRIEDMAN, 2004; JENSEN; ALPINI; GLASER, 2013; LAUTT, 1980) e devido ao impacto que a inervação hepática pode ter sobre doenças como diabetes mellitus tipo 2, obesidade, síndromes metabólicas e outras patologias (JENSEN; ALPINI; GLASER, 2013).

O eixo neural do cérebro/fígado, que coordena as várias funções hepáticas, é bidirecional, com fibras nervosas aferentes (sensoriais) e eferentes (motoras) de origem parassimpática vagal e simpática espinhal (BERTHOUD, HANS RUDOLF, 2004), contém vias de sinalização aferente que emitem sinais do fígado para o cérebro e vias eferentes respondendo com sinais do cérebro para o fígado. Os nervos simpático e parassimpático que inervam o fígado contêm componentes aminérgicos aferentes e eferentes, colinérgicos, peptidérgicos e nitrérgicos (MCCUSKEY, 2004). Uma quantidade crescente de evidências implica papéis importantes para essa inervação na regulação do metabolismo hepático, hemodinâmica e sistema imunológico (BECKH *et al.*, 1990; CARREÑO; SEELAENDER, 2004; COX *et al.*, 2004; FRIEDMAN, SCOTT L., 2000; GLASER *et al.*, 2006; SHIMAZU, 1996).

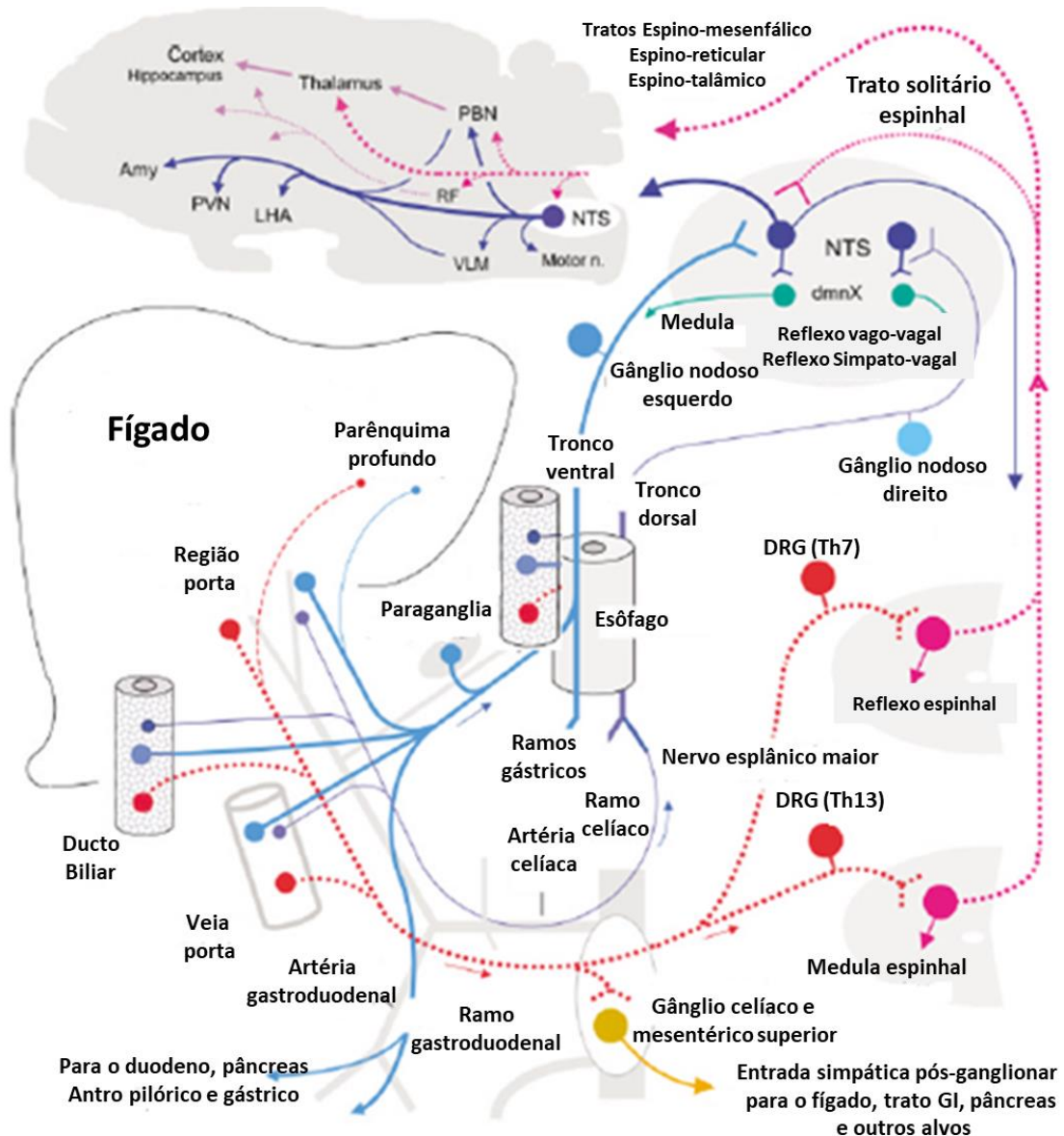
A distribuição dos nervos autonômicos no fígado é complexa e, embora existam várias técnicas experimentais que podem ser usadas para caracterizar a inervação hepática anatômica e funcionalmente, como ensaios retrógrados e rastreadores anterógrados, imuno-histoquímica, registro eletrofisiológico e ablação seletiva, a organização neural hepática varia entre espécies

e cada técnica, apesar de seus pontos fortes, tem limitações (BERTHOUD, HANS RUDOLF, 2004). No entanto, foram feitos progressos para melhorar o conhecimento básico sobre a distribuição das fibras do nervo hepático e a importância do sistema nervoso hepático na comunicação entre órgãos e na homeostase do organismo.

No que diz respeito às vias centrais dos nervos hepáticos, os neurônios aferentes parassimpáticos estão localizados nos gânglios nodosos, com processos axonais para a periferia e processos centrais para o núcleo do trato solitário (NTS) e menos na área postrema, núcleo motor dorsal e núcleo do trato solitário contralateral, enquanto os neurônios motores eferentes pré-ganglionares vagais ou com projeções abdominais superiores estão localizados no núcleo motor dorsal do vago (DMN). Nos neurônios simpáticos laterais da coluna vertebral, a inervação simpática pré-ganglionar é derivada da coluna intermediolateral (corno lateral) da medula espinhal (T7 a T12), enquanto a inervação pós-ganglionar é derivada do gânglio celíaco ou do mesentério superior (BERTHOUD, HANS RUDOLF, 2004; BERTHOUD HR, 1998).

A inervação neural que controla a função hepática é complexa e a inervação extrínseca é melhor compreendida do que a inervação intra-hepática. A **anatomia extrínseca** do sistema nervoso hepático é composta por ramos simpáticos e parassimpáticos: (I) as fibras aferentes simpáticas originárias do fígado entram no gânglio da raiz dorsal, que termina no corno dorsal da medula espinhal (BERTHOUD, HANS RUDOLF, 2004; TAHER; FARR; ADELI, 2017), geralmente, os neurônios pré-ganglionares simpáticos derivados da medula espinhal são colinérgicos e os neurônios pós-ganglionares derivados dos gânglios celíaco ou mesentérico superior são noradrenérgicos; (II) neurônios parassimpáticos que inervam o fígado são derivados principalmente do nervo vago. Estudos de rastreamento neural demonstraram que ramos que saem do vago cervical no tórax inervam também a pele, meato acústico, faringe, laringe, traquéia, brônquios, pulmão, arco aórtico, coração e esôfago. À medida que os troncos vagais ventral (esquerdo) e dorsal (direito) entram no abdome através do diafragma, eles se dividem em vários ramos com padrões de inervação de órgãos ligeiramente diferentes. Os ramos celíaco ventral, dorsal gástrico e acessório dorsal têm inervação no fígado, mas unem-se predominantemente ao ramo celíaco ventral, inervando o duodeno distal, jejuno, íleo, ceco e cólon. O ramo hepático comum deriva exclusivamente do tronco ventral. Como o nome sugere, esse ramo fornece inervação à tríade hepática, que compreende a artéria hepática, o ducto biliar e a veia porta no fígado, mas também se ramifica para inervar partes inferiores do estômago, esfíncter pilórico, pâncreas e duodeno proximal (BERTHOUD HR, 1998; DE LARTIGUE, 2016) (Figura 3).

Figura 3. Diagrama esquemático mostrando a organização anatômica da inervação aferente vagal e espinal do fígado de rato e órgãos associados e suas representações centrais. A inervação aferente vagal é mostrada em linhas sólidas em azul, a inervação aferente espinal em linhas tracejadas em vermelho. A abundância relativa da inervação é indicada pela espessura dos axônios e pelo diâmetro dos pontos que representam os terminais sensoriais nos vários compartimentos.



Fonte: (BERTHOUD, HANS RUDOLF, 2004) (Adaptada).

Foi demonstrado que as fibras nervosas entram no fígado através de dois plexos formados por nervos simpático e parassimpático que se comunicam através do: **i)** plexo anterior colocado ao redor da artéria hepática, consistindo de fibras nervosas com sua origem no gânglio celíaco e nervo vago esquerdo e **ii)** plexo posterior localizado ao redor da veia

porta e do ducto biliar, formado por fibras do gânglio celíaco e do vago direito (STREBA, 2014). Alguma inervação adicional no fígado também pode acompanhar a veia hepática (FRIEDMAN, RW, 1988).

No que diz respeito à **anatomia intrínseca** do sistema nervoso hepático, a distribuição intra-hepática dos nervos é incompletamente compreendida e, embora as técnicas de conhecimento e manipulação tenham avançado nos últimos anos, ainda existem algumas limitações que dificultam o estudo da inervação intra-hepática. Um obstáculo está na dificuldade de experimentos com desnervação ou estimulação de ramos nervosos mais específicos do fígado, uma vez que o fígado é suprido por muitos braços nervosos, de modo que as técnicas neurobiológicas precisam ser aprimoradas (BERTHOUD, HANS RUDOLF, 2004). Além disso, embora existam marcadores neuroquímicos disponíveis para técnicas imuno-histoquímicas para estudar a identidade dos nervos intra-hepáticos, a maioria desses marcadores não é completamente específica para fibras aferentes ou eferentes nessa área. Esse aspecto foi discutido anteriormente (BERTHOUD, HANS RUDOLF, 2004; BERTHOUD HR, 1998; FUKUDA *et al.*, 1996; KANDILIS *et al.*, 2015; LAUTT, 1980; MCCUSKEY, 2004). No entanto, houve progresso na caracterização da neuroanatomia intra-hepática em humanos e outras espécies (JENSEN; ALPINI; GLASER, 2013).

As dificuldades descritas acima, a respeito do estudo e caracterização da inervação hepática, não limitam completamente ou descredibilizam resultados de pesquisas envolvendo investigações funcionais neurohepáticas, como as realizadas neste estudo, uma vez que é incontestável que o fígado é um órgão comprovadamente innervado, restando apenas atentar para a ponderação na interpretação dos dados, levando-se sempre em consideração a relação conjunta e a coexistência fisiológica e funcional dos demais órgãos e sistemas.

1.2 O nervo vago

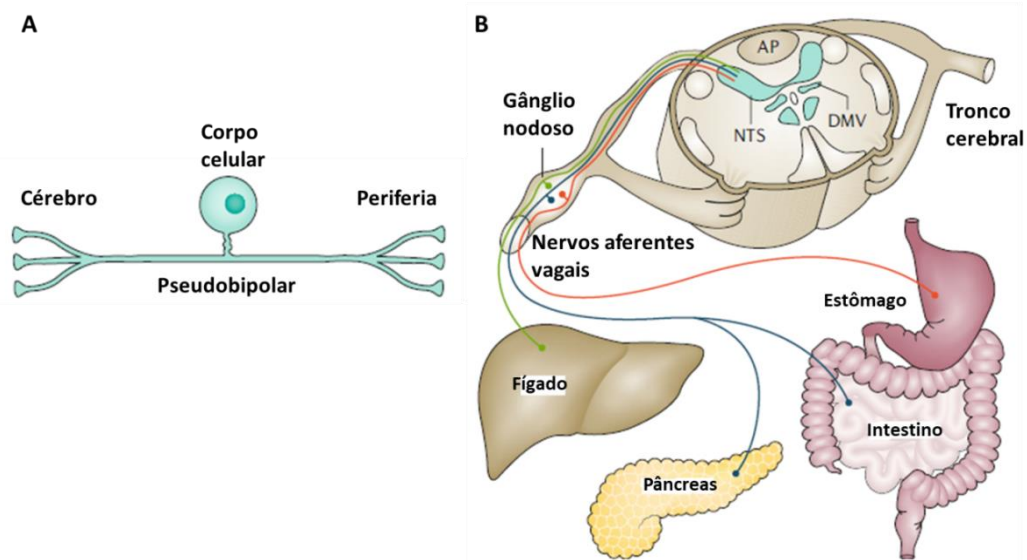
O nervo vago, ou X nervo craniano, é o principal componente do sistema nervoso autonômico parassimpático (PAVLOV, VALENTIN A.; TRACEY, 2012). Seu nome deriva da palavra em Latim “*vagus*”, cujo significado mais próximo em Português é “errante”. Essa nomenclatura foi utilizada pela característica anatômica do nervo, que possui um caminho tortuoso, que se desvia do traçado original e inerva diversos órgãos, incluindo coração, pulmão e o trato gastrointestinal. O X nervo craniano é considerado misto por possuir fibras aferentes (sensoriais) e eferentes (motoras) (MCCUSKEY, 2004). Em camundongos o nervo vago é composto por aproximadamente 2.300 fibras aferentes e um número bem menor de fibras eferentes (WILLIAMS *et al.*, 2016).

O rápido processamento e transmissão de sinais do nervo vago dependem da estrutura e atividade do sistema aferente vagal e, assim, o padrão de ramificação do nervo aferente vagal é essencial para determinar as funções biológicas seletivas. Os neurônios do sistema aferente vagal são pseudobipolares e detectam vários sinais na periferia (Figura 4A) que são transmitidos ao NTS do tronco cerebral para exercer respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais (BJ UNDEM, 2005). Esses corpos celulares neuronais estão localizados em duas estruturas separadas em forma de fuso conhecidas como gânglios nodosos esquerdo e direito (gânglios sensoriais cranianos) que residem sob o forame jugular (entre os ossos occipitais) próximo ao seio carotídeo (MARIA A. PATESTAS, 2016; MONKHOUSE, 2005; WAISE; DRANSE; LAM, 2018).

O padrão de ramificação desses neurônios é semelhante na maioria das espécies estudadas, incluindo humanos (HAMMER *et al.*, 2015; LIU, HONG-FU *et al.*, 2015), em que os ramos do nervo vago esquerdo e direito entram no abdome como dois troncos (ventral e dorsal) e se dividem em ramos distintos primários no nível esofágico subdiafragmático (WANG, FENG-BIN; YOUNG; KAO, 2012). O gânglio nodoso esquerdo inerva o fígado através do ramo hepático, a superfície dorsal do estômago via ramos gástricos e o pâncreas através do ramos acessórios celíaco e hepático. O gânglio nodoso direito recebe sinais da superfície ventral do estômago, através dos ramos gástricos, e do pâncreas, através do ramos celíacos (BERTHOUD, H. R.; CARLSON; POWLEY, 1991; BERTHOUD, HANS-RUDOLF; NEUHUBER, 2000).

As fibras aferentes do nervo vago enviam informações sensoriais viscerais para o NTS, na medula oblongata. Em seguida, essas fibras integram a informação com o hipotálamo e regiões cerebrais superiores responsáveis pelo controle das funções autonômicas e respostas comportamentais (GOEHLER *et al.*, 2000). A comunicação bidirecional entre os neurônios do NTS e do DMN ativa fibras eferentes que descendem para diversos órgãos periféricos incluindo o trato gastrointestinal e os órgãos componentes do sistema reticuloendotelial (MCCUSKEY, 2004; PAVLOV, VALENTIN A; TRACEY, 2017). As fibras eferentes do nervo vago são moduladas no sistema nervoso central (SNC) pelos receptores muscarínicos de acetilcolina (PAVLOV, V. A. *et al.*, 2006; PAVLOV, VALENTIN A.; TRACEY, 2012) (Figura 4B).

Figura 4. Inervação aferente vagal subdiafragmática. **A:** Os neurônios aferentes vagais são pseudobipolares. O axônio bifurca-se com uma extremidade terminando no tronco cerebral e outra em um local periférico; **B:** No nível subdiafragmático, os neurônios aferentes vagais inervam o fígado, estômago, intestinos e pâncreas e retransmitem sinais para o tronco cerebral para regular as funções de corpo inteiro. AP, área postrema; DMV, núcleo dorsal motor do vago; NTS, nucleus tractus solitaries.



A sinalização parassimpática participa diretamente do controle homeostático do organismo uma vez que regula diversas funções vitais, como por exemplo a frequência cardíaca, secreção e motilidade intestinal, produção hepática de glicose, dentre outras funções viscerais (PAVLOV, VALENTIN A.; TRACEY, 2012). Além dessas funções, nas últimas décadas o nervo vago tem sido apontado como mediador da interação entre o sistema nervoso e o sistema imunológico, sendo sua participação indispensável para o reflexo inflamatório (TRACEY, 2002).

1.2.1 Transmissão de sinais vagais pelo eixo cérebro-fígado

O nervo vago é a principal fonte de inervação do trato gastrointestinal. De todos os órgãos abdominais, o fígado é o que recebe a maior quantidade de fibras do nervo vago, tanto aferentes quanto eferentes. Para se ter uma ideia, aproximadamente 30% de todas as fibras vagais subdiafragmáticas são encontradas no ramo hepático comum do nervo vago (BERTHOUD, H. R.; CARLSON; POWLEY, 1991). Esse nervo possui fibras aferentes e eferentes, encarregados da transmissão de estímulos das vísceras para o sistema nervoso central e deste de volta às vísceras. As vias aferentes do sistema vagal são compostas por neurônios cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios nodosos e conduzem informações sensoriais até o NTS, no SNC. Por outro lado, as fibras eferentes do nervo vago, originadas a

partir de neurônios localizados no DMN e no núcleo ambíguo e suas terminações inervam as mesmas estruturas das fibras aferentes.

O nervo vago, como o nervo craniano mais longo, é o elo principal entre o fígado e o cérebro e, depois de deixar o cérebro, no tórax, o ramo vagal esquerdo forma o tronco vagal anterior que entra no abdomen através do hiato esofágico originando o ramo hepático vagal. Esses ramos juntam-se ao plexo hepático e através dele são distribuídos para o fígado em seu hilo e abastecem o órgão (HAJIASGHARZADEH; BARADARAN, 2017).

Recentemente, um grupo de cientistas mostrou que as células neuroendócrinas presentes na mucosa do tubo digestivo são capazes de realizar sinapse com as fibras aferentes do nervo vago (KAELBERER *et al.*, 2018). Esse circuito neuroepitelial mediado pelo nervo vago é capaz de conduzir informações sobre a presença de nutrientes no lúmen intestinal, tipos de nutrientes presentes na ingesta (ácidos graxos e carboidratos), metabólitos produzidos pela microbiota, toxinas e alterações mecânicas no tubo digestivo de maneira rápida e bastante eficiente, para o cérebro e de volta para os órgãos gastrointestinais, incluindo o fígado. O sistema neuroepitelial descrito é recrutado e ativado antes mesmo da produção e secreção dos hormônios que classicamente são descritos como regulatórios da função gastrointestinal.

O papel modulatório potencial do nervo vago tem sido ainda previamente relacionado a algumas doenças metabólicas e inflamatórias crônicas (GIDRON *et al.*, 2018) e a um conjunto de fatores de riscos, incluindo obesidade, níveis elevados de lipídeos, glicose e pressão arterial, que podem ser vistos como uma doença por si só, bem como um fator de risco para outras doenças, e, em vista da sua importância fisiológica, alguns trabalhos sugerem que uma via comum que poderia unificar a etiopatogenia das doenças descritas acima pode envolver o nervo vago (DE COUCK; MRAVEC; GIDRON, 2012).

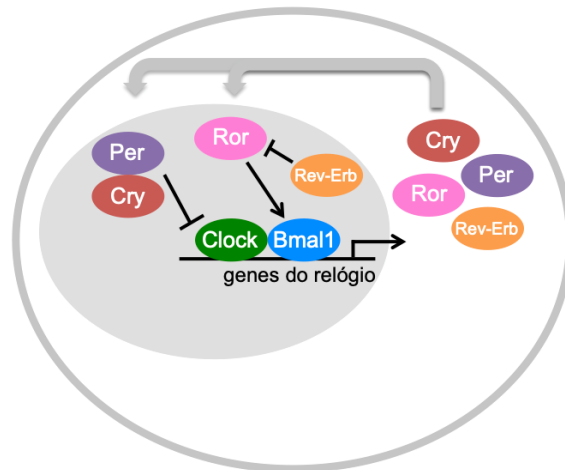
1.3 O relógio biológico

Em mamíferos, o relógio biológico é um temporizador que adapta a fisiologia corporal a ciclos diários de 24 horas, também conhecidos como "ritmo circadiano" (DIERICKX; VAN LAAKE; GEIJSEN, 2018). Este relógio antecipa e coordena respostas fisiológicas, comportamentais e bioquímicas, influenciando uma miríade de processos fundamentais tais como atividade, temperatura corporal, comportamento alimentar, regulação do ciclo celular, secreção hormonal, dentre outras, além de ser importante para a coordenação de respostas altamente integradas de sistemas, tais como metabolismo, homeostasia cardiovascular e função imune (CURTIS *et al.*, 2015). Quando esse sistema de relógio é defasado, seja por

privação ou má qualidade do sono, alteração no horário da alimentação, *jet lag* ou em casos dos trabalhadores em turnos rotativos (SHETTY *et al.*, 2018), ocorre uma perturbação profunda dos relógios moleculares e, a longo prazo, está associado a uma ampla gama de distúrbios, incluindo síndrome metabólica (GARAULET; ORDOVÁS, 2013), doenças vasculares (VYAS *et al.*, 2012) e maior risco de cancer (HAUS; SMOLENSKY, 2013).

Os ritmos biológicos dependem de um programa molecular complexo composto por uma alça transcricional-traducional de retroalimentação positiva e negativa de genes conhecidos como "genes do relógio", compreendidos em *Bmal1*, *Clock*, *Per1* e *Per2* (period), *Cry1* e *Cry2* (cryptochrome), *Reverb α/β* e *Ror $\alpha/\beta/\gamma$* (Figura 5). As proteínas BMAL1 e CLOCK formam um heterodímero que ativa a transcrição dos genes *Per* e *Cry*, e outros genes controlados pelo relógio (CCG), ligando-se a elementos responsivos E-box dentro de seus promotores. As proteínas CRY e PER são subsequentemente fosforiladas por CKI (caseína quinase I) ϵ ou CKI δ e translocadas para o núcleo, onde reprimem a atividade transcricional das proteínas BMAL1 e CLOCK. Por outro lado, a transcrição de *Bmal1* é reprimida por REV-ERB α (também conhecido como NR1D1) e REV-ERB β (também conhecido como NR1D2) e ativada por ROR (receptor órfão relacionado a RAR) α , ROR β e ROR γ , via ligação a seu elemento responsivo a ROR nas regiões promotoras. As famílias de genes *Rev-erb* e *Ror* são, por sua vez, reguladas positivamente pelas proteínas BMAL1 e CLOCK. Dessa forma, um conjunto de genes ativa a expressão de outro grupo de genes que, por sua vez, reprimem a expressão dos ativadores iniciais. A presença desse relógio circadiano interno é uma característica comum a todos os tecidos e permite que eles sejam interconectados para que, juntos, possam produzir ritmos sincronizados de inúmeras funções biológicas (MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012).

Figura 5: A maquinaria molecular do relógio biológico em mamíferos. A alça transcricional-traducional de retroalimentação positiva e negativa envolve a ativação do heterodímero CLOCK/BMAL1, que estimula a expressão dos genes *PER1*, *PER2*, *CRY*, *REVERB α* e *ROR α* . Os genes *PER* e *CRY* formam outro heterodímero e, assim como *REVERB α* , inibem a expressão de *CLOCK/BMAL1*. O gene *ROR α* , por sua vez, faz parte da alça de retroalimentação positiva do complexo, uma vez que ele regula positivamente a expressão de *BMAL1*.



O modelo inicial e geralmente aceito do sistema do relógio circadiano sugere uma organização hierárquica desse sistema, existindo um relógio central controlado pelo núcleo supraquiasmático (NSQ) no SNC, que atua como um marcador principal e dirige o ritmo dos tecidos centrais e periféricos através de sinais humorais, como hormônios, ou diversos circuitos neurais (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010; KOWALSKA; BROWN, 2007; LOWREY; TAKAHASHI, 2011; WEIGL *et al.*, 2013).

Tradicionalmente, acredita-se que a interação da luz com o sistema retinohipotalâmico seja a principal pista ambiental na sincronização dos relógios biológicos (BERSON; DUNN; TAKAO, 2002). A retina, uma das estruturas presente nos olhos, é composta por aproximadamente 10 camadas funcionais diferentes. De especial interesse é a camada ganglionar, cujos neurônios possuem melanopsina, um pigmento altamente sensível à luz. A interação da luz com a melanopsina estimula esses neurônios e essa informação é transmitida para o cérebro através do nervo óptico. Os núcleos visuais possuem projeções para o NSQ e essa informação acerca da luminosidade ambiental é então usada para sincronizar o relógio central com o ambiente (BELENKY *et al.*, 2003; NAJJAR; ZEITZER, 2016; PROVENCIO *et al.*, 2000). Vários sinais humorais e nervosos são originados a partir do NSQ e atuam nos tecidos periféricos. Essa interpretação é corroborada por estudos que mostram a dessincronização dos ritmos periféricos após a lesão do NSQ, relógio central (REPPERT; WEAVER, 2002; SEGAL *et al.*, 2018).

1.3.1 O sistema circadiano e o balanço do sistema nervoso autonômico

O relógio biológico central e sua regulação sobre o SNC e órgãos periféricos é bem caracterizado na literatura desde a descoberta do NSQ, em 1972. De forma bem evidenciada sabe-se que, a fim de manter a homeostase, o hipotálamo – área-alvo onde se encontra o NSQ – não só precisa integrar as informações do ambiente, corpo e cérebro, mas também traduzir esta informação em uma resposta que sirva para manter homeostase. Para esse fim, é necessária uma rede intrincada de conexões entre as diferentes funções do núcleo hipotalâmico de tal forma que as informações podem ser trocadas e compartilhadas, fazendo parte dessa rede a produção hormonal e os circuitos neurais autonômicos (BUIJS; ESCOBAR; SWAAB, 2013).

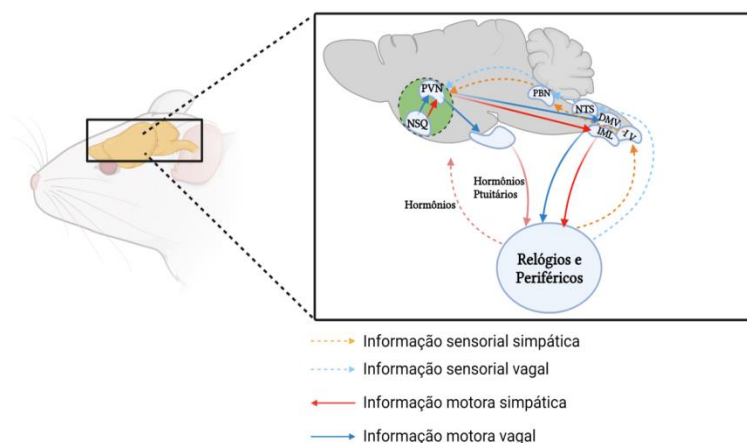
As projeções do NSQ atingem diferentes níveis hipotalâmicos onde neurônios separados do NSQ têm como alvo neurônios pré-autonômicos parassimpático ou simpático no Núcleo Paraventricular (PVN) ou Hipotálamo Lateral (LH). Essas conexões autonômicas servem para transmitir a mensagem diretamente do NSQ para os órgãos periféricos, permitindo que o NSQ module, por exemplo, a pressão sanguínea e frequência cardíaca através dos sistemas simpático e parassimpático com um tempo completamente diferente e uma configuração autonômica distinta (KREIER *et al.*, 2006; SCHEER *et al.*, 2001, 2009). Além disso, essas conexões autonômicas servem para cronometrar a produção de glicose no fígado e sensibilidade à insulina, dependendo da hora do dia (LA FLEUR *et al.*, 2001; YI *et al.*, 2012). Por outro lado, o NSQ também envia projeções às áreas que servem para integrar informações, como o Núcleo Hipotalâmico Dorsomedial (DMH) e o Núcleo Paraventricular do Tálamo (PVT).

As informações que chegam ao NSQ são traduzidas principalmente pelo PVN em um sinal hormonal e autonômico. Esses sinais hormonais, parassimpáticos e simpáticos atingirão órgãos periféricos como a glândula adrenal, fígado, tecido adiposo e gônadas. A partir desses órgãos, as informações sensoriais, viscerais e hormonais chegarão ao hipotálamo. A informação sensorial simpática entra no cérebro ao nível das camadas I e V do corno dorsal e chegará ao hipotálamo através NTS e do núcleo parabraquial (PBN). A informação sensorial vagal entra no cérebro no nível do NTS e chega ao hipotálamo direta ou indiretamente por meio do PBN (Figura 6). Essas conexões fornecem ao hipotálamo informações que permitem ao organismo ajustar e equilibrar as informações claro-escuras periféricas com as informações metabólicas dos órgãos periféricos (BUIJS; KALSBECK, 2001a). Buijis e Kalsbeek (2001) foram um dos primeiros estudiosos a chamarem atenção ao fato de que o NTS e o PBN visam fortemente as mesmas estruturas hipotalâmicas que são inervadas pelo NSQ e concluíram que

essas observações indicam um terreno comum para o funcionamento dos sistemas de relógio. Dessa forma, os relógios periféricos, assim como o relógio central, podem controlar os núcleos hipotalâmicos para manter o equilíbrio entre o corpo e o cérebro.

A maioria dos mecanismos que podem influenciar ritmos nos órgãos periféricos está, portanto, relacionada ao sinal do relógio central no NSQ, sendo exemplos a temperatura corporal, atividade locomotora, secreção de hormônios como corticosterona e melatonina e o comportamento alimentar. Apesar de o ritmo de genes do relógio na periferia estar fortemente acoplado ao NSQ, evidências mais recentes têm demonstrado que a luz não é a única pista ambiental capaz de modular os relógios periféricos, contrariando o modelo hierárquico desse sistema e gerando debate intenso entre cronobiologistas (BUIJS; ESCOBAR; SWAAB, 2013). A literatura científica tem mostrado, cada vez mais, que a alimentação é outro fator envolvido na sincronização dos ritmos em tecidos periféricos, sobretudo em órgãos do trato gastrointestinal, mesmo em condições normais de ciclo claro/escuro (ASHER; SASSONE-CORSI, 2015a; BISHEHSARI *et al.*, 2016). Em outras palavras, cientistas têm demonstrado que o horário de alimentação é importante para o funcionamento correto do relógio biológico periférico, entretanto, os mecanismos pelos quais a alimentação impacta esse relógio ainda não são completamente conhecidos.

Figura 6. Interação entre relógios periféricos e centrais. Uma ilustração das principais vias pelas quais os relógios periféricos e centrais podem se comunicar com o sistema nervoso central. Adaptada de Buijs e Kalsbeek (2001).



Fonte: (BUIJS; KALSBECK, 2001b)

A partir da análise da literatura, observa-se que, embora exista entendimento sólido da importância da integração autonômica na modulação de funções do organismo com oscilação circadiana, grande parte das investigações concentra-se no papel dos sistemas autonômicos em transmitir as informações de luz do NSQ, indicando que o sistema nervoso autônomo é uma importante porta de entrada para o relógio central reinicializar a fisiologia periférica, através da luz. Contudo, poucos ainda são os trabalhos que exploram se a inervação autonômica direta sobre órgãos periféricos, através dos seus ramos sensoriais (aférentes), pode atuar no reconhecimento ou como transmissores de outros *Zeitbergers*, como o nutriente.

1.3.2 As funções do relógio biológico na fisiologia

O relógio molecular coordena as mais variadas funções fisiológicas do organismo, funções estas consolidadas e bem descritas na literatura (PILORZ; HELFRICH-FÖRSTER; OSTER, 2018; ROENNEBERG; MERROW, 2016) (Figura 7).

No sistema imune, por exemplo, o relógio biológico regula muitos aspectos de suas funções e a maioria das células imunes, como células T, granulócitos e macrófagos, apresenta variações diárias em sua função. Além disso, muitos genes responsáveis pelo reconhecimento de patógenos e secreção de citocinas exibem expressão circadiana robusta (HAYASHI; SHIMBA; TEZUKA, 2007; HUSSE *et al.*, 2014; KELLER *et al.*, 2009). Portanto, a interrupção dos relógios e ritmos circadianos tem efeitos prejudiciais sobre a função imune e as respostas aos patógenos (BOLLINGER *et al.*, 2011; WANG, WEI *et al.*, 2011). Por outro lado, a própria resposta inflamatória pode alterar a expressão celular dos genes do relógio (COOGAN; WYSE, 2008). O trabalho constante em turnos noturnos está fortemente associado ao desenvolvimento de inúmeras doenças imuno-associadas, como distúrbios cardiovasculares, câncer e inflamação metabólica (HARRINGTON, 2010; PILORZ; HELFRICH-FÖRSTER; OSTER, 2018).

No sistema cardiovascular, por sua vez, o ritmo do batimento cardíaco é caracterizado por uma flutuação diurna com frequência e débito cardíaco mais altos durante a fase ativa e diminuídos durante a fase do sono (DURGAN; YOUNG, 2010). Isso resulta em um ritmo concomitante no sangue dos tecidos e, portanto, na suplementação de oxigênio e nutrientes. No nível molecular, a expressão de genes do relógio exibe oscilações nos músculos lisos vasculares, veias e artérias. Modelos genéticos de camundongos com função de relógio circadiano alterado mostram um grau variado de anormalidades na frequência cardíaca e

outros ritmos circadianos cardíacos, dependendo de qual componente distinto do relógio circadiano é modificado (BRAY *et al.*, 2008; DURGAN; YOUNG, 2010).

Muitos componentes do sistema endócrino exibem ritmos dependentes da hora do dia. Os fatores endócrinos mais bem estudados entre os quais flutuam ao longo do dia são glicocorticóides, hormônio do crescimento, prolactina, hormônio da tireóide, hormônios sexuais e melatonina (AVRAM *et al.*, 2005; PILORZ; HELFRICH-FÖRSTER; OSTER, 2018; RUSSELL *et al.*, 2008; TANOUE *et al.*, 2004).

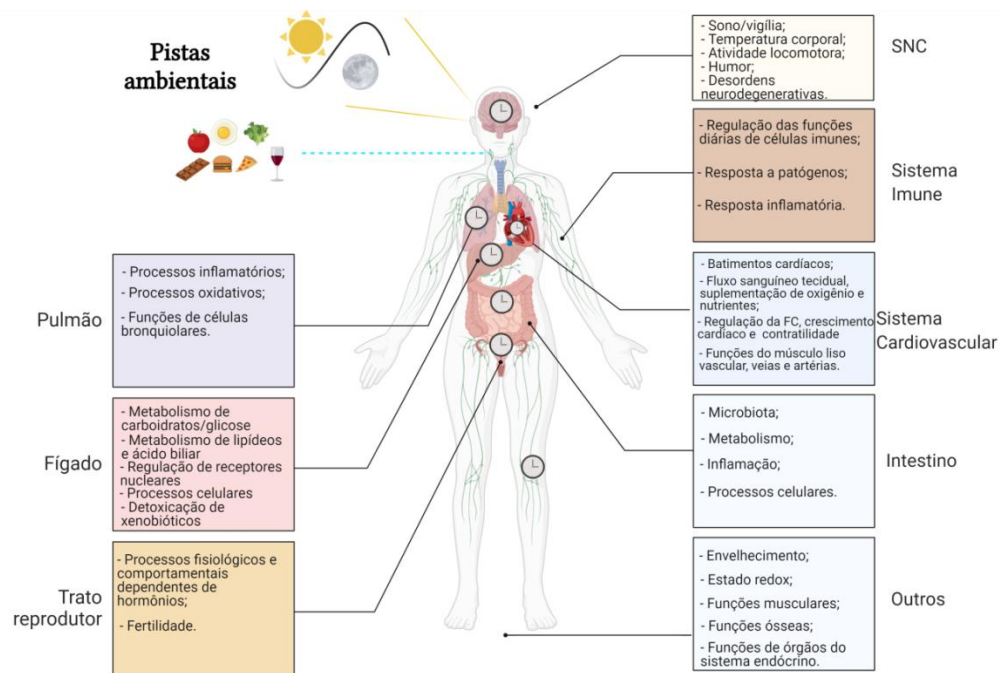
Ainda, a regulação circadiana afeta sistemas de temperatura corporal, sono-vigília, reprodução e controle do ciclo celular. Por exemplo, o nocaute de um importante gene do relógio em camundongos, *Bmal1* (também conhecido como *Arntl*), resulta em ciclos arrítmicos de sono e vigília, longevidade reduzida e metabolismo energético irregular em comparação com camundongos do tipo selvagem (PILORZ; HELFRICH-FÖRSTER; OSTER, 2018).

Nos mamíferos, os ritmos circadianos também orquestram processos metabólicos críticos para a saúde e a doença. Notavelmente, a primeira ligação genética entre relógios circadianos e metabolismo foi descoberta em camundongos portadores de uma mutação missense no gene *Clock* (*Clock-Δ19*). Esses animais apresentam ritmos comportamentais enfraquecidos e de longo período, acompanhados por uma perda da expressão rítmica dos principais genes metabólicos e proliferativos no fígado, músculo e pâncreas, resultando em uma extensa interrupção da glicose e da homeostase lipídica e obesidade (MARCHEVA *et al.*, 2010; TUREK *et al.*, 2005). Uma exclusão do gene parceiro, *Bmal1*, causa inúmeras alterações nos ritmos comportamentais e fisiológicos, como atividade locomotora arrítmica, adipogênese prejudicada, alteração no metabolismo hepático de carboidratos e patologias dos músculos esqueléticos (LAMIA; STORCH; WEITZ, 2008a; MCCARTHY *et al.*, 2007). A perda de membros negativos do TTFL (*Transcription Translation Feedback Loop*), como PER e CRY, também foi relatada como tendo consequências metabólicas. Por exemplo, as mutações em *Per2* resultam em sensibilidade alterada à insulina, hipoglicemia, obesidade induzida pela dieta e perda da ritmicidade de glicocorticóide (CARVAS *et al.*, 2012; SO *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009), enquanto um nocaute para *Cry1* e *Cry2* aumenta a expressão de genes da gliconeogênese e produção de glicose hepática (PILORZ; HELFRICH-FÖRSTER; OSTER, 2018).

O fato de quase todas as facetas da fisiologia exibirem ritmos oscilatórios rítmicos torna de grande interesse entender a função do sistema de relógio circadiano e seus processos associados. Além disso, um melhor conhecimento sobre as funções circadianas do relógio tem

implicações clínicas importantes, uma vez que a descoberta de novos alvos terapêuticos, por exemplo, poderá fortalecer a função do relógio e de ritmos fisiológicos subjacentes a circunstâncias cronodisruptivas dependentes ou não da luz.

Figura 7. Inputs do sistema de relógio circadiano (luz e alimentos) e algumas funções biológicas reguladas pelos relógios central e periféricos.



1.4 O relógio hepático

O fígado, órgão de interesse desta pesquisa, desempenha um papel fundamental no processamento diurno de nutrientes e na desintoxicação de componentes endo e xenobióticos prejudiciais. Conseqüentemente, o acúmulo e/ou atividades de muitas proteínas e enzimas regulatórias hepáticas que participam dessas atividades apresentam ritmos diários robustos. Estes incluem fatores de transcrição que regem a homeostase de lipídios e carboidratos, a desintoxicação xenobiótica e enzimas cuja expressão está sob o controle de tais fatores de transcrição e/ou cujas atividades são ajustadas pela disponibilidade de substrato (SINTUREL *et al.*, 2017).

Um exemplo fácil de visualizar, acerca do controle circadiano periférico, é o metabolismo hepático, o qual, fisiológica e bioquimicamente, sabe-se que, em jejum, o fígado fornece glicose por meio da glicogenólise e da gliconeogênese. Já a oxidação de ácidos graxos no fígado é alta no estado de jejum e baixa na alimentação. Vê-se, portanto, que o ciclo diário natural de alimentação e jejum interage com o metabolismo hepático sob controle circadiano

(MATSUMURA *et al.*, 2021). No nível molecular, o controle circadiano da função metabólica hepática é alcançado por meio de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais envolvendo uma grande variedade de genes e fatores de transcrição. Em análises globais de expressão de mRNA juntamente com a imunoprecipitação da cromatina seguido por sequenciamento profundo (ChIP-seq) estudos revelaram que os nós reguladores centrais das principais vias metabólicas do fígado estão sob controle circadiano. Subseqüentes proteômica, metabolômica e análises lipidômicas complementaram esses estudos e revelaram uma ampla influência de mecanismos pós-traducionais no metabolismo circadiano hepático (REINKE; ASHER, 2019).

1.4.1 Cross-talk entre relógio biológico e funções hepáticas

Dada a centralidade do fígado na manutenção da fisiologia do corpo inteiro, vários estudos circadianos de alto rendimento ao longo do tempo foram realizados em modelos de camundongos investigando cistroma (KOIKE *et al.*, 2012), transcriptoma (PANDA *et al.*, 2002), proteoma (ROBLES; COX; MANN, 2014) e lipidoma (AVIRAM *et al.*, 2016). As análises do transcriptoma circadiano revelaram duas grandes cristas de transcrição no fígado, correspondendo à transição entre as fases sucessivas ativas e de repouso (ASHER; SCHIBLER, 2011). Análises cistrômicas (KOIKE *et al.*, 2012) revelaram que esses dois repertórios distintos de mRNA são gerados devido à ritmicidade do oscilador dos componentes do relógio, que permite o recrutamento/remoção periódica de fatores de transcrição e co-reguladores para alterar epigeneticamente a paisagem da cromatina dos CCGs. Processos celulares como reparo de DNA, biogênese de ribossomo, autofagia, estresse do retículo endoplasmático também estão sujeitos à regulação circadiana, mas principalmente no nível pós-tradução (MUKHERJI *et al.*, 2019b; WANG, JINGKUI *et al.*, 2017). No conjunto, essas investigações revelaram um nível sem precedentes de controle do relógio circadiano na fisiologia hepática.

Um exemplo robusto da ritmicidade central e periférica em funções fisiológicas é visualizado no papel do relógio central controlando os ritmos de alimentação/jejum, enquanto os relógios periféricos, como o do fígado, atuam conduzindo os programas de expressão gênica coordenados temporalmente para manter os níveis fisiológicos de glicose no sangue, isto em conjunto com o metabolismo de outras células envolvidas nesse processo, como as células beta pancreáticas e as células musculares. Um dos primeiros estudos indicando um papel para o oscilador circadiano do fígado-relógio no metabolismo da glicose mostrou que a

deleção de *Bmal1* em hepatócitos reduziu a expressão do GLUT2 levando a uma diminuição da captação de glicose pós-absortiva em camundongos mutantes (MUKHERJI *et al.*, 2019b).

Por outro lado, em um estudo inspirador (TUREK *et al.*, 2005) demonstrou-se que camundongos mutantes para o gene *Clock* são obesos e têm níveis sanguíneos elevados de colesterol e triglicerídeos (TG). Desde então, vários estudos genéticos em modelos de camundongos estabeleceram o relógio circadiano como um regulador crítico do metabolismo lipídico (GRIMALDI *et al.*, 2010; PASCHOS *et al.*, 2012). De fato, os níveis plasmáticos de ácidos graxos livres (FFA), TG e colesterol apresentam variações diurnas e são alterados após mutações de componentes do sistema circadiano. Já foi demonstrado que a deleção específica de *Rev-Erba/β* em hepatócitos aumenta os níveis plasmáticos de FFA, TG e colesterol (CHO *et al.*, 2012; JORDAN; LAMIA, 2013). A este respeito, um estudo lipidômico revelou que TG, fosfatidil inositol e fosfatidil colina se acumulam preferencialmente no fígado de camundongo durante a fase de descanso (ADAMOVICH *et al.*, 2014). Mecanicamente, o relógio circadiano controla enzimas que estão criticamente envolvidas na regulação de várias etapas do metabolismo lipídico (MUKHERJI *et al.*, 2019b).

Notavelmente, as vias de síntese de ácido biliar, bem como processos autofágicos e imunológicos/inflamatórios, todos mostram padrões circadianos impulsionados pelo relógio biológico (MAZZOCCOLI; DE COSMO; MAZZA, 2018).

Dado que tais funções representam uma importante saída do relógio circadiano no fígado de camundongos (ZHOU, DEXI *et al.*, 2016a) e que a inervação parassimpática mediada pelo nervo vago participa da dinâmica funcional do fígado, a investigação dessa inter-relação torna-se relevante para a compreensão dos processos bioquímicos e moleculares que podem estar por trás do desenvolvimento de comorbidades/patologias hepáticas associadas ao não funcionamento do nervo vago (ou sua ausência em casos de transplante hepático) e à disrupção do ciclo circadiano.

1.4.2 Cronodisrupção e doenças hepáticas

Ritmos circadianos anormais ou desajustados têm sido associados a condições como obesidade, diabetes melitus tipo 2, doença cardiovascular, câncer e transtornos de humor (SCHWIMMER *et al.*, 2009), todos componentes da Síndrome Metabólica, o conjunto de fatores de risco e comorbidades cardiometabólicos responsável por grandes custos de saúde e problemas socioeconômicos na maioria dos países (BESSONE; RAZORI; ROMA, 2019).

As doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (NAFLDs), recentemente renomeadas como doenças hepáticas gordurosas associadas ao metabolismo (MAFLDs) para refletir

melhor a patogênese (FOUAD *et al.*, 2020), são as doenças hepáticas crônicas mais comuns, com uma prevalência mundial de 25% (VERNON; BARANOVA; YOUNOSSI, 2011; YOUNOSSI *et al.*, 2011), sendo a manifestação clínica hepática uma das principais na síndrome metabólica (BESSONE; RAZORI; ROMA, 2019; LUCI *et al.*, 2020). As MAFLDs cobrem todo o espectro da doença hepática gordurosa, desde a esteatose hepática até a esteatohepatite não alcoólica (NASH), fibrose/cirrose e câncer hepatocelular. A prevalência geral de MAFLD está crescendo em paralelo com a epidemia global de obesidade (SWINBURN *et al.*, 2011). Ganho de peso, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão são fatores de risco para a progressão da MAFLD (RAFF, 2015; SAMUEL; SHULMAN, 2018). Reciprocamente, as MAFLDs são um fator de risco para muitas doenças metabólicas, incluindo doenças cardiovasculares (8) e diabetes tipo 2 (LALLUKKA; YKI-JÄRVINEN, 2016).

Bem consolidado na literatura, o relógio circadiano está envolvido na regulação do acúmulo de triglicerídeos hepáticos, inflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, que contribuem para a patogênese da esteatohepatite não alcoólica (NASH) – forma mais avançada da MAFLD (ZHOU, DEXI *et al.*, 2016a).

Os primeiros experimentos demonstrando a importância dos genes do relógio para a homeostase metabólica envolveram camundongos com mutações no gene *Clock* (TUREK *et al.*, 2005). Camundongos homozigotos para mutações no gene *Clock* exibiram obesidade em condições de alimentação com ração padrão, hiperglicemia em jejum, lipídios elevados e esteatose hepática e maior propensão para obesidade induzida por dieta quando alimentados com dietas refinadas com alto teor de gorduras saturadas e sacarose. O fenótipo foi atribuído à hiperfagia durante os períodos normalmente associados ao sono (MCCOMMIS; BUTLER, 2021).

Os estudos mais iniciais sobre o tema foram traduzidos em várias observações na fisiologia e patologia humana. Estudos com voluntários humanos demonstraram que a dessincronização dos ritmos circadianos resulta em desregulação metabólica e risco elevado de efeitos cardiometabólicos adversos (MORRIS *et al.*, 2016; QIAN *et al.*, 2019). Por outro lado, restringir a ingestão calórica (alimentação restrita por tempo) melhora a saúde cardiometabólica em humanos (GILL; PANDA, 2015; MORO *et al.*, 2016). Ainda não foi relatado se esta abordagem beneficia a MAFLD, embora ensaios clínicos estejam em andamento. No entanto, foi relatado que a alimentação restrita por tempo previne a desregulação metabólica e um fenótipo de fígado gorduroso em camundongos C57BL/6J alimentados com uma dieta rica em gordura (MCCOMMIS; BUTLER, 2021).

A prevalência de doenças hepáticas metabólicas está aumentando dramaticamente em conjunto com as mudanças de hábito atuais, a obesidade e diabetes tipo II. A maioria das estratégias terapêuticas para essa vertiginosa modalidade de doença hepática visa diminuir a inflamação, fibrose e disponibilidade de substrato metabólico ou aumentar sua eliminação pelo fígado. Considerando o grande impacto do controle de ciclo circadiano na regulação do metabolismo hepático, é provável que os alvos moleculares de vários candidatos a drogas sejam regulados pelos genes de relógio (MUKHERJI *et al.*, 2019b).

Nessa perspectiva, entende-se que a desregulação do relógio hepático e, possivelmente, os sinais dos osciladores ativos fora do fígado (relógios periféricos de outros órgãos) podem, portanto, contribuir para a patogênese da doença hepática. Conseqüentemente, os componentes do relógio molecular agora estão sendo investigados ativamente como alvos de drogas. Estratégias de intervenção direcionadas a esses componentes poderão, portanto, ser usados no tratamento de doenças hepáticas.

Sumarizando, evidências recentes vêm considerando o desalinhamento circadiano como um fator de risco para doença metabólica, sendo assim, é válido reiterar que investigar redes de sinalização participantes da comunicação entre genes do relógio e componentes de vias hepáticas torna-se de grande importância para desvendar os mecanismos por trás do desenvolvimento de fatores de risco para doenças hepáticas e cardiovasculares, problemas de saúde pública cada vez mais frequentes, sobretudo em função do estilo de vida moderno. Nesse sentido, nosso grupo – que já trabalha com o circuito mediado pelo nervo vago em outras modalidades de estudo – iniciou uma pesquisa pioneira que busca investigar um possível papel da inervação vagal participando da regulação de componentes do relógio periférico e funções fisiológicas hepáticas, instigados pelos seguintes fatos: o nervo vago apresenta considerável inervação no órgão de estudo (fígado), faz conexões com estruturas hipotalâmicas que são inervadas pelo NSQ, também participa do circuito neuroepitelial sendo uma via integrativa que conecta diferentes órgãos do trato gastrointestinal, é eficiente na transdução de sinais e ainda, até o momento, não existem muitos trabalhos relacionando o papel do nervo vago com a sincronização circadiana de funções do fígado.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 Hipótese

Considerando as informações apresentadas, nossa hipótese é a de que o circuito colinérgico mediado pelo nervo vago regula a maquinaria do relógio biológico hepático e as funções do fígado ao longo do dia.

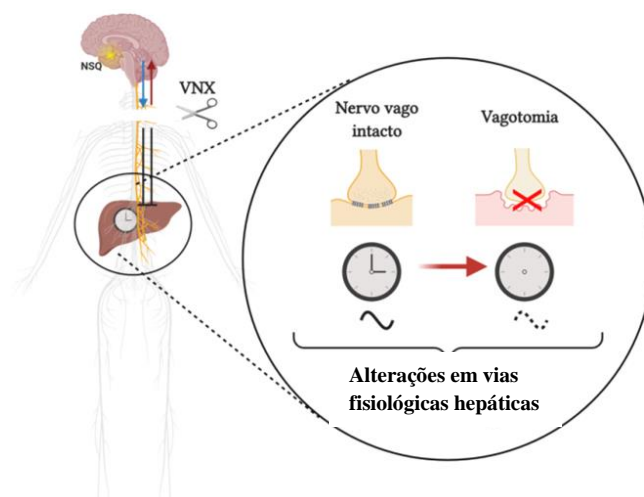
2.2 Objetivo Geral

Avaliar o impacto do circuito vagal na sincronização circadiana do relógio e de funções associadas ao fígado.

2.3 Objetivos específicos

- 2.3.1 Avaliar o papel do nervo vago na sincronização do relógio biológico periférico hepático através da análise do perfil rítmico de expressão dos principais genes envolvidos na maquinaria do relógio biológico (*Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Rev-Erba*, *Cry1* e *Rora*) ao longo do dia (ZT1, ZT6, ZT13 e ZT18).
- 2.3.2 Investigar se as possíveis alterações na expressão dos genes de relógio no fígado são dependentes ou independentes do relógio biológico central;
- 2.3.3 Investigar se as possíveis alterações na expressão dos genes de relógio no fígado são decorrentes de alterações fisiológicas nos intestinos, que constituem alvos importantes da inervação vagal;
- 2.3.4 Avaliar alterações em processos funcionais no fígado, bem como a relevância fisiológica desses processos, no contexto de possível disrupção do relógio biológico hepático.

Figura 8. Desenho esquemático da hipótese do trabalho.



3 METODOLOGIA

3.1 Animais

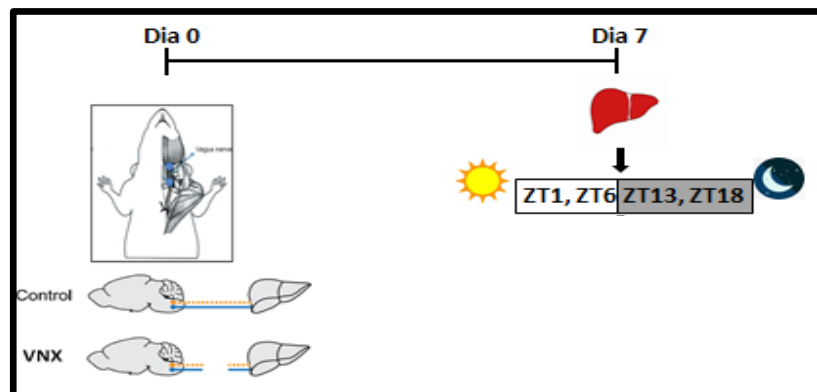
Foram utilizados camundongos selvagens da linhagem C57/Bl6 machos, com idade entre 8 e 12 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram acondicionados em biotério com livre acesso à ração e água e em condições controladas de temperatura (25° C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h/12h). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (Protocolo 311/2016).

3.2 Vagotomia unilateral cervical

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: animais do grupo controle (Sham) ou animais vagotomizados (VNX). No grupo controle foi realizada a operação simulada de vagotomia. Após devidamente anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), nos animais deste grupo, foi realizada uma incisão na região cervical ventral esquerda, isolado o nervo vago, sem ser, entretanto, seccionado. No grupo de animais vagotomizados, após anestesia, realizou-se a incisão na região cervical esquerda e, após a identificação do nervo vago esquerdo, foi realizada uma vagotomia, dividindo o nervo em um coto proximal ao corte e um coto distal ao corte. Em seguida, é feita a sutura da região operada. Os grupos de animais submetidos à vagotomia (VNX) e seu controle foram deixados em recuperação por um período de sete dias antes da realização dos testes experimentais. Após os sete dias de recuperação, o fígado dos animais foi coletado em diferentes fases do dia, que indica os *Zeitgeber* (agente do meio ambiente ou um evento que ocasiona a sincronização do relógio biológico) ZT1, ZT6, ZT13 e ZT18 correspondendo aos horários (07h, 13h, 20h, 01h), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80° C até o processamento.

Delineamento Experimental:

Figura 9. Delineamento dos experimentos usando o modelo de vagotomia cervical esquerda. Após 7 dias da vagotomia, os animais, mantidos em ciclo claro-escuro normal e alimentação *ad libitum*, são anestesiados para a coleta de fígado em diferentes fases do dia, representados pelos ZT.



3.3 RT-PCR

A quantificação dos níveis de mRNA dos genes do relógio (*Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Rev-Erba*, *Cry1* e *Rora*) foi feita por PCR em tempo real nos animais dos grupos Sham e VNX.

3.3.1 Extração de RNA

O RNA total foi isolado de 15 mg de tecido usando o Mini Kit Aurum™ Total RNA da BIO-RAD. Adicionamos 700 µL do reagente de lise para a homogeneização. Essa mistura foi centrifugada a 12000 G, por 3 minutos, à temperatura ambiente. Ao sobrenadante resultante dessa centrifugação, foram adicionados 700 µL de etanol 60%. Posteriormente, o homogeneizado lisado foi pipetado na coluna de coleta de RNA, encaixada em um tubo de coleta e esse aparato foi centrifugado à 12000 G, por 1 minuto, à temperatura ambiente. Em seguida, descartamos o sobrenadante, adicionamos 700 µL de solução adstringente de lavagem *low* na coluna de coleta de RNA e centrifugamos à 12000 G, por 1 minuto, à temperatura ambiente. Descartamos o sobrenadante, adicionamos 80 µL da solução de DNase no centro da coluna de coleta recolhido e incubamos esse sistema por 25 min, à temperatura ambiente. Depois, adicionamos 700 µL de solução adstringente de lavagem *high* à coluna e centrifugamos à 12000 G, por 1 minuto, à temperatura ambiente. Novamente, descartamos o sobrenadante, adicionamos 700 µL de solução adstringente de lavagem *low* e centrifugamos nas mesmas condições mencionadas acima. Descartamos o sobrenadante e repetimos a centrifugação, porém por um tempo de 2 minutos. Finalmente, transferimos a coluna de coleta

de RNA para um tubo de microcentrifugação, pipetamos 60 µL da solução de eluição e após incubar o sistema por 2 minutos, centrifugamos à 12000 G, por 2 minutos, à temperatura ambiente, permitindo a eluição completa do RNA retido na coluna de coleta. A quantificação do RNA foi feita em NanoDrop (NanoVue Plus).

3.3.2 Confecção do cDNA

Utilizamos um volume da amostra suficiente para 2000 ng de RNA. Adicionamos 4 µL do 5x iScript Reaction Mix (iScript cDNA Synthesis Kit/Bio-Rad), 1 µL da iScript Transcriptase Reversa e completamos a solução com água ultrapura (nuclease free) para um volume final de 20 µL. Em seguida, a solução foi incubada em termociclador usando o seguinte protocolo: *Priming* (5 min a 25 °C); *Reverse transcription* (20 min a 4 °C); *RT inactivation* (1 min a 95 °C); *Optional step* (4 °C).

3.3.3 PCR em tempo real

O cDNA obtido foi diluído (1:5) e, em seguida, quantificado por RT-PCR quantitativo. SYBR Green iTaq™ *Supermix* (BIO-RAD) foi usado para quantificar a expressão dos genes de interesse de acordo com as instruções do fabricante. Adiciona-se à 2 µL do cDNA, 5 µL do SYBR Mix, 1 µL do primer *forward* (500 nM), 1 µL do primer *reverse* (500 nM) e 1 µL da água ultrapura, com o volume final de 10 µL. Essa reação foi levada ao termociclador Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems.

Os primers utilizados para quantificar a expressão de genes do relógio e genes metabólicos estão descritos na **tabela 1 (Anexo)**. O gene *S26*, cuja expressão é constante em todas as fases do dia, foi utilizado na normalização dos resultados de cada amostra. Os resultados foram expressos usando o método $2^{-\Delta\Delta ct}$.

3.4 Ensaio de Telemetria

Para avaliar se a vagotomia altera o funcionamento do relógio biológico central, nós analisamos dois parâmetros fisiológicos controlados pelo mesmo: temperatura corporal (Tc) e atividade locomotora. Para isso, animais VNX e seu controle – após 7 dias de recuperação da cirurgia de vagotomia ou sua simulação – passaram por uma segunda cirurgia de inserção de um sensor de telemetria necessário para o monitoramento da Tc e atividade locomotora. Esse procedimento consiste na realização de laparotomia, seguida pela separação dos músculos da cavidade abdominal. Em seguida, a cápsula do sensor foi suturada à porção ventral da cavidade abdominal e o abdome fechado por sutura em camadas (músculo e pele). A Tc e

atividade locomotora foram monitoradas telemetricamente através do sinal emitido pelo sensor implantado na cavidade abdominal e recebido pelo receptor de sinal sob as cubas experimentais ligados a um software de aquisição. Os dados foram adquiridos em modo contínuo e posteriormente processados. Os registros da telemetria foram feitos por 14 dias.

3.5 Protocolo cintilográfico – Determinação da absorção intestinal ao longo do dia

Para avaliar se o nervo vago ajusta o relógio biológico hepático por meio da regulação da absorção intestinal, animais Sham ou VNX foram submetidos ao teste de absorção intestinal, realizado ao longo do dia (ZT1, ZT6, ZT13, ZT18). Todos os animais receberam por gavagem 100µL de solução contendo fármaco ácido dietilenoaminopentacético (DTPA) marcado com 18,5 MBq ^{99m}Tecnécio. Quatro horas após a gavagem, os animais foram anestesiados (i.p) com solução de cloridrato de xilazina (15 mg/kg) e cloridrato de cetamina (80 mg/kg) e tiveram o sangue coletado pelo plexo axilar. O sangue foi submetido à determinação da radiação por meio de um contador de radiação gama (Wallac Wizard Gamma counter, PerkinElmer, Waltham, USA). Os resultados obtidos foram comparados com o padrão de ^{99m}Tc-DTPA e calculados em percentual de dose de ^{99m}Tc-DTPA por grama de sangue, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ dose de } ^{99m}\text{Tc-DTPA no sangue} = \frac{\text{cpm no sangue}}{\text{cpm da dose administrada}} \times 100$$

Marcação do DTPA com ^{99m}Tecnécio (^{99m}Tc): O ^{99m}Tc foi obtido de um gerador de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc (IPEN, São Paulo, Brasil). O DTPA foi adquirido do Laboratório de Farmácia Nuclear da Faculdade de Farmácia da UFMG, em colaboração com o Prof. Dr. Valbert Cardoso. Todos os outros reagentes foram de grau analítico. Um frasco contendo 1,25 mg de DTPA e 0,085 mg de SnCl₂.2H₂O foi marcado com Na^{99m}TcO₄ de acordo com as instruções do fabricante. A pureza radioquímica foi determinada por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se sílica gel 60 como suporte, acetona e NaCl 0,9% (p/v) como solventes (SAHA, 2004).

3.6 Determinação do trânsito intestinal

Para avaliar se uma maior ou menor permanência de alimento no trato gastrointestinal poderia ser uma causa responsável por impactar o circuito neuroepitelial alterando a condução da informação do alimento via nervo vago, nós performamos o ensaio de motilidade

intestinal. Animais do grupo VNX (n = 5) ou seu controle (n = 5) receberam, por gavagem, 300 μ L da solução de carvão ativado no horário do ZT6. Foi utilizada goma arábica para diluir o carvão ativado em uma proporção de 10% carvão ativado:5% de goma arábica. Após 20 minutos da gavagem, os animais foram eutanasiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15kg/mg), foi feita uma laparotomia e retirado todo o intestino delgado, desde o piloro até o início do ceco. Com o auxílio de uma fita métrica, medimos a distância percorrida pelo carvão e dividimos do valor do comprimento total do intestino. O resultado foi expresso em porcentagem do comprimento total do intestino delgado. A atividade sobre o trânsito intestinal foi determinada segundo (JANSSEN; JAGENEAU, 1957; WONG; WAI, 1981).

3.7 Proteômica

Para obtermos uma visão geral das proteínas expressas no nosso fenótipo, nós performamos o ensaio de proteômica, que também serviu como âncora para entendermos possíveis alterações fisiológicas subsequentes no nosso modelo. Neste experimento, após os sete dias de recuperação da vagotomia, coletamos o fígado de animais Sham ou VNX no tempo específico que marca o ZT6. O tecido coletado foi lavado com salina fisiológica, congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado no freezer -80° C.

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

Os peptídeos e fosfopeptídeos obtidos foram enviados para *University of Sourthen Denmark*, onde as etapas de fracionamento e análise LC-MS/MS foram realizadas em colaboração com o Dr. Frank Kjeldsen.

3.7.1 Preparação de amostras

A preparação das amostras de foram realizadas como descrito anteriormente (ZHOU, JIAN-YING *et al.*, 2012), com pequenas modificações. Resumidamente, o tecido foi macerado utilizando-se nitrogênio líquido e um cadinho de porcelana. Cerca de 6 miligramas (mg) de amostra foi ressuspensa em 100 μ L do tampão de lise contendo Ureia 6M, Tiouréia 2M, 2-clorocetamida 40 mM, TEAB 20 mM, TCEP 0,5 M e inibidores de protease e fosfatase. O tecido foi sonificado, em banho de gelo, na frequência 40 hertz (Hz), durante 15 segundos, por 3 vezes. Em seguida, as amostras foram incubadas em um Thermomix (Eppendorf), a 28°C, por 2h, para a completa redução das pontes dissulfeto e alquilação dos

grupos tiois (-SH) das cisteínas. As amostras foram quantificadas utilizando o Qubit (Thermo).

Após a quantificação, 200 microgramas (μg) de proteínas foram digeridas enzimaticamente. Para isso, as amostras foram diluídas 10 vezes em uma solução de TEAB 50 mM, em pH 8. Em seguida, foi adicionado tripsina (Promega) na proporção de 1:50 (enzima(μg):proteína (μg)) em cada amostra e as amostras foram incubadas em um thermomix (Eppendorf) a 29°C sob agitação de 650 rpm constante por 16h. Para o encerramento da reação, as amostras foram acidificadas adicionando ácido fórmico para concentração final 5%. Posteriormente, os tubos com os peptídeos foram centrifugados a 14000 rpm, por 5 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi coletado. Para avaliação da eficiência da digestão, os peptídeos foram dessalinizados utilizando 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 μL de 20% acetonitrila + 20% TFA, 100 μL de 50% aceto nitrila e 200 μL de 70% acetonitrila + 0,5% TFA. Posteriormente, as proteínas eluídas foram colocadas na centrífuga à vácuo até secarem e ressuspendidas em 15 μL de 0,1% TFA para acidificá-las. Em seguida, as amostras foram cristalizadas utilizando a proporção 1:1 (matriz alfa-ciano:peptídeo) e analisadas utilizando o modo linear na faixa de m/z de 5000 a 25000 Da e no modo refletido na faixa de 780-2500 Da no MALDI-TOF (Autoflex III, Bruker) do Laboratório Multiusuário de Proteômica (LMProt)-UFMG.

3.7.2 *Marcação isotópica*

Os peptídeos foram marcados de acordo com protocolo de marcação com dimetil “On-column” (Boersema et al., 2009), com pequenas modificações. Resumidamente, os peptídeos foram reconstituídos em 1 mL de ácido fórmico (CH_2O_2) 5% (v/v). As colunas SepPak (Waters) foram: (i) ativadas com 4 mL de acetonitrila (ACN) 100%; (ii) condicionadas com 4 mL da solução A (ácido acético 0,6% (v/v)); (iii) carregadas com as amostras; (iv) lavadas com 4 mL da solução A; (v) marcadas com o respectivo reagente de marcação por 30 minutos. Os grupos Sham e VNX (ZT6) foram marcados com reagentes de marcação distintas (Sham = leve e VNX = média). Os reagentes de marcação isotópica continham 500 μL de tampão sódio-fosfato 50 mM (pH 7,5), 250 μL de cianoborohidreto de sódio (NaBH_3CN) 0,6 M e 250 μL de uma solução 4% (v/v) contendo o seu respectivo formaldeído: CH_2O (leve) ou CD_2O (médio); (vi) lavadas com 4 mL da solução A; (vii) eluídas com um gradiente de concentração (ACN 20%, 50%, 80% e 100% (v/v) + ácido acético 0,6% (v/v)). As amostras

foram secas no speedvac e reconstituídas em TFA 0,1% (v/v). As amostras foram ressuspendidas e quantificadas utilizando o Qubit. A eficiência de marcação foi checada utilizando o espectrômetro de massa MALDI-TOF (Autoflex III, Bruker) com a faixa de m/z de 780-2500 Da. Em seguida, as amostras dos grupos leve e médio foram combinadas em um mesmo tubo com a mesma proporção de peptídeos marcados 1:1 (Sham:VNX) (também checado por análise no MALDI-TOF). Por fim, as amostras foram secas utilizando um speedvac e armazenadas em -20°C.

3.7.3 *Enriquecimento dos fosfopeptídeos usando a cromatografia TiO₂*

Em cada um dos tubos foram adicionados 600 µL de *Loading Buffer* (80% acetonitrila, 5% TFA e 1M ácido glicólico) para diluir a solução 10 vezes. Em seguida foram adicionados TiO₂ na proporção de 6:1 (amostra (µg): TiO₂ (µg)) em cada uma das replicatas, as quais foram colocadas no agitador por 30 minutos. Posteriormente, centrifugamos os tubos por 15 segundos e recolhemos o sobrenadante em novos tubos. O conteúdo do sobrenadante foi incubado novamente com TiO₂ na proporção de 3:1 (amostra (µg): TiO₂ (µg)) e colocado no agitador por 30 minutos. Posteriormente, centrifugamos os tubos por 15 segundos e recolhemos o sobrenadante em novos tubos denominados FT (flow through). As amostras FT foram colocadas na centrífuga à vácuo para secarem e foram ressuspendidas em 100 µL de 0,1% de ácido fórmico. Posteriormente, as amostras foram dessalinizadas com ácido fórmico usando coluna de cromatografia com poros R2 e R3. Os peptídeos resultantes dessa eluição foram utilizados para a análise de proteômica total.

Para a preparação dos fosfopeptídeos, as *beads* de TiO₂ foram lavadas com 100 µL de *Loadig Buffer*. Em seguida os tubos foram vortexados por 15 segundos e a solução foi transferida para outro tubo. Então os tubos foram centrifugados para as *beads* ficarem no *pellet*. Posteriormente foi adicionado 100 µL da solução de lavagem 1 (80% acetonitrila, 1% TFA) e os tubos foram vortexados por 15 segundos e centrifugados rapidamente para as *beads* ficarem no *pellet*. Em seguida, repetimos esse procedimento, porém utilizamos a solução de lavagem 2 (10% acetonitrila, 0,1 % TFA) e guardamos o sobrenadante, o qual pode conter glicopeptídeos. Em seguida as *beads* foram colocadas na centrífuga à vácuo para secarem, por aproximadamente 10 minutos. Finalmente, adicionamos 100 µL da solução de eluição (60 µL de solução de amônia (28%) em 940 µL de H₂O pH 11,3) para eluir os fosfopeptídeos. Os tubos foram passados no vortex e deixamos a solução de eluição e as *beads* reagirem por 10 minutos para uma eluição eficiente. Em seguida, foi adicionado ácido fórmico 100% para acidificar as amostras (1 µL de ácido fórmico para cada 10 µL de solução de eluição). Por

ultimo, foi feita a dessalinização. Os fosfopeptídeos resultante dessa eluição foram utilizados para a análise de fosfoproteômica.

3.7.4 *Análise de dados e bioinformática*

Os dados dos espectros de massa (arquivos.raw) foram pesquisados no arquivo UniProtKB *Mus musculus* fasta usando o software MaxQuant (versão 1.6.1.0) e o mecanismo de pesquisa Andromeda (ferramenta implementada no MaxQuant). Foram incluídos nos parâmetros de busca uma lista de “contaminantes comuns”, tolerância de 20 ppm na primeira busca de peptídeos e a busca principal com uma tolerância de 4,5 ppm. A marcação com dimetil foi configurada ativando as modificações "Dimetil-Lys0" e “Dimetil-Nterm0”, para a marcação leve, e “Dimetil-Lys4” e “Dimetil-Nterm4”, para a marcação pesada. A tripsina foi escolhida como enzima, permitindo um máximo de 2 clivagens perdidas. A modificação carbamidometil (Cys) foi escolhida como modificação fixa e a oxidação (Met) e acetilação (N-terminal) foram ajustadas como modificações variáveis. Nas amostras de fosfoproteoma, a modificação “phospho(STY)” foi habilitada. A opção “Match between runs” foi ativada com uma faixa de tempo de 0,7 min e alinhamento na faixa de 20 min. Para a identificação dos peptídeos, o mínimo de 1 peptídeo único foi usado. O FDR (“false discovery rate”) foi ajustado como <1% e um banco de dados “decoy” reverso foi usado para determinar o FDR.

O programa Perseus foi usado para fazer a transformação para valores de log₂ para abundâncias das proteínas, e para normalizar os valores de log₂ pelo valor da mediana de sua própria coluna, e pela média dos valores de quantificação das replicatas que foram analisadas simultaneamente no MS (sham + vnx + média [sham+vnx]).

Valores normalizados foram utilizados para realizar análise hierárquica de cluster e análise de componentes principais (plot PCA) usando Perseus. A análise estatística foi feita usando ANOVA unidirecional ($p < 0,05$) usando o programa “DanteR” (interface gráfica que utiliza o pacote “DanteR” no ambiente R). Em seguida, as proteínas diferencialmente expressas foram submetidas a uma análise de enriquecimento de vias utilizando o banco de dados Kegg pathways. Para isso, foi utilizado o pacote “clusterprofiler” do R, sendo que a via foi considerada enriquecida quando $P_{adj} < 0,05$. Em seguida, realizamos a rede de interação entre as proteínas em cada via enriquecida utilizando o aplicativo String do software Cytoscape. A contextualização dessas redes proteicas em suas vias metabólicas foi realizada no software CellDesigner. Todos os gráficos e heatmaps da análise proteômica foram feitos no R.

3.8 Ensaios bioquímicos e histologia hepática

Performamos testes bioquímicos e histologia hepática nos grupos experimentais VNX ou seu controle, com o intuito de validar a relevância fisiológica dos achados encontrados no ensaio de proteômica.

Glicose sérica: nível de glicose sérica foi dosado ao longo do dia (ZT1, ZT6, ZT13 e ZT18) em animais controle ou VNX utilizando o kit comercial de monitorização de glicemia ACCU-CHEK (Roche Diabetes Care). Também foi feita dosagem de glicose sérica, de animais VNX ou seu controle apenas no ZT6, através do método de dosagem ELISA, usando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Kit PAP Liquiform Labtest).

Colesterol Total: O colesterol total foi dosado no plasma dos animais apenas no ZT6, através do método de ELISA, usando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Kit Labtest).

Triglicerídeos sérico: O nível de triglicerídeos sérico foi mensurado também pelo método de ELISA, conforme instruções do fabricante (Kit Doles).

Histologia do fígado: Foi realizada histologia do fígado de animais VNX e seu controle para avaliar/quantificar o nível de glicogênio hepático. Os animais foram anestesiados e em seguida o fígado foi coletado no ZT6, lavados em salina, congelados em nitrogênio líquido e armazenados no -80°C até o processamento. Os fígados foram fixados por 24h com formol tamponado a 10% para posterior processamento histológico. Após este período, os fígados foram acondicionados em álcool 70% até o início do processamento. Em seguida, as amostras foram submetidas à desidratação realizada em concentrações crescentes de álcool (50%, 70%, 80%, 90% e absoluto I, II e III) permanecendo por 60 minutos em cada solução e *overnight* no álcool absoluto III. Posteriormente, foi realizada a diafanização em que os tecidos foram banhados em xilol (I, II, III) durante 1 hora. Os tecidos foram impregnados com parafina I, II, III durante 30 min., 45 min e 60 min, respectivamente, e incluídos na mesma. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo semi-automático, com cortes semi-seriados de 5 μm de espessura. Os cortes histopatológicos foram dispostos em lâminas de vidro lapidadas e encaminhadas à estufas ($60^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$) para adesão dos cortes às lâminas. Foi realizada a coloração histológica com PAS com solução corante de Reagente de Schiff. Sessões do fígado foram fotografadas usando câmera digital acoplada a um microscópio (200x). As imagens do fígado foram utilizadas para análise qualitativa de glicogênio hepático, analisando regiões próximas a veias pericentrais e utilizando o software ImageJ.

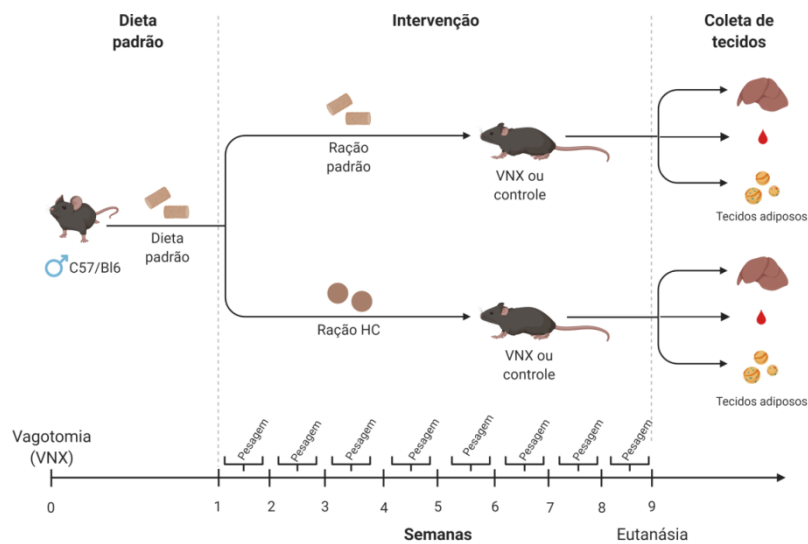
3.9 Desafio com dieta rica em carboidratos refinados (HC)

Para analisar a evolução temporal das alterações metabólicas induzidas pela dieta rica em carboidrato refinado (HC) em animais vagotomizados e seu controle, os camundongos foram alimentados com ração laboratorial padrão (LABINA) ou dieta experimental pelo período de 8 semanas após a vagotomia.

Este experimento foi feito em colaboração com o grupo de Imunometabolismo da Universidade Federal de Minas Gerais, em parceria com a profa. Dra. Adaliene Versiani M. Ferreira e sua aluna de doutorado Amanda Carla C. de Oliveira. A dieta HC, obtida pela parceria, era composta de 45% de leite condensado, 10% açúcar refinado e ração 45%. A composição de macronutrientes da dieta alimentar HC (4,4 kcal/g) era de 74,2% de carboidratos, 5,8% de gordura e 20% de proteína. É importante notar que a dieta HC contém pelo menos 30% de açúcares refinados, principalmente sacarose.

Os camundongos foram alojados coletivamente (4 animais/caixa), divididos em grupos VNX e seu controle (dieta padrão *versus* dieta HC), sendo um total de 8 animais em cada grupo e o esquema de pesagem dos animais era feito uma vez por semana, durante 8 semanas. A ingestão de alimentos foi medida duas vezes por semana, durante 8 semanas. No final do tratamento com a dieta, os animais foram anestesiados com cetamina (130 mg / kg) e xilazina (0,3 mg / kg) e eutanasiados. Antes da eutanásia, foram coletadas amostras de sangue, fígado, tecido adiposo branco epididimal (TAE), retroperitoneal (TAR), mesentérico (TAM) e marrom (TAB), conforme o esquema abaixo (Figura 10). As amostras de fígado e tecidos adiposos foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenados no -80° C até o processamento. O sangue foi centrifugado para a coleta do soro, que foi armazenado no freezer -20° C até o processamento.

Figura 10. Acompanhamento dos animais Sham e VNX, ao longo de 8 semanas, alimentados com dieta padrão e dieta rica em carboidratos (HC). Ao final, os animais foram anestesiados para coleta de órgãos como fígado, sangue e tecidos adiposos e, em seguida, eutanasiados.



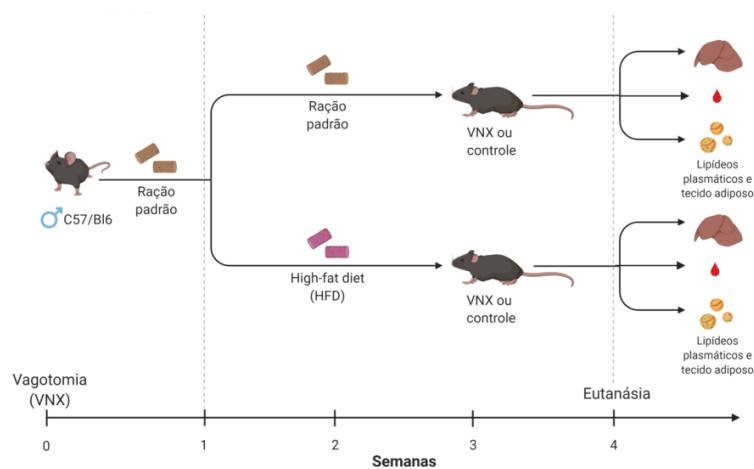
3.10 Desafio com dieta rica em gordura (HFD)

Para analisar a evolução temporal das alterações metabólicas induzidas pela dieta HFD (ração 60% lipídica) em animais vagotomizados e seu controle, os camundongos foram alimentados com ração laboratorial padrão (LABINA) ou ração hiperlipídica pelo período de 4 semanas após a vagotomia.

A ração hiperlipídica utilizada foi proveniente do Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABIN) da UFMG e o experimento foi feito em colaboração com a professora Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite e sua aluna de doutorado Núbia Nunes. A ração é preparada pelo próprio laboratório e tem em sua composição 60% de lipídeos, sendo constituída por: BHT (0,014 g), bitartarato de colina (2,50 gramas), cistina (metionina) (3 g), mix de vitaminas AIN-93M (10 g), óleo de soja (20 g), Mix de minerais AIN-93M (35 g), celulose (50 g), amido de milho (62 g), caseína (200 g), groselha Celli® (310 g) e banha de porco (355 g). Para o preparo de 1000 gramas de ração hiperlipídica, inicialmente misturam-se os ingredientes sólidos em um recipiente (exceto o Mix de vitaminas e a banha) em ordem crescente; em seguida, acrescenta-se a essa mistura o Mix de vitaminas. O próximo passo consiste em acrescentar o óleo de soja homogeneizando-o com a groselha; depois, é acrescentada a banha de porco misturando bem para evitar a formação de grumos; e, por último, a dieta é armazenada em pote limpo e identificado e guardada no freezer -20°C .

Os animais foram divididos em grupos VNX e seu controle (dieta padrão *versus* dieta HFD), contendo 6 animais por grupos. Os animais foram pesados antes do início da dieta e ao final da dieta, antes da eutanásia. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados com cetamina (130 mg / kg) e xilazina (0,3 mg / kg) e eutanasiados. Antes da eutanásia, foram coletadas amostras de sangue, fígado e tecido adiposo, conforme o esquema abaixo:

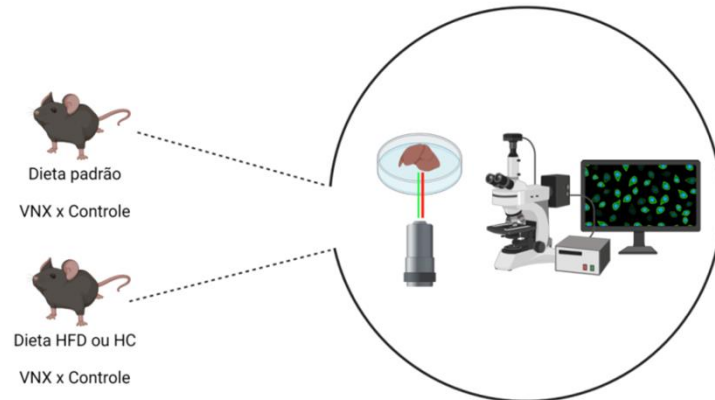
Figura 11. Acompanhamento dos animais Sham e VNX , ao longo de 4 semanas, alimentados com dieta padrão e dieta rica em gordura (HFD). Ao final, os animais foram anestesiados para coleta de órgãos como fígado, sangue e tecidos adiposos e, em seguida, eutanasiados.



3.11 Microscopia confocal intravital

As imagens de microscopia confocal intravital foram realizadas conforme descrito (MARQUES *et al.*, 2015). Em resumo, os camundongos dos grupos Sham e VNX foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), no horário do ZT6. Foi realizada uma laparotomia para expor o fígado e, em seguida, foi coletado o lobo esquerdo e colocado em uma placa de petri contendo salina. Para visualizar as gotículas lipídicas *in vivo*, o corante Bodipy (1,5 µg/camundongo diluído em metanol) foi colocado diretamente no lobo esquerdo do fígado coletado após a cirurgia. As imagens foram obtidas usando microscópio Nikon Eclipse Ti acoplado a cabeça confocal A1R equipado com quatro lasers (excitação em quatro comprimentos de onda: 405, 488, 546 e 647 nm) e filtros de emissão em 450/50, 515/30, 584/50 e 663 / 738 nm. Objetiva 20x Plan Apo. A quantificação digital foi feita utilizando os softwares Volocity (6.3) (Perkin Elmer, Waltham, MA) e NIS-Elements (Nikon Instruments Inc., EUA). A análise das imagens foi feita utilizando o software ImageJ (Figura 12).

Figura 12. Desenho experimental dos grupos VNX e seu controle para o experimento que avalia gordura hepática através do marcador de lipídeos bodipy, fazendo uso da técnica de microscopia intravital.



3.12 Análises estatísticas

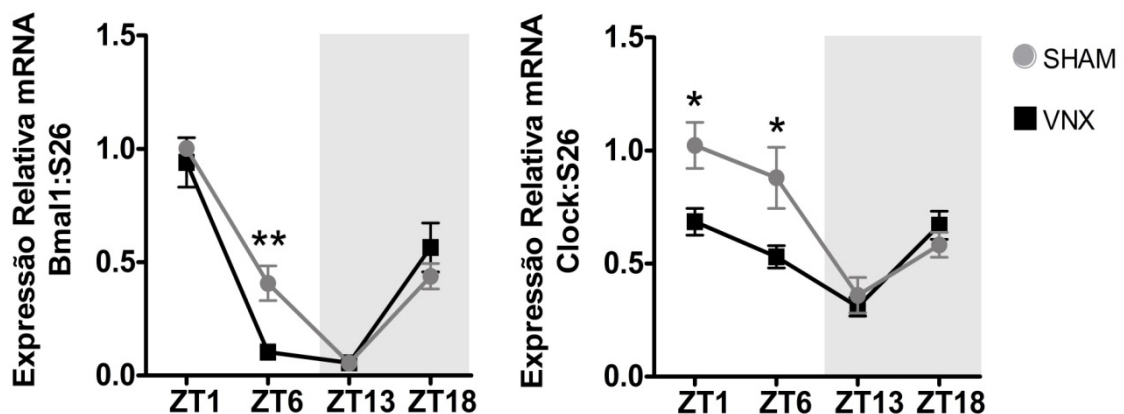
Os resultados são apresentados como os valores médios e mais ou menos o erro padrão da média dos grupos com pelo menos cinco animais para cada condição e considerados estatisticamente significantes quando comparações entre grupos, utilizando o teste t de Student, com valores de P menores que 0,05. Análise estatística do ensaio de proteômica encontra-se descrita no subtópico 3.7.4. Foi utilizado o teste Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni para análise do acompanhamento de peso e consumo alimentar dos animais Sham e VNX, em dieta padrão e HC.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da expressão circadiana de genes de relógio no fígado em condições fisiológicas e estudo de possíveis variações circadianas dos componentes do relógio hepático moduladas pelo circuito neural colinérgico.

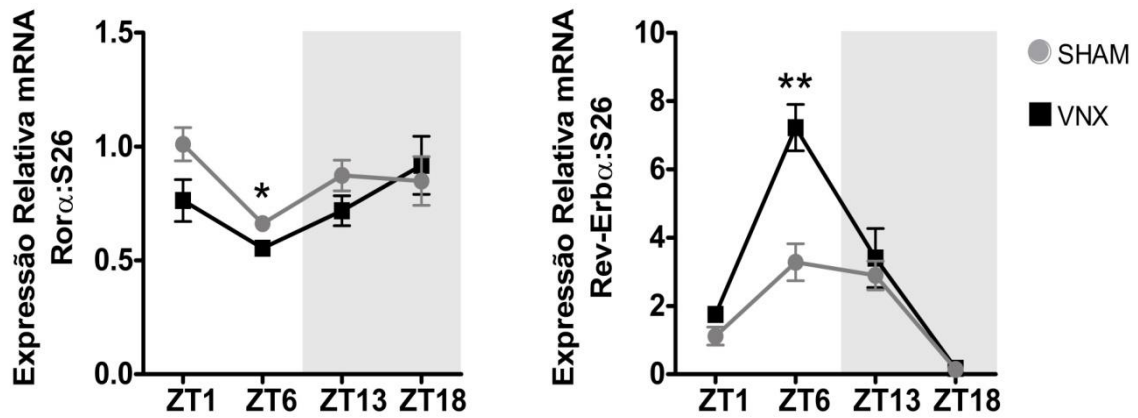
Nós realizamos ensaio de RT-PCR para avaliar o nível de expressão dos principais genes que compõem a maquinaria do relógio biológico das células hepáticas ao longo do dia e se o nervo vago participa da variação circadiana da expressão desses genes. Os genes *Bmal1* e *Clock* (Figura 13), que formam um heterodímero e regulam positivamente a transcrição dos demais genes do relógio, são expressos ritmicamente ao longo do dia, no entanto, ocorre uma diminuição significativa na expressão do mRNA do *Bmal1* ($p < 0,01$) e do *Clock* ($p < 0,05$) no ZT6 nos animais vagotomizados, quando comparados aos animais controle.

Figura 13. Expressão do mRNA dos genes do relógio *Bmal1* e *Clock* dosados em amostra de fígado de animais sham (n=6) e vagotomizados (n=5). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.



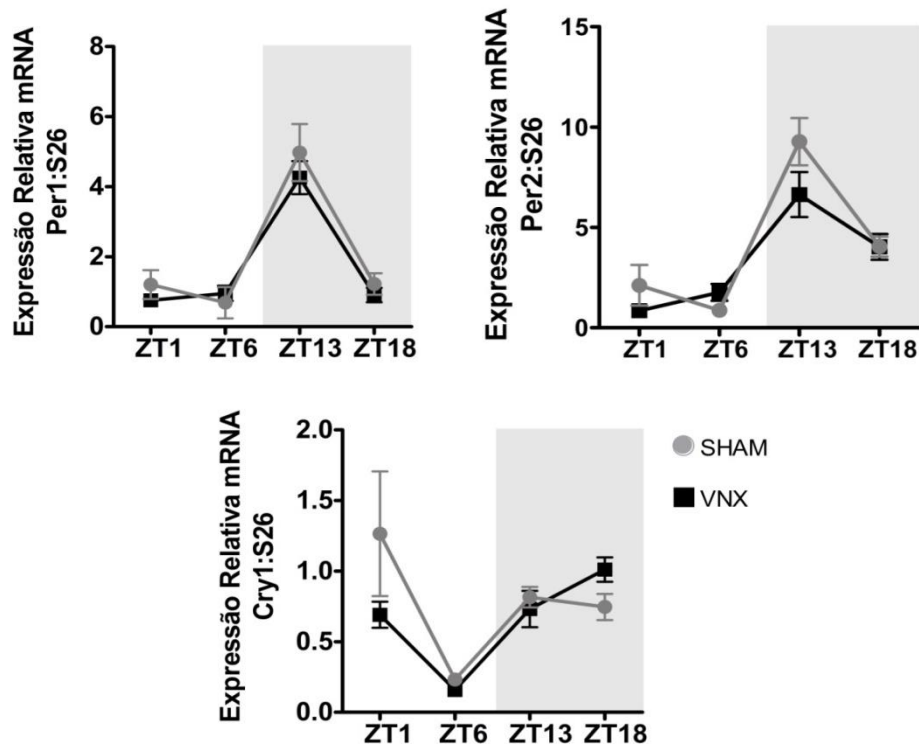
Os genes *Rora* e *Rev-Erba*, por sua vez, que são genes que regulam positiva e negativamente a transcrição do gene *Bmal1*, respectivamente, também apresentaram ritmicidade em sua expressão ao longo do dia e essa expressão ocorre em anti-fase. Na ausência do nervo vago, no entanto, a expressão desses genes é alterada, ocorrendo diminuição significativa do mRNA do gene *Rora* ($p < 0,05$) e aumento na expressão do mRNA do gene *Rev-Erba* ($p < 0,01$), ambos no ZT6 (Figura 14).

Figura 14. Expressão do mRNA dos genes do relógio *Rora* e *Rev-Erba* dosados em amostra de fígado de animais sham (n=6) e vagotomizados (n=5). *p<0,05 e **p<0,01.



Os genes *Per1/2* e *Cry1/2* funcionam como supressores do complexo ativador do relógio Bmal1/Clock quando formam um heterodímero. A expressão do mRNA dos genes *Per1*, *Per2* e *Cry1*, assim como os demais genes, apresentou ritmicidade circadiana no fígado, no entanto, não houve alteração na expressão dos genes na ausência do nervo vago, como demonstrado na figura 15.

Figura 15. Expressão do mRNA dos genes do relógio *Per1*, *Per2* e *Cry1* dosados em amostra de fígado de animais sham (n=6) e vagotomizados (n=5).

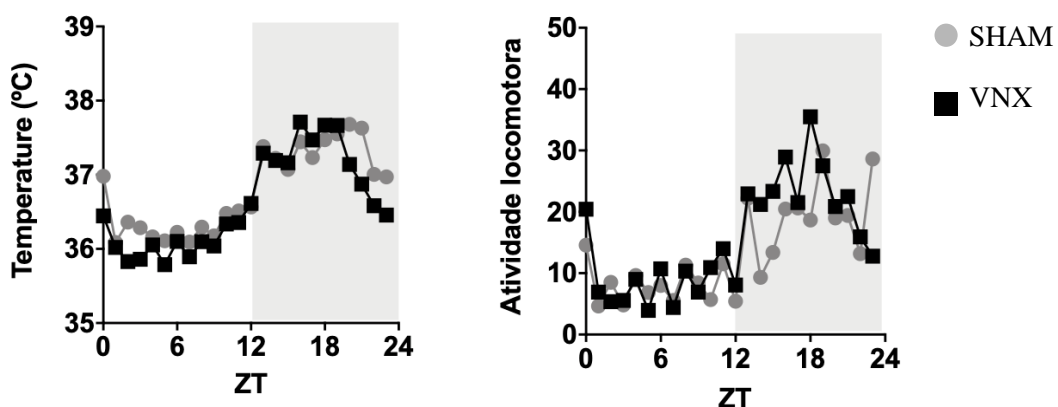


4.2 A alteração circadiana hepática causada pela vagotomia possivelmente é independente do relógio biológico central e pode equalizar fatores originados no próprio trato gastrointestinal

Com base nos dados preliminares apresentados – em que a vagotomia alterou a expressão de genes do relógio no fígado, quando comparado ao grupo controle, sendo as alterações mais pronunciadas no tempo específico do dia (ZT6) – nós nos questionamos qual seria a origem do sinal sincronizador do relógio hepático que está relacionado ao circuito vagal.

Como bem descrito na literatura, o relógio biológico é organizado de forma hierárquica com o NSQ atuando como o relógio central. Nós avaliamos se, neste modelo, o nervo vago participa do funcionamento do relógio central, assim como participa do ajuste do relógio periférico como descrito nos resultados anteriores, analisando temporalmente parâmetros fisiológicos controlados pelo relógio central, como Tc e atividade locomotora. Como demonstrado na figura 16, tanto para a temperatura como para a atividade locomotora, ocorre um aumento em ambos os parâmetros na fase escura do ciclo circadiano, fase que marca o momento em que os animais estão mais ativos. Ademais, o resultado obtido nos mostra que não há diferença nas medidas de Tc e atividade locomotora dos animais vagotomizados comparados ao controle.

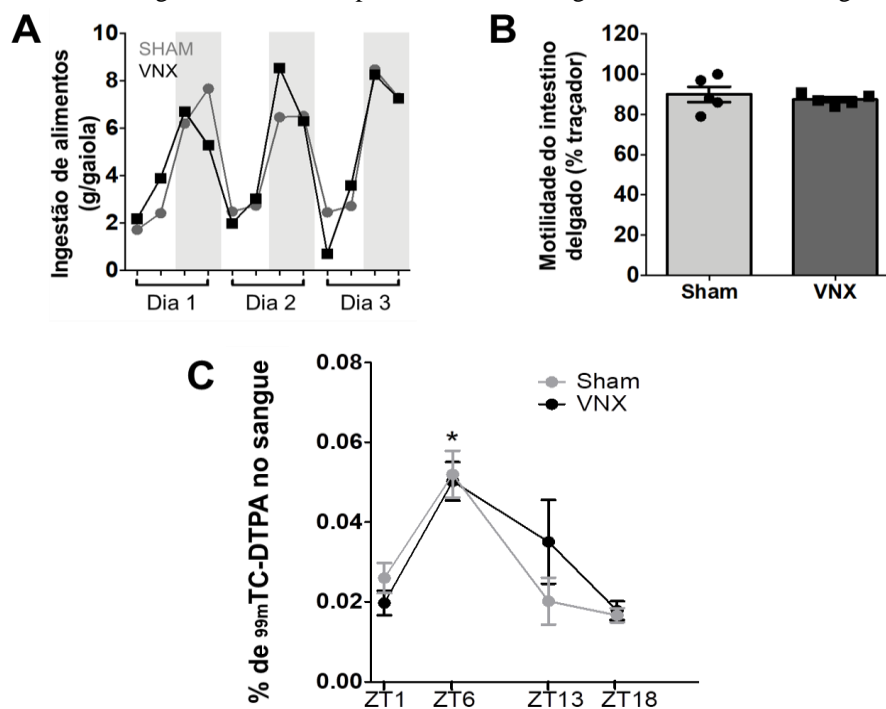
Figura 16: Medida telemétrica da Tc e atividade locomotora de animais Sham (n=6) ou submetidos à vagotomia (n=5), durante 14 dias.



Outra importante questão refere-se ao fato de que a alimentação vem sendo considerada uma importante pista ambiental capaz de modular o relógio biológico periférico (ASHER; SASSONE-CORSI, 2015b). Pensando nessa hipótese, avaliamos se a alteração nos genes do relógio hepático, provocada pela vagotomia, pode ser consequência da ingestão

alimentar, do trânsito intestinal ou da absorção intestinal. Como resultado, obtivemos que as alterações no relógio não foram paralelas a mudanças na ingestão alimentar, pois não houve diferença na quantidade de alimento ingerido entre os animais Sham e VNX (figura 17 A). Ainda, avaliamos o trânsito intestinal dos animais Sham e VNX para investigar se a vagotomia estaria causando alteração na motilidade intestinal modificando o tempo de permanência do alimento no intestino e, como consequência, repercutindo no funcionamento do circuito neural. Entretanto, como demonstrado na figura 17B, não houve diferença entre a motilidade intestinal dos animais vagotomizados e seu controle. Seguindo a linha de raciocínio, sabendo-se que o fígado recebe os nutrientes ingeridos via sistema porta, realizamos um ensaio que mede a absorção de nutrientes intestinal ao longo do dia. Nosso resultado mostrou que também não há alteração na absorção intestinal nos animais submetidos à vagotomia quando comparados ao controle, entretanto, observamos que o ZT6 é o momento em que a absorção é mais proeminente em relação aos outros horários do dia ($p < 0,05$), como demonstrado na figura 17C.

Figura 17. Avaliação da alimentação (nutriente) ou do comportamento alimentar nas alterações em genes do relógio hepático no modelo de vagotomia. **A:** Medida do consumo de alimentos por animais Sham e VNX durante 3 dias; **B:** Medida do trânsito intestinal em animais Sham e VNX, usando modelo que permite avaliar a distância percorrida pelo carvão ativado ao longo do intestino; **C:** Medida da absorção intestinal de animais Sham ($n=6$) ou submetidos a vagotomia ($n=6$), através da dosagem do radioisótopo Tecnécio no sangue dos animais, ao longo do



Com base nos dados preliminares apresentados, nós sugerimos que o nervo vago pode ser um importante regulador do relógio biológico periférico hepático, sincronizando sua fisiologia com a atividade alimentar, independente do relógio central e do nutriente para esta regulação.

4.3 Análises por Proteômica de processos fisiológicos associados ao fígado que podem ter relação com a desregulação do relógio biológico e deficiência do tônus colinérgico

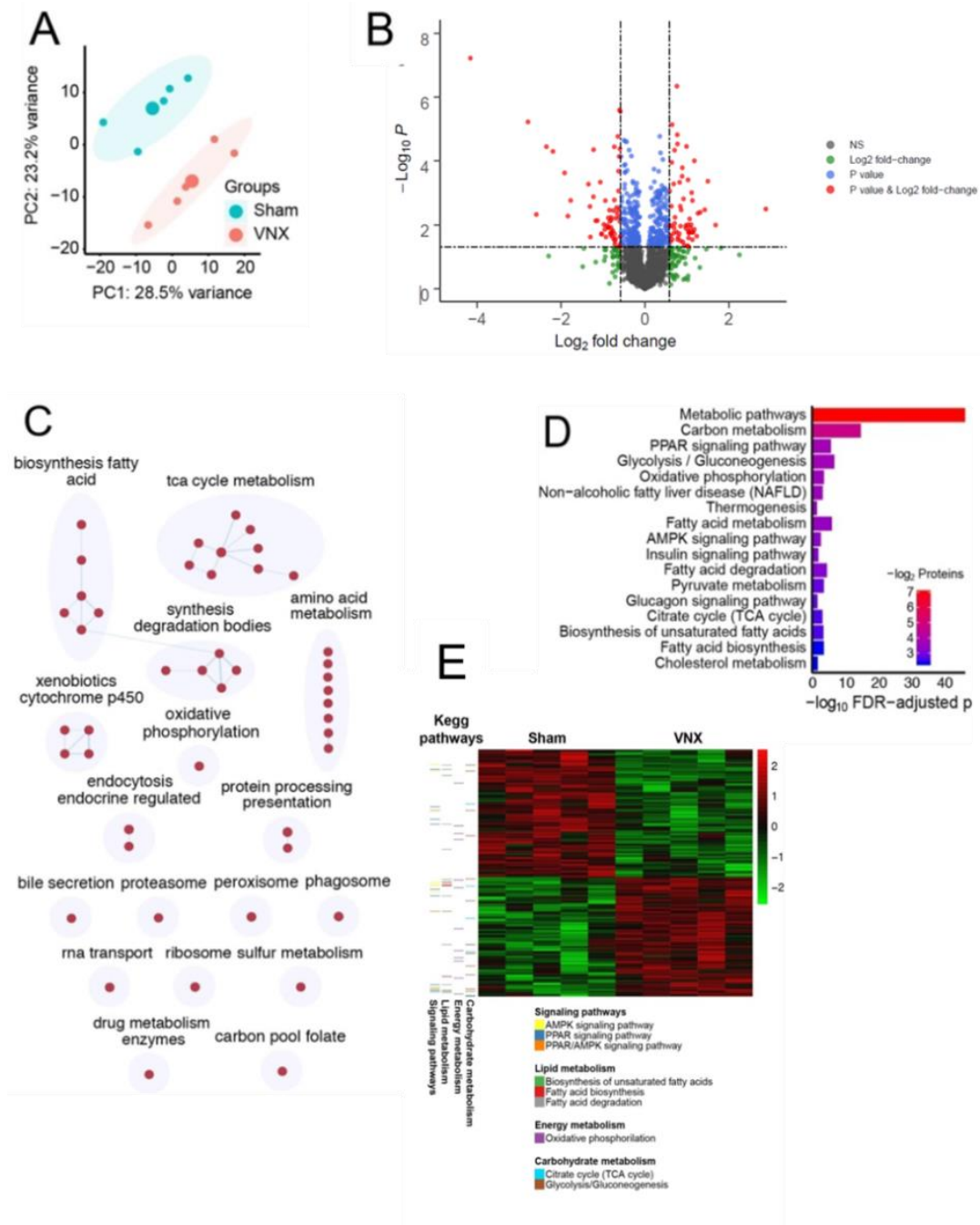
Uma vez que os genes do relógio controlam uma infinidade de funções fisiológicas, determinamos o perfil de expressão de proteínas no fígado de camundongos VNX e seu controle, no ZT6; a escolha desse ponto temporal se justifica pela observação de que a interrupção do circuito do nervo vago pela vagotomia impacta a expressão circadiana dos genes do relógio no fígado principalmente no horário específico referente ao ZT6.

A abundância de proteínas e os perfis das vias foram investigados por proteômica em animais do grupo VNX e seu controle, cujos fígados foram coletados sete dias após a vagotomia. Os dados foram submetidos à análise estatística para determinar o padrão de expressão proteica no fígado em cada grupo de animais. Além disso, comparamos os dois grupos para identificar diferenças na expressão de proteínas, bem como em vias diferencialmente enriquecidas em cada condição experimental.

Identificamos aproximadamente 2.100 alvos, dos quais 448 proteínas foram diferencialmente expressas após vagotomia (*upregulated* ou *downregulated*), alterando assim o padrão global de abundância de proteínas entre os dois grupos (Figura 18-A e B). Conforme revelado pela análise de enriquecimento de vias, a vagotomia impactou vários processos fisiológicos desempenhados pelo fígado: processos imunológicos como vias que regulam endocitose, processamento e apresentação de proteínas; vias de peroxissomo, proteassomo, fagossomo; secreção de bile; transporte de RNA; via de xenobióticos e da citocromo p450, bem como enzimas metabolizadoras de drogas. Entretanto, de todas estas alterações, as que ocorreram nos processos metabólicos foram as mais expressivas, ocorrendo alterações em vias de biossíntese e degradação de ácidos graxos, ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs, metabolismo de aminoácidos, de carboidratos, fosforilação oxidativa, vias regulatórias de sinalização, dentre outras (Figura 18 C-E). Chama a atenção que essas vias são funcionalmente interconectadas (Figura 18 C), sendo impossível excluir a possibilidade de que alterações em cada uma delas possa afetar o sistema como um todo. Uma vez que os resultados apontam que o circuito vagal está diretamente associado ao controle metabólico do fígado, essas vias foram selecionadas para um estudo mais aprofundado. Quando a expressão

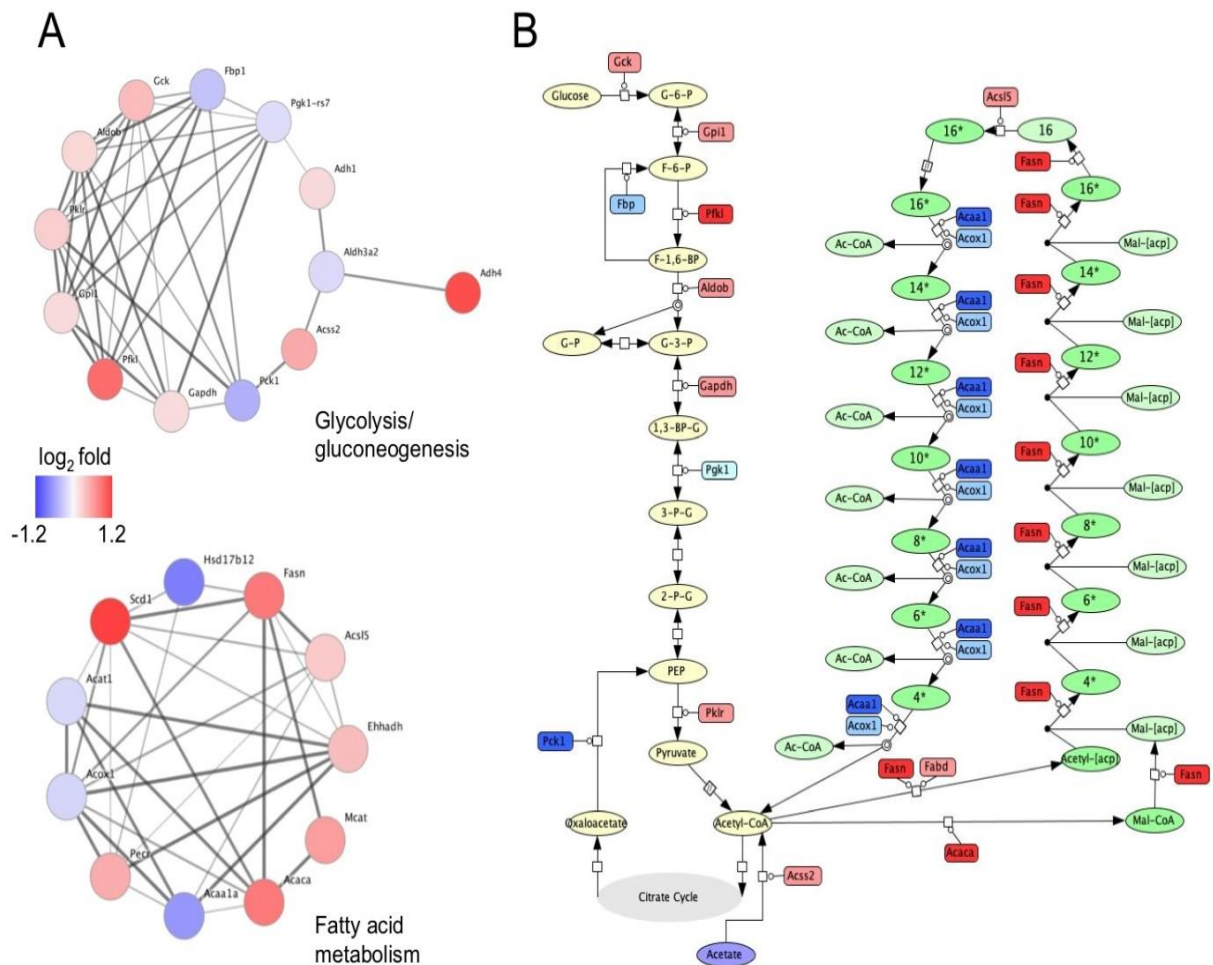
dessas proteínas é analisada, fica difícil identificarmos um padrão na alteração da expressão (upregulated ou downregulated), uma vez que alguns alvos são mais expressos enquanto outros, menos expressos (Figura 18E).

Figura 18. O circuito do nervo vago e alterações em genes de relógio hepático podem estar por trás da regulação do metabolismo do fígado. (A) Expressão de proteína global e (B) proteínas diferencialmente reguladas em grupos Sham *versus* VNX. (C) Mapa de vias enriquecidas com Kegg em proteínas expressas diferencialmente. Cada nó representa um caminho de Kegg e as linhas representam as interações entre eles. Cada cluster foi anotado automaticamente e os 3 termos mais descritivos mostrados na figura. (D) Dentre as vias enriquecidas por Kegg, muitas delas estavam relacionadas a processos metabólicos. (E) Mapa de calor mostrando os dados de expressão de proteínas e anotações com vias de interesse.



Entre as vias diferencialmente representadas, chamou especialmente a nossa atenção as redes de proteínas das vias de glicólise/gliconeogênese e do metabolismo dos ácidos graxos (Figura 19A-B). Nossos dados mostram uma mudança metabólica importante marcada com um aumento na expressão de proteínas envolvidas no processo de glicólise (GCK, PFKL, ALDOB e PKLR), nos processos de glicólise e gliconeogênese (GPI1, GAPDH) e redução na expressão de proteínas envolvidas no processo de gliconeogênese (PCK1, PGK1 e FBP), como mostrado na figura 20B. De maneira interessante, a proteômica ainda nos mostrou que a expressão de proteínas da via de biossíntese de ácidos graxos (etapas de iniciação e alongamento) encontra-se aumentada (FASN, FABD, ACACA, ACSL5) paralelamente à redução da beta-oxidação (ACAA1, ACOX1) no grupo VNX (Figura 19B).

Figura 19. O circuito do nervo vago e a desregulação circadiana podem ser reponsáveis por regular a glicólise e o metabolismo dos ácidos graxos. (A) Redes de proteínas em cada via enriquecida (Kegg). O mapa de cores representa a alteração $\log_2\text{fold}$ (VNX versus Sham), onde a cor vermelha significa proteínas com expressão aumentada e a cor azul significa proteínas com expressão reduzida. (B) Contextualização dos genes mostrados em A. Observa-se o aumento na glicólise e biossíntese de ácidos graxos (de 2 para 16 carbonos) e



Uma vez demonstrado com os resultados acima que a vagotomia tem um impacto tanto nos genes do relógio hepático quanto em processos metabólicos desempenhados pelo fígado, podendo ser estas alterações (desregulação de genes do relógio *versus* modificações em processos metabólicos hepáticos) diretamente relacionadas entre si de modo que indique causa-consequência ou apenas tendo um elemento causal em comum (nervo vago), buscamos investigar, nos próximos passos, as consequências da vagotomia com seu consequente desarranjo do relógio biológico hepático e os seus efeitos fisiológicos neste modelo em diferentes fases do dia.

4.4 Ensaio para validação da relevância biológica da proteômica através da avaliação de possíveis alterações em parâmetros metabólicos, coordenados pelo fígado, que apresentam regulação circadiana, no modelo de redução de tônus colinérgico provocado pela vagotomia.

A fim de corroborar os dados com os achados apresentados no ensaio de proteômica descritos na seção 4.3, sobretudo pelas alterações em vias metabólicas nos animais vagotomizados, especificamente no ZT6, nós realizamos ensaios com dois modelos diferentes de dieta, em tempos distintos:

- 1) Dieta rica em carboidratos refinados (HC) *versus* dieta padrão, durante 8 semanas;
- 2) Dieta rica em ácidos graxos (HFD) *versus* dieta padrão, durante 4 semanas.

O desafio com dietas distintas justifica-se pelas alterações encontradas na proteômica terem sido significativas, sobretudo, nas vias que envolvem glicólise/gliconeogênese e biossíntese/beta-oxidação de ácidos graxos nos animais com tônus colinérgico hepático reduzido pela vagotomia.

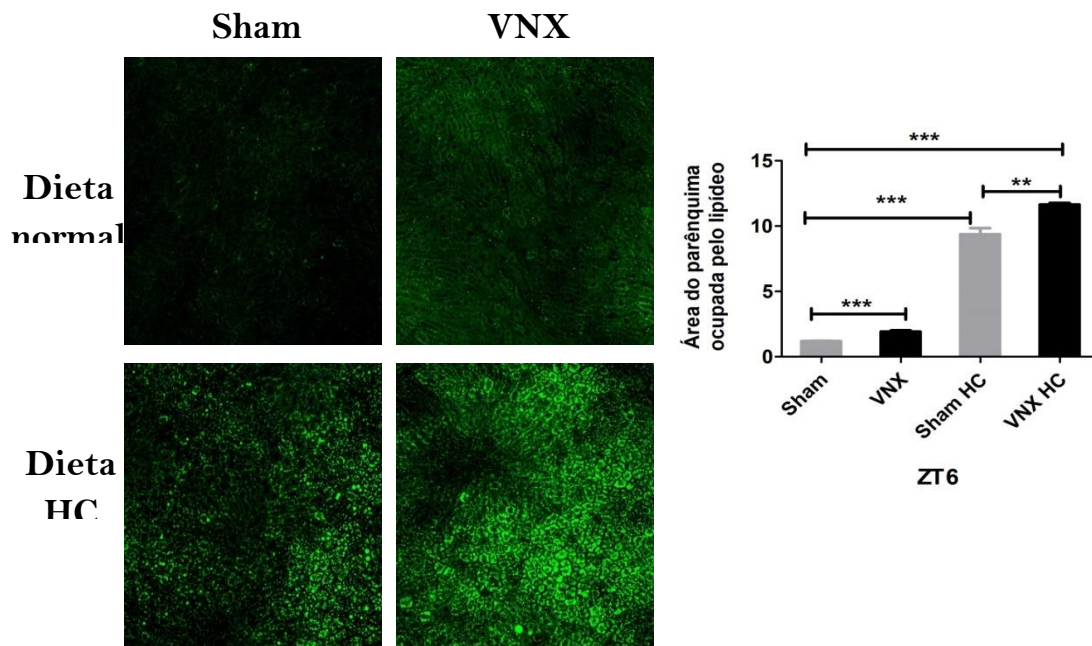
Desafio com dieta rica em carboidratos refinados (HC)

Nossa hipótese era que os animais vagotomizados estariam propensos a acumular lipídios no fígado, visto que as vias de glicólise e biossíntese de ácidos graxos estavam predominantemente aumentadas e a beta-oxidação de ácidos graxos diminuída consideravelmente. Pensando nisso, realizamos desafios com dieta rica em carboidrato a fim de causar um maior estresse metabólico em um sistema que se encontra desajustado em virtude do reduzido tônus colinérgico. O objetivo era investigar se o *shift* metabólico causado pela vagotomia seria intensificado diante de uma dieta hipercalórica fornecendo mais substrato (carboidrato) para via glicolítica, que se encontra alterada no fígado de animais

vagotomizados. Dessa forma, acompanhamos os animais dos grupos Sham e VNX durante 8 semanas após a cirurgia.

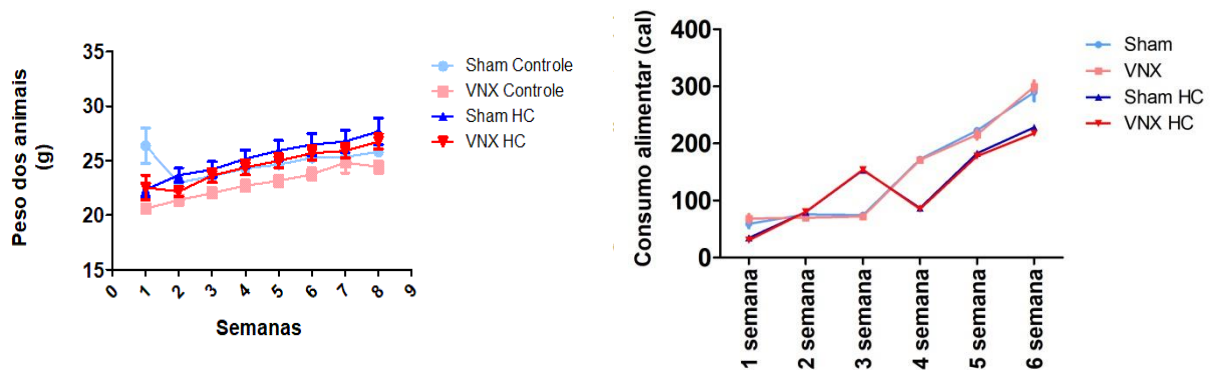
Para avaliar o acúmulo de gordura hepática, realizamos o ensaio utilizando o marcador de lipídeo bodipy e obtivemos os seguintes resultados: na dieta padrão, os animais VNX acumularam mais gordura no fígado quando comparados aos animais Sham ($p < 0,0001$) (Figura 20); na dieta HC, há maior armazenamento de gordura hepática em ambos os grupos, quando comparados com a dieta padrão, destacando-se uma diferença acentuada nos animais VNX quando comparados aos Sham ($p < 0,001$) (Figura 20).

Figura 20. A ausência do tônus colinérgico em conjunto com o deslinhamento circadiano hepático podem estar envolvidos no acúmulo de lipídios no fígado. O desafio com dieta rica em carboidratos exacerba o perfil de desenvolvimento de esteatose sobretudo em animais VNX. Os lipídios foram visualizados com bodipy, uma sonda fluorescente. *** $p < 0,0001$ (Sham x VNX), *** $p < 0,0001$ (Sham x Sham HC), *** $p < 0,0001$ (Sham x VNX HC), ** $p < 0,001$ (Sham HC x VNX HC).



Não houve alteração no peso dos animais ao longo do experimento nos grupos Sham e VNX, tanto na dieta padrão como na dieta HC, como demonstrado na figura 21. Com relação ao consumo alimentar, há uma significância estatística no consumo entre as dietas padrão e HC ao longo do tempo ($p < 0,001$), todavia a dieta não causou um impacto no consumo alimentar entre os grupos Sham e VNX, podendo considerar que, para cada dieta, os dois grupos consomem igualmente (Figura 21).

Figura 21. Acompanhamento do peso de animais e consumo alimentar durante tratamento com dieta rica em carboidratos (HC). Não houve alteração no peso de animais Sham e VNX alimentados com dieta padrão e HC, ao longo de 8 semanas. Não houve alteração no consumo alimentar entre animais Sham e VNX da dieta padrão e animais Sham e VNX da dieta HC. * $p < 0,001$ (Dieta padrão x Dieta HC).

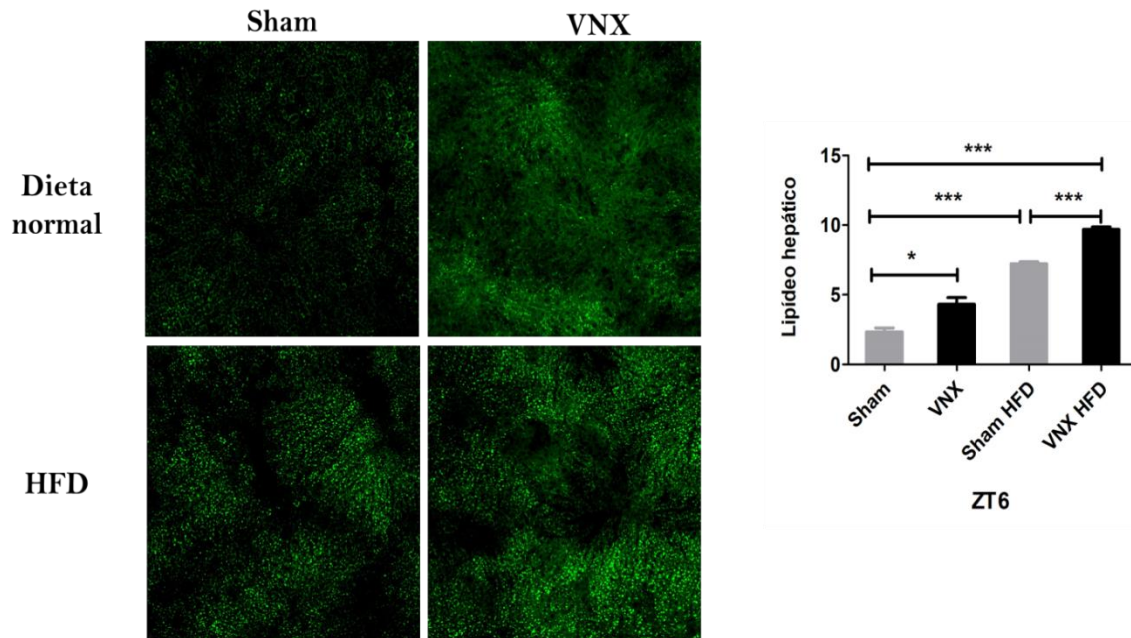


Desafio com dieta rica em ácidos graxos (HFD)

Acompanhamos camundongos dos grupos Sham e VNX, em dieta padrão e HFD, por 4 semanas após o período de recuperação da cirurgia.

Com relação ao ensaio com a sonda fluorescente bodipy, observamos que os animais VNX acumularam mais gordura no fígado do que animais Sham ($p > 0,02$), mesmo quando ambos eram alimentados com dieta padrão (Figura 22). É importante ressaltar que os camundongos Sham e VNX foram mantidos nos mesmos ciclos de claro/escuro e foram alimentados com uma dieta comercial padrão *ad libitum*. Como esperado, o acúmulo de ácido graxo no fígado foi maior ainda nos animais que receberam dieta HFD, sendo que os animais VNX apresentaram elevação significativa de gordura ($p < 0,0004$) quando comparado aos animais controle deste grupo HFD (Figura 22).

Figura 22. A ausência do tônus colinérgico em conjunto com o desalinhamento circadiano hepático podem estar envolvidos no acúmulo de lipídios no fígado. O desafio com dieta rica em ácidos graxos exacerba o perfil de desenvolvimento de esteatose sobretudo em animais VNX.. Os lipídios foram visualizados com bodipy, uma sonda fluorescente. * $p < 0,02$ (Sham x VNX), *** $p < 0,0001$ (Sham x Sham HFD), *** $p < 0,0001$ (Sham x VNX HFD), *** $p < 0,0004$ (Sham HFD x VNX HFD).

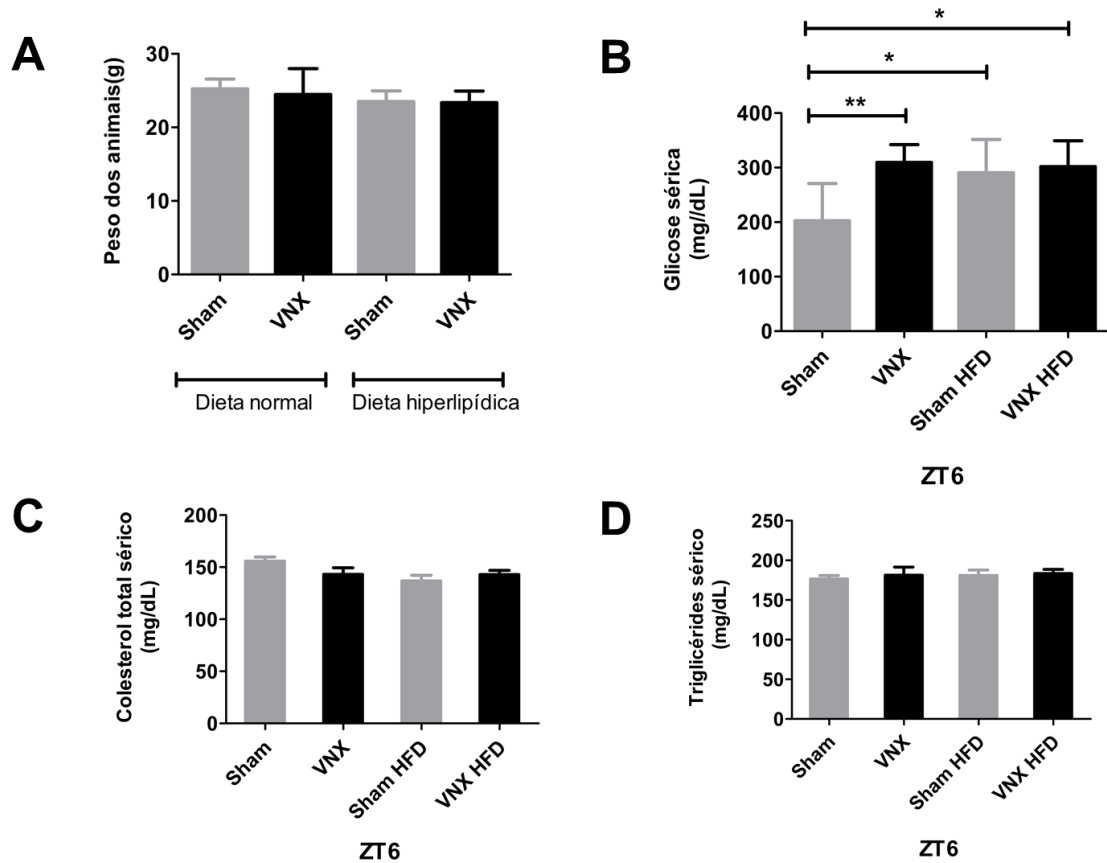


Estes resultados seguem o mesmo protótipo em ambos os modelos (HC e HFD), demonstrando que a vagotomia, mesmo quando em dieta padrão, leva ao acúmulo de lipídeos no fígado e que esse acúmulo é amplificado na presença de uma dieta rica em carboidratos refinados e ácidos graxos.

Ao final das 4 semanas, o peso dos animais não diferiu entre os grupos Sham e VNX, seja na dieta padrão ou HFD (Figura 23A). Nas dosagens séricas realizadas no ZT6, observamos que ocorre aumento no nível de glicose sérica nos animais VNX em relação ao seu controle ($p > 0,009$), no grupo de dieta padrão. O resultado também nos mostra que a dieta HFD induziu aumento na glicose sérica em animais Sham ($p > 0,03$) comparados ao controle que recebeu dieta padrão. Ainda, os animais VNX que receberam dieta HFD também apresentaram aumento de glicose sérica ($p > 0,01$) comparado aos animais Sham da dieta padrão, entretanto não houve aumento em relação aos animais Sham que também foram alimentados com dieta HFD (Figura 23B).

Para as dosagens de colesterol e triglicerídeos séricos não foram observadas diferenças entre os grupos das dietas padrão e HFD, como mostrado nas figuras 23 C-D.

Figura 23. Avaliação dos parâmetros peso corporal (A), glicose sérica no ZT6 (B), colesterol total sérico no ZT6 (C) e triglicérides sérico no ZT6 (D) de animais VNX e seu controle, em dieta padrão e dieta hiperlipídica. * $p < 0,03$ e ** $p < 0,01$.

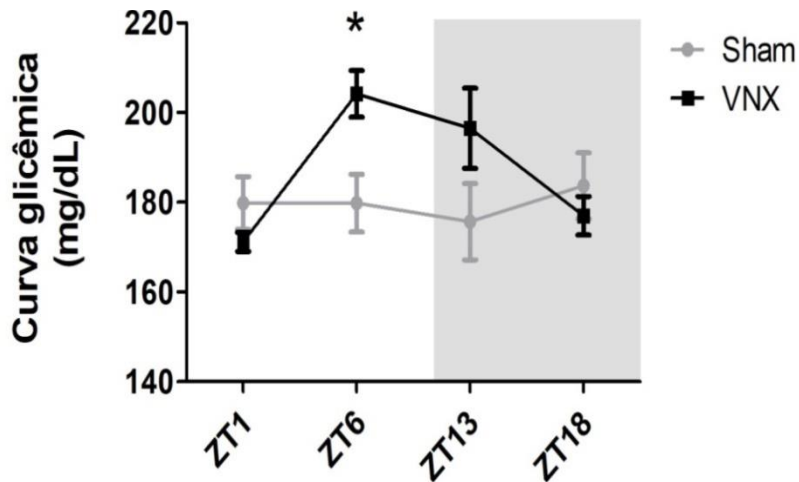


Em virtude do desajuste de genes do relógio hepático ter ocorrido concomitante às alterações em vias metabólicas hepáticas no nosso modelo de vagotomia, juntamente com o entendimento existente na literatura a respeito da atuação do sistema circadiano sobre o controle de funções metabólicas hepáticas, fomos avaliar mais diretamente o impacto da alteração no relógio periférico hepático mediado pela vagotomia em funções fisiológicas desempenhadas pelo fígado, mais especificamente funções metabólicas, como níveis séricos de glicose, lipídeos e glicogênio hepático. Preliminarmente, já demonstramos que o circuito do nervo vago é importante para regular alguns genes do relógio no fígado e para adaptar a glicose hepática e o metabolismo dos ácidos graxos.

Em condições de dieta padrão, medimos a glicose sérica de animais VNX e seu controle ao longo do dia (ZT1, ZT6, ZT12 e ZT18). Nossos resultados mostraram que o nível sérico de glicose aumenta mais na fase de atividade (momento da alimentação) nos animais controle. Entretanto, a vagotomia alterou o padrão de glicose, elevando significativamente os

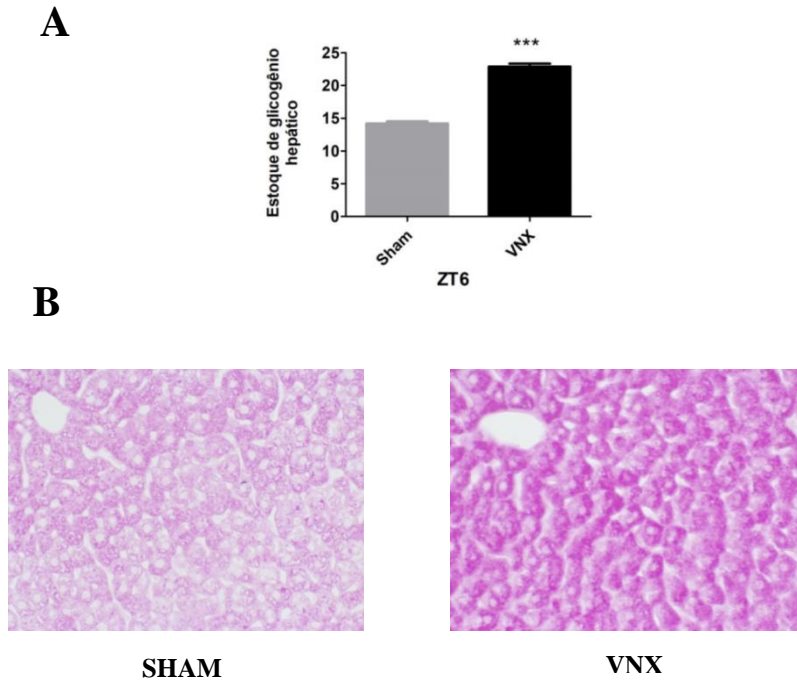
níveis séricos no ZT6 ($p < 0,05$) e reduzindo seus níveis na fase escura/ativa dos animais (figura 24).

Figura 24. Dosagem de glicemia em animais dos grupos sham ($n=6$) e vagotomizados ($n=6$) ao longo do dia, utilizando o kit comercial de monitorização de glicemia ACCU-CHEK (Roche Diabetes Care). * $p < 0,05$.



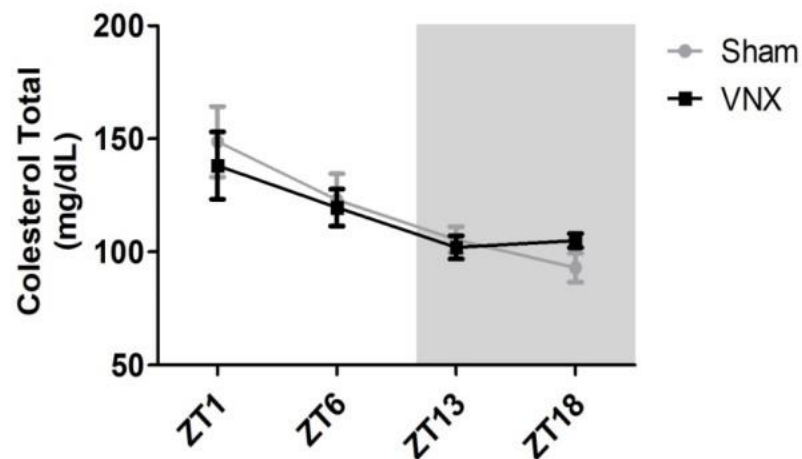
Ao quantificarmos o estoque de glicogênio no fígado nos dois grupos experimentais, no ZT6, observamos uma elevação significativa ($p < 0,001$) da quantidade de glicogênio no fígado dos animais vagotomizados, quando comparados ao controle (Figura 25A) Nos cortes hepáticos, observamos uma maior quantidade de grânulos intrahepatócitos e as regiões pericentrais mais coradas nos animais vagotomizados comparado aos animais controle (Figura 25B-C).

Figura 25. A: Quantificação de glicogênio hepático pela coloração de PAS em animais dos grupos sham (n=6) e vagotomizados (n=6) no ZT6. **B:** Corte histológico representativo do estoque de glicogênio de animais VNX e seu controle.



Ao dosarmos o colesterol total sérico em animais Sham e VNX observamos que ambos os grupos apresentaram o mesmo padrão rítmico, com níveis de colesterol mais elevados na fase clara (ZT1 e ZT6) e redução desses níveis na fase escura (ZT13 e ZT18), como observado na figura 26.

Figura 26. Dosagem de colesterol total no plasma de animais dos grupos sham (n=6) e vagotomizados (n=6) ao longo do dia, pelo método imunoenzimático ELISA.



5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado para desvendar a participação do nervo vago na sincronização do relógio biológico hepático e suas consequências sobre a fisiologia do fígado.

Nossos achados, de uma maneira geral, demonstraram que o nervo vago controla o relógio biológico hepático, uma vez que a vagotomia teve um impacto importante sobre a expressão de genes do relógio, sobretudo em um tempo específico do dia. Paralelamente a essa alteração, foi revelado pela proteômica que os animais submetidos à vagotomia apresentaram uma mudança no perfil metabólico do fígado, no qual ocorre uma maior propensão ao acúmulo de gordura neste órgão, uma vez que as vias glicolíticas e de síntese de ácidos graxos apresentam-se aumentadas enquanto a β -oxidação e gliconeogênese apresentam-se reduzidas. Esses achados proteômicos foram validados fisiologicamente *in vivo* com diferentes dietas e, mesmo em dieta padrão, os animais deficientes de tônus colinérgico exibem um perfil de maior acúmulo de gordura hepática, sendo esse acúmulo maior ainda quando submetidos a um estresse metabólico.

A princípio, procuramos identificar se o nervo vago impactava no relógio biológico periférico do fígado como sendo um condutor de informações externas que sincroniza esse relógio. Nossos resultados demonstraram que alguns genes-chave do sistema circadiano hepático são desregulados em virtude da vagotomia, sugerindo participação do nervo vago na regulação desse sistema. Dado que existe um vasto e paradoxo debate sobre a independência dos relógios periféricos na literatura, nos perguntamos se essa alteração circadiana hepática decorrente da vagotomia seria dependente ou independente do relógio central, onde a luz sentida pela retina e transmitida ao NSQ é importante para sincronizar os órgãos internos, via fatores neurais ou humorais (BUIJS; KALSBECK, 2001b). Sabe-se que o ritmo da expressão de genes de relógio na periferia normalmente está acoplado ao ritmo do NSQ. Entretanto, sabe-se também que mudanças em alguns fatores como disponibilidade de alimentos, temperatura e corticosterona podem alterar o ritmo de relógios periféricos, mas não o ritmo do NSQ (BALSALOBRE, AURÉLIO *et al.*, 2000; DAMIOLA *et al.*, 2000). Nossos resultados são respaldados por trabalhos que defendem a autonomia (PILORZ; HELFRICH-FÖRSTER; OSTER, 2018), pelo menos em parte, dos relógios periféricos internos, indicando assim que, possivelmente o nervo vago não esteja alterando o relógio central – uma vez que a vagotomia não alterou parâmetros fisiológicos reconhecidamente modulados pelo relógio central (temperatura corporal e atividade locomotora) (HOPWOOD *et al.*, 2018; SCHEIERMANN; KUNISAKI; FRENETTE, 2013; TAL; CHAPNIK; FROY, 2019) –, mas seja importante para

o ajuste do relógio periférico hepático, sugerindo que mudança no sistema parassimpático vagal possa ser também um dos fatores que altere relógios periféricos, sem alterar o ritmo central.

Sob esse aspecto de organização de relógios central e periféricos, é interessante discutir algumas ideias fundamentadas na literatura que possam explicar nossos dados ou direcionar para experimentos futuros: primeiro, é importante destacar que o hipotálamo é uma excelente área-alvo do NSQ e que, via sistema nervoso autonômico (SNA), o hipotálamo direciona um conjunto de funções fisiológicas de modo sincronizado com as informações advindas do NSQ. Percebe-se que o SNA é um condutor comum de informações importantes para manutenção da homeostase, nestas áreas (BUIJS; ESCOBAR; SWAAB, 2013); segundo, trabalhos mais recentes têm estudado a cooperação entre genes de relógio e fatores de transcrição tecido-específicos mostrando que saídas da transcrição rítmica do relógio circadiano dependem de mecanismos adicionais, como presença de fatores de transcrição, além da ligação do gene do relógio ao DNA somente, o que pode, em última análise, contribuir para a plasticidade do programa de transcrição circadiano (BEYTEBIERE *et al.*, 2019). Tomando esses dados em conjunto, podemos levantar hipóteses tais quais, em nosso modelo, sob condições de claro-escuro ciclando normalmente: (i) a vagotomia pode de fato não estar alterando o relógio central, todavia pode estar comprometendo a condução de informações eferentes dos núcleos centrais para a periferia e, nesse caso, o ajuste do relógio hepático pode, em parte, depender de informações do NSQ; (ii) a vagotomia pode, através da não condução de sinais aferentes para o SNC, alterar o padrão de expressão de fatores de transcrição fígado-específicos importantes para o ajuste transcricional de genes de relógio hepático, sem comprometer o funcionamento do relógio central. O estudo dessa cooperação e organização hierárquica entre relógios central e periférico ainda é incipiente e, para o caso específico dessa pesquisa, seria interessante avaliar a contribuição dos ramos aferentes e eferentes vagais sobre os genes de relógio hepático para assim concluir se o estímulo de sincronização do relógio biológico do fígado tem sua origem no SNC ou no próprio TGI, bem como investigar perfis de fatores de transcrição hepáticos que cooperem com genes de relógio. Contudo, mostramos, de maneira preliminar, que possivelmente as alterações no relógio hepático são pelo menos parcialmente independentes do relógio central.

Com intuito de entender com mais detalhes como a regulação do relógio biológico hepático ocorre via circuito neural mediado pelo nervo vago e, sabendo que: (i) o fígado percebe os nutrientes advindos da alimentação através da absorção intestinal via sistema porta e (ii) a alimentação é capaz de modular o relógio biológico periférico (ASHER; SASSONE-

CORSI, 2015a; BISHEHSARI *et al.*, 2016), indagamos se a vagotomia estaria alterando a absorção de nutrientes e a sua chegada ao fígado, e isso pudesse ser a causa da cronodisrupção hepática. Nossos resultados mostraram que a secção do nervo vago não impactou na absorção intestinal, indicando que não seria o nutriente *per se* que estaria modulando o relógio hepático, uma vez que a sua absorção está oscilando normalmente. Em adição, o comportamento alimentar e o trânsito intestinal dos animais vagotomizados não apresentaram alteração, sendo assim, com esse conjunto de dados, afastamos a hipótese de que seja o nutriente chegando no fígado a fonte de regulação do relógio, fortalecendo ainda mais a ideia de que o circuito neuroepitelial mediado pelo nervo vago possa ser o condutor das informações sobre a presença de nutrientes no lúmen intestinal (KAELBERER *et al.*, 2018).

Tem sido demonstrado que a perturbação dos genes do relógio altera profundamente o metabolismo energético (REINKE; ASHER, 2019) e desregula as respostas inflamatórias (HOPWOOD *et al.*, 2018; SCHEIERMANN; KUNISAKI; FRENETTE, 2013). BMAL1 e CLOCK participam da regulação de inúmeros genes envolvidos com funções imunológicas e metabólicas no fígado. No que diz respeito à função imunológica, BMAL1 tem sido mostrado atenuar a ativação de NF- κ B por sequestrar CLOCK. O CLOCK é requerido para acetilação da subunidade p65, um evento-chave para transativação de NF- κ B e subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias (CURTIS *et al.*, 2015). Sabe-se que a resposta a um desafio imunológico, como ao lipopolissacarídeo, é alterada dependendo da hora do dia. Em condições fisiológicas, como mostra o nosso estudo, a downregulação na expressão do mRNA de *Bmal1* (ZT6), principalmente, durante a vagotomia poderia antecipar a janela imunológica dos animais, alterando a função do relógio e conseqüentemente o controle circadiano da inflamação. Do ponto de vista metabólico, a downregulação desses genes pode suscitar uma grande variedade de alterações em funções tais como metabolismo de glicose e lipídeos, relações estas já bem solidificadas na literatura (ASHER; SASSONE-CORSI, 2015a; FERRELL; CHIANG, 2015; MUKHERJI *et al.*, 2019a; REINKE; ASHER, 2019; TAL; CHAPNIK; FROY, 2019; ZHOU, DEXI *et al.*, 2016b), demonstrando assim que o nervo vago pode ter um papel potencial modulatório no metabolismo hepático via regulação de genes de relógio no fígado, como será discutido adiante.

REV-ERB α e ROR α reconhecem os mesmos sítios de ligação ao DNA e estabelecem um circuito regulador dinâmico oposto sobre o promotor de BMAL1, em que ROR α funciona como regulador positivo da expressão de *Bmal1*, enquanto REV-ERB α bloqueia ROR α e regula negativamente a expressão de *Bmal1* (PILORZ; HELFRICH-FÖRSTER; OSTER, 2018). No fígado, REV-ERBs conferem importante papel para o controle da expressão de

genes lipogênicos (CARATTI *et al.*, 2018) e de genes inflamatórios. Nossos resultados fortalecem os dados da literatura em virtude da expressão em anti-fase dos genes *Rev-Erba* e *Rora*, e o acentuado aumento da expressão de *Rev-Erba* no ZT6 é um resultado relevante, uma vez que este aumento pode estar por trás da reduzida expressão de *Bmal1* nesse ZT. O papel do ROR α na regulação do relógio circadiano no fígado é menos estudado que do REV-ERB α , todavia, em nossos resultados, a sua menor expressão no ZT6 corrobora também com a menor expressão de *Bmal1*, podendo sugerir que possíveis alterações na fisiologia hepática mediada pela vagotomia possam ser decorrentes da downregulação de *Bmal1*, por interferência em seus reguladores.

Embora se saiba do papel importante dos genes *Per1*, *Per2* e *Cry1* na homeostase do organismo, no nosso modelo, esses genes não parecem ser regulados pelo nervo vago, corroborando com dados na literatura que mostram que a atividade de neurônios simpáticos é importante para a manutenção da expressão rítmica de alguns genes do relógio no fígado, como os genes *Per* (SHIBATA, 2004).

O nosso estudo não foi o primeiro a mostrar que a cronodisrupção impacta nas mais diversas funções do fígado, contudo, foi o primeiro a demonstrar que, em condições normais de ciclo claro-escuro e alimentação *ad libitum*, a sincronização de componentes do relógio periférico hepático e sua oscilação ao longo do dia, importantes para tais funções, é alterada pela redução do tônus colinérgico em modelo de vagotomia cervical esquerdo.

Devido às inúmeras possibilidades de vias funcionais hepáticas que poderíamos estudar para relacionar controle circadiano hepático com nervo vago e para melhor compreender como se dá a regulação de funções fisiológicas circadianas hepáticas tendo como eixo modulador o nervo vago, partimos para uma análise em um aspecto mais amplo abrangendo o estudo de proteínas e suas vias hepáticas associadas.

A análise global dos proteomas no fígado nos forneceu uma melhor caracterização das vias hepáticas, sobretudo da metabólica, que são desreguladas em virtude da vagotomia no período de tempo em que os genes do relógio *Bmal1*, *Clock*, *Rev-Erba* e *Rora* encontram-se alterados (ZT6).

Conforme revelado pela análise de enriquecimento de vias, a vagotomia impactou vários processos fisiológicos no fígado. Entre as vias diferencialmente representadas, estávamos especialmente interessados nas redes de proteínas metabólicas, como da glicólise/gliconeogênese e metabolismo dos ácidos graxos. Nossos dados preliminares mostraram uma mudança metabólica importante com um aumento na glicólise e biossíntese de ácidos graxos (etapas de iniciação e alongamento) paralelamente à redução da beta-

oxidação no grupo VNX. Concomitante a esses achados, o fenótipo dos animais vagotomizados apresentou aumento nos níveis séricos de glicose e no estoque de glicogênio hepático, mesmo que não tenha havido alteração no colesterol e triglicérides séricos. Podemos atribuir essa não alteração em lipídeos séricos ao fato de nosso modelo de vagotomia ser agudo e não sabermos se a vagotomia em conjunto com a desregulação nos genes do relógio nesse ínterim seria suficiente para afetar o colesterol total/triglicérides de forma sistêmica. Uma perspectiva seria avaliar o que aconteceria com esses parâmetros em caso de uma vagotomia crônica.

Os resultados culminaram para uma importante mudança no perfil metabólico dos animais quando submetidos à vagotomia. É bem estabelecido o papel de sistemas neurais na homeostase energética (IZUMIDA *et al.*, 2013; LAM; SCHWARTZ; ROSSETTI, 2005; UNO *et al.*, 2006; YAMADA *et al.*, 2006). O nervo vago, por exemplo, participa do controle da ingestão alimentar, responde rapidamente a mudanças em níveis de glicose e peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP1) na veia porta hepática e também controla o metabolismo (BURCELIN; SERINO; CABOU, 2009; TROY *et al.*, 2008). Além de desempenhar essas funções clássicas, nosso trabalho mostrou que o nervo vago parece também realizar uma regulação fina na dinâmica de proteínas participantes de processos bioquímicos envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídeos no fígado, sem que a vagotomia, necessariamente, alterasse o peso corporal, o comportamento alimentar, a motilidade ou absorção intestinal dos animais, indicando que os animais comem a mesma quantidade, absorvem igualmente, porém, processam o alimento de uma forma diferente quando o tônus colinérgico é reduzido.

O nervo vago é bem conhecido por desempenhar um papel essencial na manutenção da homeostase metabólica (WAISE; DRANSE; LAM, 2018), entretanto, o nosso trabalho foi o primeiro a descrever a influência desse nervo em diferentes vias metabólicas hepáticas. Por exemplo, a deafferentização vagal em roedores leva à hiperglicemia precoce em resposta a sinais relacionados a nutrientes (HAYES *et al.*, 2011; I'MERYÜZ *et al.*, 1997; WANG, PENNY Y. T. *et al.*, 2008), indicando que os aferentes vagais têm um papel no controle da glicose sanguínea pós-refeição. Kwon e colaboradores (KWON *et al.*, 2020) também mostraram recentemente, através da estimulação optogenética de um subconjunto de neurônios POMC no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) que inervam o fígado via neurônios pré-ganglionares parassimpáticos de acetilcolina no DMV, que a atividade reduzida dos neurônios colinérgicos parassimpáticos que projetam o fígado por si só é capaz de aumentar a produção de glicose hepática. Com isso, é consolidada a atuação do nervo vago em efeitos metabólicos relacionados à homeostase de glicose, bem como a outros efeitos

referentes à sensibilidade à insulina e em respostas a hormônios que sinalizam saciedade ou fome, como CCK, GLP1, PYY, leptina, ácidos graxos de cadeia curta e grelina (WAISE; DRANSE; LAM, 2018), importantes para o metabolismo lipídico e desenvolvimento de condições como obesidade, porém, até o presente momento, não se sabia que a vagotomia poderia impactar no ajuste da dinâmica bioquímica de proteínas envolvidas em processos metabólicos hepáticos.

Nesse sentido, os dados do nosso trabalho ampliam ainda mais o conhecimento da regulação metabólica mediada pelo nervo vago ao destrinchar as proteínas que são diferencialmente expressas dentro de vias, como a glicolítica/gliconeogênese, quando o sistema colinérgico vagal é interrompido pela vagotomia. Nós mostramos que a vagotomia aumenta a expressão de proteínas que fazem parte da rota irreversível de quebra de glicose (GCK, PFKL, ALDOB, PKLR) e reduz a expressão de proteínas envolvidas no processo irreversível de gliconeogênese (PCK1 e FBP), no fígado. Os hepatócitos metabolizam glicose por meio da glicólise para produzir ATP na presença de oxigênio, ao invés de prosseguir com a cadeia respiratória mitocondrial. Este fenômeno permite a rápida introdução e processamento da glicose acelerando o transporte de glicose para os hepatócitos, aumentando a cinética de enzimas glicolíticas e subprodutos glicolíticos secretores, como ácido láctico. Nas fases finais da glicólise, a piruvato quinase (PK) converte o fosfoenolpiruvato (PEP) em piruvato, que, por sua vez, pode ser usado para gerar acetil-CoA pela piruvato desidrogenase (PDH), ligando assim a glicólise citosólica ao ciclo do ácido cítrico mitocondrial (NAIFEH; DIMRI; VARACALLO, 2021). O aumento na formação de metabólitos como piruvato, que é transformado em Acetil-CoA, também aumenta a disponibilidade de substrato para entrar nas vias de biossíntese de ácidos graxos e mostramos que há um desvio para formação aumentada de piruvato quando a inervação vagal hepática é interrompida pela vagotomia.

Adicionalmente, a gliconeogênese, que é essencialmente a reversão da glicólise, também está prejudicada em animais vagotomizados. Sabe-se que em humanos, a gliconeogênese ocorre principalmente no fígado e seus principais substratos são lactato (produto da glicólise anaeróbica), glicerol (vem do tecido adiposo) e aminoácidos glicogênicos (entram na gliconeogênese por meio do ciclo do ácido cítrico). Devido à natureza altamente endergônica da gliconeogênese, suas reações são reguladas em vários níveis. A maior parte da regulação ocorre por meio de alterações nos níveis circulantes de glucagon e disponibilidade de substratos gluconeogênicos. No entanto, as flutuações nos níveis de catecolaminas, hormônio do crescimento e cortisol também desempenham um papel (BANKIR *et al.*, 2018; MELKONIAN; ASUKA; SCHURY, 2021; SHARMA; DAVIS;

SHEKHAWAT, 2017). Agora, em nosso trabalho, mostramos que a deficiência colinérgica reduz a expressão de uma proteína importante na conversão de oxalacetato em PEP, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK1), sugerindo que a sinalização colinérgica também pode ser um regulador desse processo de gliconeogênese.

Outra via metabólica alterada em nosso modelo foi a do metabolismo de ácido graxo, em que a vagotomia aumentou a expressão de proteínas-chave de iniciação e alongamento da biossíntese de ácidos graxo e reduziu a expressão de proteínas envolvidas na β -oxidação. Esse resultado, em conjunto com o aumento na glicólise e redução na gliconeogênese, pode contribuir para o processo de conversão de carboidrato (glicose) em ácido graxo via lipogênese hepática *de novo*, um dos mecanismos bioquímicos que desencadeiam a produção de gordura hepática e, conseqüentemente, pode predispor à doença hepática gordurosa não alcoólica do fígado (MAFLD). Vale destacar que a patologia da MAFLD é geralmente iniciada por perturbações no metabolismo dos ácidos graxos livres, que levam ao acúmulo excessivo de TGs nos hepatócitos (FRIEDMAN, SCOTT L. *et al.*, 2018; MUKHERJI *et al.*, 2019a; SAMUEL; SHULMAN, 2018). Em nosso modelo, mostramos que o desvio para quebra de glicose e formação de piruvato, concomitante com a baixa utilização desse piruvato para formação de glicose via gliconeogênese, é um mecanismo bioquímico que gera um ciclo vicioso para a formação de Acetil-CoA. Este, por sua vez, pode entrar no ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) e/ou ser usado para a síntese de ácido graxo. A síntese de ácidos graxos é principalmente mediada pelas enzimas citosólicas acetil-CoA carboxilase (ACACA) e ácido graxo sintase (FASN), em que a acetil-CoA é utilizada por FASN para iniciar uma nova cadeia de acila e é subsequentemente alongada usando malonil-CoA gerada por ACACA. É interessante notar, que as principais enzimas responsáveis pela iniciação e alongamento (ACACA e FASN) da síntese de ácido graxo encontram-se com expressão aumentada em animais vagotomizados, intensificando a biossíntese de lipídeos. O mecanismo exato que impulsiona a lipogênese *de novo* na MAFLD é desconhecido, mas a ativação de fatores como SREBP-1c e ChREBP devido ao aumento da glicose e insulina circulantes no contexto da resistência à insulina em todo o corpo foi sugerida como um fator central (SMITH *et al.*, 2020; WALLACE; METALLO, 2020), além disso a sinalização de leptina prejudicada no SNC também demonstrou modular a DNL hepática (HACKL *et al.*, 2019). Nesse contexto, nosso trabalho apresenta uma outra perspectiva de como disfunções vagais podem ser participar do desenvolvimento da MAFLD, impulsionando ou contribuindo com o processo de lipogênese *de novo*.

Importante pontuar ainda que, em resposta a uma concentração excessiva de ácidos graxos livres, as mitocôndrias, normalmente aumentam o fluxo lipídico mitocondrial mediado pelas proteínas CPT1/2 e a β oxidação, para proteger contra a lipotoxicidade, um mecanismo que é perdido durante o curso da MAFLD (LONGO *et al.*, 2021). Trazendo essa informação para o nosso trabalho, mostramos que a vagotomia também reduz proteínas envolvidas no processo de β oxidação, tais como a ACAA1 e ACOX1, limitando, dessa forma, o catabolismo de ácido graxo. Tem sido reportada associação de redução em processos de β oxidação, ATP e potencial de membrana mitocondrial com MAFLD progressiva e em muitos casos de MAFLD progredindo para câncer hepático (LONGO *et al.*, 2021), o que fortalece mais ainda a relevância biológica dos nossos resultados.

Dessa forma, nossos achados reforçam o papel do nervo vago na regulação metabólica hepática e, mais do que isso, descreve vias metabólicas, de forma pormenorizada, identificando proteínas reguladoras indispensáveis para o processamento de carboidratos e lipídeos que, estendendo nossos conhecimentos para fisiopatologia hepática, podem se tornar alvos importantes de estudos envolvendo o sistema colinérgico em condições de distúrbios metabólicos como a MAFLD.

Após caracterização potente das vias metabólicas alteradas pela vagotomia no ZT6, realizamos ensaios funcionais para validação do modelo no qual a vagotomia pode predispor o animal ao acúmulo de gordura hepática. Uma vez que, a nível proteico, o metabolismo de carboidratos e ácidos graxos encontrava-se alterado em virtude da vagotomia, em condições de ingestão calórica normal pela dieta padrão, e tendo em vista que a fisiopatologia da MAFLD deriva do acúmulo de gordura hepática devido ao metabolismo discrepante dos ácidos graxos livres, nos perguntamos se a redução do tônus colinérgico poderia: **(i)** predispor o fígado ao acúmulo de gordura em condições de dieta padrão; **(ii)** e se uma perturbação nesse sistema, aumentando o excesso calórico alimentar, exacerbaria o fenótipo metabólico alterado pela vagotomia.

Respondendo à primeira pergunta, observamos por microscopia confocal e marcação lipídica com bodipy que a vagotomia predis põe a um perfil de maior acúmulo de gordura hepática juntamente com presença de hiperglicemia, mesmo em dieta padrão. Tal perfil de esteatose inicial encontrado neste trabalho pode ser explicado de forma mecânica pela alteração bioquímica-metabólica descrita na proteômica, induzida pelo tônus colinérgico reduzido, cuja tendência é sintetizar mais ácidos graxos via quebra de glicose do que degradar.

Ao introduzirmos dois modelos distintos de dieta, consideramos o entendimento de que a expressão de enzimas críticas na biossíntese de ácidos graxos e gorduras também é rigidamente controlada por estímulo nutricional (SUL *et al.*, 2000), sendo assim, hipotetizamos que a dieta HC forneceria mais carboidratos ao organismo e, assim, poderia intensificar a lipogênese via quebra de glicose, com a vagotomia, e a dieta HFD justifica-se por ser bastante estudada em modelos de obesidade e de transmissão de sinais via aferentes vagais. Nossos resultados, em conjunto, indicam que o *shift* metabólico provocado pela vagotomia é acentuado quando na presença de excesso de ingestão calórica. Estudos já identificaram previamente que a sensibilidade aferente vagal aos hormônios gastrointestinais (Colecistocinina-CCK, bombesina e serotonina) é significativamente reduzida em roedores cronicamente alimentados com dieta rica em gordura, por exemplo, em comparação com camundongos alimentados com baixo teor de gordura (COVASA; GRAHN; RITTER, 2000; COVASA; RITTER, 1998; DALY *et al.*, 2011; DE LARTIGUE *et al.*, 2012; DUCA; SAKAR; COVASA, 2013; SAVASTANO; COVASA, 2005; SWARTZ; DUCA; COVASA, 2010), sugerindo sensibilidade reduzida aos hormônios saciadores, explicando o nosso achado de que animais Sham alimentados com dieta HFD ou HC têm aumento no acúmulo de gordura hepática, comparados com os animais Sham da dieta padrão.

Associado ao estresse hipercalórico, a vagotomia exacerba ainda mais o acúmulo de gordura nos hepatócitos e os níveis de glicose sérica e, embora não tenhamos investigado a resistência à insulina, alguns estudos já demonstraram que a introdução de dietas rica em gordura provoca resistência à insulina (LACKEY *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2011; PAYOLLA *et al.*, 2016), o que pode propiciar, a longo prazo, o desenvolvimento de disfunção metabólica. Apesar da esteatose hepática aparente, os animais não aumentaram o ganho de peso nem a ingestão alimentar, como poderia ser esperado de acordo com o papel do nervo vago regulando a ingestão de alimentos, em nosso modelo.

Até aqui, está claro que o nervo vago participa da regulação de vias metabólicas importantes do fígado, pois a redução de transmissão de sinais causada pela vagotomia implica desajustes na expressão de proteínas das vias glicolítica/gliconeogênese e de biossíntese/degradação de ácidos graxos, tornando os animais propensos a desenvolverem disfunções metabólicas hepáticas. Embora estas alterações tenham sido mostradas apenas no ZT6, momento de maior desbalanço na expressão de genes de relógio hepático, as vias diferencialmente representadas apresentam, em sua maioria, ritmicidade circadiana em seus funcionamentos. Infelizmente, não conseguimos constatar nossa hipótese inicial através de experimentos respondendo como o nervo vago regula os genes do relógio hepático e como

isto interfere no metabolismo ou se a alteração do metabolismo hepático causada pela vagotomia que é a responsável pela alteração nos genes do relógio do fígado. Apesar disto, nós demonstramos uma associação interessante entre o sistema vagal e o relógio interno hepático, em que a vagotomia implica em cronodisrupção hepática não fótica e, em uma mesma janela, o animal apresenta prejudicado funcionamento de vias metabólicas, estando mais susceptível a desenvolver disfunção metabólica.

Assim, com os importantes dados adquiridos neste trabalho e fundamentados em pesquisas científicas na área, realizamos análises elementares que clarificam e dão suporte ao presente trabalho, fazendo associações pertinentes, respondendo possíveis lacunas e abrindo espaço a futuros campos de investigações nas áreas de cronobiologia, regulação neural autonômica e fígado, que poderão servir para embasar futuros experimentos para comprovar nossa hipótese inicial.

Nesse sentido, nos apoiamos no conhecimento de que o sistema do relógio circadiano e o metabolismo energético influenciam-se mutuamente por meio da coordenação rítmica dos fatores metabólicos e do metabolismo celular (OSTER, 2020). O fígado é o principal órgão gliconeogênico em mamíferos e participa, junto com vários outros órgãos, da manutenção dos níveis homeostáticos de glicose no sangue. O relógio circadiano sustenta os níveis fisiológicos de glicose no sangue ao sincronizar os mecanismos tecido-específicos ao metabolismo da glicose. Consequentemente, o relógio no NSQ controla os ritmos de alimentação/jejum, enquanto os relógios circadianos periféricos (fígado, células β pancreáticas, músculos esqueléticos) conduzem programas de expressão gênica coordenados temporalmente para manter os níveis fisiológicos de glicose no sangue (KALSBECK; LA FLEUR; FLIERS, 2014). Um estudo pioneiro indicando um papel para o oscilador do relógio hepático no metabolismo da glicose mostrou que a ablação de *Bmal1* em hepatócitos reduziu a expressão do GLUT2, levando a uma diminuição da captação de glicose pós-absortiva em camundongos mutantes (LAMIA; STORCH; WEITZ, 2008b). Após a entrada hepática, a glicose é fosforilada em G6P, que pode ser usada (por meio da glicólise ou via da hexose monofosfato) ou armazenada (síntese de glicogênio). Notavelmente, o relógio circadiano influencia todos esses processos (ECKEL-MAHAN; SASSONE-CORSI, 2013; PANDA, 2016). Por exemplo, a expressão gênica hepática de GCK, que controla tanto a glicólise quanto a síntese de glicogênio, é rítmica (LIU, YILIN *et al.*, 2019) e mostramos que a vagotomia aumenta sua expressão proteica no ZT6, comparado a animais Sham, desviando o sentido da via para quebra de glicose.

De importância para o nosso trabalho, vários estudos genéticos em modelos de camundongos estabeleceram o relógio circadiano como um regulador crítico do metabolismo lipídico (BUGGE *et al.*, 2012; GRIMALDI *et al.*, 2010). Descobriu-se que a ablação específica de *Rev-Erba*/ β nos hepatócitos aumenta os níveis plasmáticos de FFA, triglicerídeos e colesterol (BUGGE *et al.*, 2012; CHO *et al.*, 2012), bem como a ausência de *Rev-Erba* leva a esteatose hepática em camundongos C57/Bl6 (FENG *et al.*, 2011). A este respeito, em nossos dados mostramos que, do contrário, ocorre aumento na expressão de *Rev-Erba* no ZT6, momento em que há maior propensão à lipogênese *de novo* nos animais vagotomizados. Uma hipótese que pode ser levantada é a respeito do *feedback* negativo de *Rev-Erba* sobre o *Bmal1*, gene do relógio que altera homeostase de glicose (SUSSMAN *et al.*, 2019). Podemos sugerir que a redução na expressão de *Bmal1*, via *loop* negativo por *Rev-Erba*, encontrada em nosso modelo de vagotomia, poderia propiciar à desregulação de enzimas responsáveis pelo processo de glicólise, elevando substratos para a síntese de ácidos graxos, com efeitos que superam a regulação direta de *Rev-Erba* sobre alguns genes metabólicos controlados pelo relógio. Outra possível explicação para o acúmulo de gordura hepática em animais vagotomizados que apresentam níveis de expressão aumentados de *Rev-Erba* é que, a regulação por *Rev-Erba* pode se dá através da sua ligação direta a regiões de ligação ao DNA (mecanismo de regulação de genes do relógio) ou através de sua associação com fatores de transcrição tecido-específicos, como HNF6, HDAC3, NCOR. Já foi demonstrado que um fenótipo de fígado gorduroso de camundongos nocautes para HDAC3 hepático é mais pronunciado do que de camundongos nocautes para *Rev-Erba* (FENG *et al.*, 2011), bem como que a deleção de HNF6 em fígados de camundongos adultos leva à esteatose hepática em camundongos alimentados com dieta normal, sendo que muitos dos genes lipogênicos upregulados pela perda de HNF6 são também alvos do receptor circadiano REV-ERBA, e a ligação de REV-ERBA em sítios desses genes foi perdida quando HNF6 foi perdido no fígado (ZHANG *et al.*, 2016). Portanto, performar experimentos futuros para investigar níveis desses fatores de transcrição auxiliaria a compreender os mecanismos circadianos/metabólicos por trás do acúmulo de gordura no fígado em nosso modelo relacionados a genes como o *Rev-erba*.

Outra interpretação também pode ser levada em consideração ao apoiar-se um modelo nos quais fatores metabólicos também podem ser reguladores potentes de osciladores circadianos. Frequentemente, são chamadas de proteínas sensoras metabólicas, que percebem mudanças nos níveis de nutrientes, energia e estado redox e modificam os programas de expressão gênica, inclusive de genes de relógio (REINKE; ASHER, 2019). Evidências

mostram que a regulação metabólica é mais do que uma função de saída do relógio circadiano. O *feedback* dos metabólitos sistêmicos para os osciladores periféricos é uma marca registrada da regulação circadiana nos órgãos. Por exemplo, uma grande quantidade de nutrientes e hormônios circulantes, como glicose (HIROTA *et al.*, 2002), aminoácidos (OIKE *et al.*, 2011), insulina (DANG *et al.*, 2016), glucagon (PETRENKO; DIBNER, 2018), glicocorticoides (BALSALOBRE, AURÉLIO *et al.*, 2000) e muitos mais (BALSALOBRE, AURÉLIO; MARCACCI; SCHIBLER, 2000), possuem capacidade, ou seja, são elementos capazes de regular o relógio biológico.

Curiosamente, o momento da ingestão de alimentos tem fortes efeitos na função do relógio nos tecidos periféricos. Em situações extremas, como alimentação repetida em fase de repouso, pode haver desacoplamento entre relógio central e relógios periférico. Tal estado de dessincronia interna resultaria em um descompasso temporal dos circuitos reguladores do apetite e das redes de tecidos metabólicos que, em condições modernas de fácil acesso aos alimentos, alteram os *setpoints* metabólicos promovendo hiperfagia e obesidade. Nesse sentido, trabalhos têm mostrado que em roedores restaurar a coordenação da rede circadiana afeta positivamente a homeostase energética em condições obesogênicas (KOLBE *et al.*, 2019; WEST *et al.*, 2017). Com base nesses achados, é importante destacar que, ao introduzirmos uma dieta rica em carboidratos ou lipídeos aos animais vagotomizados, mesmo sem restrição de horário alimentar, houve uma perturbação maior ainda no sistema metabólico, com maior acúmulo de gordura hepática, sugerindo que, nestes animais com menor sinalização colinérgica e com relógio periférico hepático dessincronizado, o tipo de nutriente pode agravar ainda mais o fenótipo, seja por ser processado erroneamente em virtude das alterações em vias metabólicas, seja por alterar diretamente o relógio hepático.

Finalmente, é importante destacar que a homeostase energética é mantida por interações de sinalização entre os tecidos metabolicamente sensíveis, como o fígado, intestino, pâncreas e tecido adiposo. Também é importante mencionar que estes órgãos são supridos pela inervação vagal e que, nosso modelo de vagotomia cervical lateral, não é seletivo. Considerando tal ponto, é fundamental ter-se cautela na interpretação de mudanças de parâmetros fisiológicos específicos, como o hepático, seguidas de vagotomia, pois a secção do nervo não necessariamente resulta de cortes de fibras somente do fígado, mas também pode ser resultado de uma interação com mudanças que ocorrem *usptream* no duodeno ou pâncreas, simultaneamente denervados. Contudo, apesar dessa limitação técnica, é importante ressaltar que o fígado é um eixo mestre que regula processos metabólicos conflitantes, como glicólise/gliconeogênese e lipogênese/ β -oxidação de ácidos graxos (CORKEY; SHIRIHAI,

2012; PASCHOS *et al.*, 2012), cujos efeitos metabólicos mediados pelo nervo vago são claramente discutidos e provados na literatura, dando-nos mais confiança de representar nossos dados como sendo, pelo menos em parte, resultantes da influência do sistema vagal sobre o fígado.

Consideravelmente, esses resultados constituem apenas a ponta de um *iceberg* na regulação de processos circadianos fisiológicos hepáticos pelo sistema colinérgico mediado pelo nervo vago, contudo os mesmos já apontam para um avanço no que diz respeito a preencher as lacunas do conhecimento acerca da contribuição do nervo vago em perceber estímulos externos e cooperar para regular relógios biológicos periféricos dos órgãos que inerva possivelmente de modo independente da luz, como o fígado, contribuindo para a otimização das suas funções metabólicas.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados identificaram, até o momento, um papel do nervo vago na regulação de genes do relógio hepático e consequente sincronização deste relógio. É provável que esse circuito seja independente do relógio mestre do sistema nervoso central e da modulação da absorção de nutrientes, demonstrando também seu envolvimento no controle do metabolismo do fígado durante o dia. Demonstramos ainda que, no contexto de tônus vagal reduzido associado à desregulação do relógio biológico hepático, os animais tornam-se mais propensos ao acúmulo de gordura no fígado, sendo esse acúmulo exacerbado quando a vagotomia é associada a dietas ricas em carboidrato e gordura, sugerindo um fenótipo onde a deficiência colinérgica, sozinha ou acompanhada de alimentação com excesso calórico, pode ser um fator desencadeante de MAFLD.

REFERÊNCIAS

- ADAMOVIICH, Yaarit *et al.* Circadian Clocks and Feeding Time Regulate the Oscillations and Levels of Hepatic Triglycerides. *Cell Metabolism*, v. 19, n. 2, p. 319–330, fev. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413114000059>>.
- ASHER, Gad; SASSONE-CORSI, Paolo. Time for Food: The Intimate Interplay between Nutrition, Metabolism, and the Circadian Clock. *Cell*, v. 161, n. 1, p. 84–92, mar. 2015a. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415003025>>.
- ASHER, Gad; SASSONE-CORSI, Paolo. Time for Food: The Intimate Interplay between Nutrition, Metabolism, and the Circadian Clock. *Cell*, v. 161, n. 1, p. 84–92, mar. 2015b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415003025>>.
- ASHER, Gad; SCHIBLER, Ueli. Crosstalk between Components of Circadian and Metabolic Cycles in Mammals. *Cell Metabolism*, v. 13, n. 2, p. 125–137, fev. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413111000076>>.
- AVIRAM, Rona *et al.* Lipidomics Analyses Reveal Temporal and Spatial Lipid Organization and Uncover Daily Oscillations in Intracellular Organelles. *Molecular Cell*, v. 62, n. 4, p. 636–648, maio 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276516300521>>.
- AVRAM, Anca M. *et al.* Endogenous Circulating Ghrelin Does Not Mediate Growth Hormone Rhythmicity or Response to Fasting. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 90, n. 5, p. 2982–2987, maio 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2004-1785>>.
- BALSALOBRE, Aurélio *et al.* Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling. *Science*, v. 289, n. 5488, p. 2344–2347, 29 set. 2000. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.289.5488.2344>>.
- BALSALOBRE, Aurélio; MARCACCI, Lysiane; SCHIBLER, Ueli. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Current Biology*, v. 10, n. 20, p. 1291–1294, out. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982200007582>>.
- BANKIR, Lise *et al.* Glucagon revisited: Coordinated actions on the liver and kidney. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 146, p. 119–129, dez. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168822718314876>>.
- BARJA, Francisco; MATHISON, Ron. Sensory innervation of the rat portal vein and the hepatic artery. *Journal of the Autonomic Nervous System*, v. 10, n. 2, p. 117–125, abr. 1984. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016518388490050X>>.
- BASS, Joseph; TAKAHASHI, Joseph S. Circadian Integration of Metabolism and Energetics. *Science*, v. 330, n. 6009, p. 1349–1354, 3 dez. 2010. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1195027>>.
- BECKH, Karlheinz *et al.* Activation of Glycogenolysis by Stimulation of the Hepatic Nerves in Perfused Livers of Guinea Pig and Tree Shrew As Compared to Rat: Differences in the Mode of Action. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, v. 371, n. 1, p. 153–158, jan. 1990. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/bchm3.1990.371.1.153/html>>.

- BECKWITT, Colin H. *et al.* Liver ‘organ on a chip’. *Experimental Cell Research*, v. 363, n. 1, p. 15–25, fev. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001448271730678X>>.
- BELENKY, Michael A. *et al.* Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses. *Journal of Comparative Neurology*, 2003.
- BERSON, David M.; DUNN, Felice A.; TAKAO, Motoharu. Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, v. 295, n. 5557, p. 1070–1073, 8 fev. 2002. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1067262>>.
- BERTHOUD, H. R.; CARLSON, N. R.; POWLEY, T. L. Topography of efferent vagal innervation of the rat gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 260, n. 1, p. R200–R207, jan. 1991. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.1991.260.1.R200>>.
- BERTHOUD, Hans-Rudolf; NEUHUBER, Winfried L. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Autonomic Neuroscience*, v. 85, n. 1–3, p. 1–17, dez. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1566070200002150>>.
- BERTHOUD, Hans Rudolf. *Anatomy and function of sensory hepatic nerves. Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*. [S.l.: s.n.], 2004
- BERTHOUD HR, Neuhuber WL. Peripheral and central functional neuroanatomy of sensory and motor innervation of the portal-hepatic axis and biliary system. *Liver and nervous system*. [S.l.: s.n.], 1998. p. 17–33.
- BESSONE, Fernando; RAZORI, María Valeria; ROMA, Marcelo G. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 76, n. 1, p. 99–128, 20 jan. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-018-2947-0>>.
- BEYTEBIERE, Joshua R *et al.* Clock-controlled rhythmic transcription: is the clock enough and how does it work? *Transcription*, v. 10, n. 4–5, p. 212–221, 20 out. 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21541264.2019.1673636>>.
- BIANCHI, Giampaolo *et al.* Metabolic syndrome in liver transplantation: Relation to etiology and immunosuppression. *Liver Transplantation*, v. 14, n. 11, p. 1648–1654, nov. 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lt.21588>>.
- BISHEHSARI, Faraz *et al.* Circadian Rhythms in Gastrointestinal Health and Diseases. *Gastroenterology*, v. 151, n. 3, p. e1–e5, set. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508516348326>>.
- BISHEHSARI, Faraz; VOIGT, Robin M.; KESHAVARZIAN, Ali. Circadian rhythms and the gut microbiota: from the metabolic syndrome to cancer. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 16, n. 12, p. 731–739, 26 dez. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41574-020-00427-4>>.
- BJ UNDEM, D Weinreich. *Advances in vagal afferent neurobiology*. [S.l.: s.n.], 2005.
- BOLLINGER, Thomas *et al.* Circadian Clocks in Mouse and Human CD4+ T Cells. *PLoS ONE*, v. 6, n. 12, p. e29801, 28 dez. 2011. Disponível em:

<<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0029801>>.

BRAY, Molly S. *et al.* Disruption of the circadian clock within the cardiomyocyte influences myocardial contractile function, metabolism, and gene expression. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 294, n. 2, p. H1036–H1047, fev. 2008. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.01291.2007>>.

BRUNT, Elizabeth M. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology*, v. 53, n. 3, p. 810–820, mar. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.24127>>.

BUGGE, Anne *et al.* Rev-erb α and Rev-erb β coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes & Development*, v. 26, n. 7, p. 657–667, 1 abr. 2012. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.186858.112>>.

BUIJS, Ruud M.; ESCOBAR, Carolina; SWAAB, Dick F. The circadian system and the balance of the autonomic nervous system. [S.l.: s.n.], 2013. p. 173–191. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444534910000158>>.

BUIJS, Ruud M.; KALSBECK, Andries. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 2, n. 7, p. 521–526, jul. 2001a. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/35081582>>.

BUIJS, Ruud M.; KALSBECK, Andries. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 2, n. 7, p. 521–526, jul. 2001b. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/35081582>>.

BURCELIN, Remy; SERINO, Matteo; CABOU, Cendrine. A role for the gut-to-brain GLP-1-dependent axis in the control of metabolism. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 9, n. 6, p. 744–752, dez. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489209001362>>.

CAILOTTO, Cathy *et al.* Daily Rhythms in Metabolic Liver Enzymes and Plasma Glucose Require a Balance in the Autonomic Output to the Liver. *Endocrinology*, v. 149, n. 4, p. 1914–1925, abr. 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2007-0816>>.

CAILOTTO, Cathy *et al.* Effects of Nocturnal Light on (Clock) Gene Expression in Peripheral Organs: A Role for the Autonomic Innervation of the Liver. *PLoS ONE*, v. 4, n. 5, p. e5650, 21 maio 2009. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0005650>>.

CARATTI, Giorgio *et al.* REVERB α couples the circadian clock to hepatic glucocorticoid action. *Journal of Clinical Investigation*, v. 128, n. 10, p. 4454–4471, 4 set. 2018. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/96138>>.

CARREÑO, Flávia R.; SEELAENDER, Marília C. L. Liver denervation affects hepatocyte mitochondrial fatty acid transport capacity. *Cell Biochemistry and Function*, v. 22, n. 1, p. 9–17, jan. 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbf.1047>>.

CARVAS, João M. *et al.* Period2 gene mutant mice show compromised insulin-mediated endothelial nitric oxide release and altered glucose homeostasis. *Frontiers in Physiology*, v. 3, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2012.00337/abstract>>.

- CHAVAN, Sangeeta S.; PAVLOV, Valentin A.; TRACEY, Kevin J. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity*, v. 46, n. 6, p. 927–942, jun. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761317302364>>.
- CHO, Han *et al.* Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature*, v. 485, n. 7396, p. 123–127, 29 maio 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature11048>>.
- COLLE, Isabelle *et al.* Transplanted liver: Consequences of denervation for liver functions. *The Anatomical Record*, v. 280A, n. 1, p. 924–931, set. 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.a.20097>>.
- COOGAN, Andrew N.; WYSE, Cathy A. Neuroimmunology of the circadian clock. *Brain Research*, v. 1232, p. 104–112, set. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899308018131>>.
- CORKEY, Barbara E.; SHIRIHAI, Orian. Metabolic master regulators: sharing information among multiple systems. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 23, n. 12, p. 594–601, dez. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276012001348>>.
- COVASA, Mihai; GRAHN, Jennifer; RITTER, Robert C. High fat maintenance diet attenuates hindbrain neuronal response to CCK. *Regulatory Peptides*, v. 86, n. 1–3, p. 83–88, jan. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167011599000841>>.
- COVASA, Mihai; RITTER, Robert C. Rats maintained on high-fat diets exhibit reduced satiety in response to CCK and bombesin. *Peptides*, v. 19, n. 8, p. 1407–1415, jan. 1998. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196978198000965>>.
- COX, James E *et al.* Truncal and hepatic vagotomy reduce suppression of feeding by jejunal lipid infusions. *Physiology & Behavior*, v. 81, n. 1, p. 29–36, mar. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938404000022>>.
- CURTIS, Anne M. *et al.* Circadian control of innate immunity in macrophages by miR-155 targeting Bmal1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 23, p. 7231–7236, 9 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1501327112>>.
- DALY, Donna M. *et al.* Impaired intestinal afferent nerve satiety signalling and vagal afferent excitability in diet induced obesity in the mouse. *The Journal of Physiology*, v. 589, n. 11, p. 2857–2870, 1 jun. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2010.204594>>.
- DAMIOLA, Francesca *et al.* Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development*, v. 14, n. 23, p. 2950–2961, 1 dez. 2000. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.183500>>.
- DANG, Fabian *et al.* Insulin post-transcriptionally modulates Bmal1 protein to affect the hepatic circadian clock. *Nature Communications*, v. 7, n. 1, p. 12696, nov. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ncomms12696>>.

DE COUCK, Marijke; MRAVEC, Boris; GIDRON, Yori. You may need the vagus nerve to understand pathophysiology and to treat diseases. *Clinical Science*, v. 122, n. 7, p. 323–328, 1 abr. 2012. Disponível em: <<https://portlandpress.com/clinsci/article/122/7/323/69008/You-may-need-the-vagus-nerve-to-understand>>.

DE LARTIGUE, Guillaume *et al.* Leptin Resistance in Vagal Afferent Neurons Inhibits Cholecystokinin Signaling and Satiating in Diet Induced Obese Rats. *PLoS ONE*, v. 7, n. 3, p. e32967, 7 mar. 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0032967>>.

DE LARTIGUE, Guillaume. Role of the vagus nerve in the development and treatment of diet-induced obesity. *The Journal of Physiology*, v. 594, n. 20, p. 5791–5815, 15 out. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1113/JP271538>>.

DIBNER, Charna; SCHIBLER, Ueli; ALBRECHT, Urs. The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annual Review of Physiology*, v. 72, n. 1, p. 517–549, 17 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-physiol-021909-135821>>.

DIERICKX, Pieterjan; VAN LAAKE, Linda W; GEIJSEN, Niels. Circadian clocks: from stem cells to tissue homeostasis and regeneration. *EMBO reports*, v. 19, n. 1, p. 18–28, 19 jan. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embr.201745130>>.

DUCA, F. A.; SAKAR, Y.; COVASA, M. Combination of Obesity and High-Fat Feeding Diminishes Sensitivity to GLP-1R Agonist Exendin-4. *Diabetes*, v. 62, n. 7, p. 2410–2415, 1 jul. 2013. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db12-1204>>.

DURGAN, David J.; YOUNG, Martin E. The Cardiomyocyte Circadian Clock. *Circulation Research*, v. 106, n. 4, p. 647–658, 5 mar. 2010. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.109.209957>>.

ECKEL-MAHAN, Kristin; SASSONE-CORSI, Paolo. Metabolism and the Circadian Clock Converge. *Physiological Reviews*, v. 93, n. 1, p. 107–135, jan. 2013. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00016.2012>>.

ESLAM, Mohammed *et al.* A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *Journal of Hepatology*, v. 73, n. 1, p. 202–209, jul. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827820302014>>.

FAN, Yong; PEDERSEN, Oluf. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 55–71, 4 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-020-0433-9>>.

FENG, Dan *et al.* A Circadian Rhythm Orchestrated by Histone Deacetylase 3 Controls Hepatic Lipid Metabolism. *Science*, v. 331, n. 6022, p. 1315–1319, 11 mar. 2011. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1198125>>.

FERRELL, Jessica M.; CHIANG, John Y.L. *Circadian rhythms in liver metabolism and disease. Acta Pharmaceutica Sinica B*. [S.l.: s.n.], 2015

FOUAD, Yasser *et al.* What's in a name? Renaming 'NAFLD' to 'MAFLD'. *Liver International*, v. 40, n. 6, p. 1254–1261, 28 jun. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.14478>>.

FRIEDMAN, RW. Hepatic nerve function. In: JACOBY, WB.; SCHACHTER, D.; SHAFRITZ, DA (Org.). *Arias, IPH*. [S.l: s.n.], 1988. .

FRIEDMAN, Scott L. *et al.* Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature Medicine*, v. 24, n. 7, p. 908–922, 2 jul. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41591-018-0104-9>>.

FRIEDMAN, Scott L. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 4, p. 2247–2250, jan. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818309645>>.

FUKUDA, Y *et al.* Demonstration of Noradrenaline-Immunoreactive Nerve Fibres in the Liver. *Journal of International Medical Research*, v. 24, n. 6, p. 466–472, 25 nov. 1996. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/030006059602400603>>.

GARAULET, Marta; ORDOVÁS, Jose M. *Chronobiology and obesity*. [S.l: s.n.], 2013.

GIDRON, Yori *et al.* The Vagus Nerve Can Predict and Possibly Modulate Non-Communicable Chronic Diseases: Introducing a Neuroimmunological Paradigm to Public Health. *Journal of Clinical Medicine*, 2018.

GILL, Shubhroz; PANDA, Satchidananda. A Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits. *Cell Metabolism*, v. 22, n. 5, p. 789–798, nov. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413115004623>>.

GLASER, Shannon *et al.* Adrenergic receptor agonists prevent bile duct injury induced by adrenergic denervation by increased cAMP levels and activation of Akt. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 290, n. 4, p. G813–G826, abr. 2006. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.00306.2005>>.

GOEHLER, Lisa E. *et al.* Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. *Autonomic Neuroscience*, v. 85, n. 1–3, p. 49–59, dez. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1566070200002198>>.

GRIMALDI, Benedetto *et al.* PER2 Controls Lipid Metabolism by Direct Regulation of PPAR γ . *Cell Metabolism*, v. 12, n. 5, p. 509–520, nov. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413110003578>>.

HACKL, Martina Theresa *et al.* Brain leptin reduces liver lipids by increasing hepatic triglyceride secretion and lowering lipogenesis. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, p. 2717, 20 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41467-019-10684-1>>.

HAJIASGHARZADEH, Khalil; BARADARAN, Behzad. Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway and the Liver. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 7, n. 4, p. 507–513, 31 dez. 2017. Disponível em: <http://apb.tbzmed.ac.ir/Abstract/APB_19874_20171031125121>.

HAMMER, Niels *et al.* Human Vagus Nerve Branching in the Cervical Region. *PLOS ONE*, v. 10, n. 2, p. e0118006, 13 fev. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0118006>>.

HARRINGTON, Mary. Location, location, location: important for jet-lagged circadian loops. *Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 7, p. 2265–2267, 1 jul. 2010. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/43632>>.

HAUS, Erhard L.; SMOLENSKY, Michael H. Shift work and cancer risk: Potential mechanistic roles of circadian disruption, light at night, and sleep deprivation. *Sleep Medicine Reviews*, v. 17, n. 4, p. 273–284, ago. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087079212000986>>.

HÄUSSINGER, Dieter. Neural control of hepatic osmolytes and parenchymal cell hydration. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, v. 280A, n. 1, p. 893–900, set. 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.a.20094>>.

HAYASHI, Mitsuaki; SHIMBA, Shigeki; TEZUKA, Masakatsu. Characterization of the Molecular Clock in Mouse Peritoneal Macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, n. 4, p. 621–626, 2007. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/30/4/30_4_621/_article>.

HAYES, Matthew R. *et al.* The common hepatic branch of the vagus is not required to mediate the glycemic and food intake suppressive effects of glucagon-like-peptide-1. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 301, n. 5, p. R1479–R1485, nov. 2011. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00356.2011>>.

HIATT, JAMES L., Leslie P. Gartner. *TRATADO DE HISTOLOGIA*. [S.l.: s.n.], 2007.

HIROTA, Tsuyoshi *et al.* Glucose Down-regulates Per1 and Per2mRNA Levels and Induces Circadian Gene Expression in Cultured Rat-1 Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 46, p. 44244–44251, nov. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819717773>>.

HOPWOOD, Thomas W. *et al.* The circadian regulator BMAL1 programmes responses to parasitic worm infection via a dendritic cell clock. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 3782, 28 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-22021-5>>.

HORN, Charles C.; FRIEDMAN, Mark I. Separation of hepatic and gastrointestinal signals from the common “hepatic” branch of the vagus. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 287, n. 1, p. R120–R126, jul. 2004. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00673.2003>>.

HUSSE, Jana *et al.* The light-dark cycle controls peripheral rhythmicity in mice with a genetically ablated suprachiasmatic nucleus clock. *The FASEB Journal*, v. 28, n. 11, p. 4950–4960, 25 nov. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.14-256594>>.

I'MERYÜZ, Neşe *et al.* Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 273, n. 4, p. G920–G927, 1 out. 1997. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.1997.273.4.G920>>.

IZUMIDA, Yoshihiko *et al.* Glycogen shortage during fasting triggers liver–brain–adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization. *Nature Communications*, v. 4, n. 1, p. 2316, 16 out. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ncomms3316>>.

JANSSEN, P A; JAGENEAU, A H. A new series of potent analgesics: dextro 2:2-diphenyl-3-methyl-4-morpholino-butylpyrrolidine and related amides. I. Chemical structure and

pharmacological activity. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 9, n. 6, p. 381–400, jun. 1957. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13439527>>.

JENNE, Craig N; KUBES, Paul. Immune surveillance by the liver. *Nature Immunology*, v. 14, n. 10, p. 996–1006, 18 out. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ni.2691>>.

JENSEN, Kendal Jay; ALPINI, Gianfranco; GLASER, Shannon. Hepatic Nervous System and Neurobiology of the Liver. *Comprehensive Physiology*. [S.l.]: Wiley, 2013. p. 655–665. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c120018>>.

JORDAN, Sabine D.; LAMIA, Katja A. AMPK at the crossroads of circadian clocks and metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 366, n. 2, p. 163–169, fev. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720712003310>>.

KAELBERER, Melanie Maya *et al.* A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Science*, 2018.

KALSBECK, Andries; LA FLEUR, Susanne; FLIERS, Eric. Circadian control of glucose metabolism. *Molecular Metabolism*, v. 3, n. 4, p. 372–383, jul. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212877814000684>>.

KANDILIS, Apostolos N. *et al.* Liver innervation and hepatic function: new insights. *Journal of Surgical Research*, v. 194, n. 2, p. 511–519, abr. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480414011202>>.

KELLER, Maren *et al.* A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 50, p. 21407–21412, 15 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.0906361106>>.

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/10.1126/science.1226339>>.

KOLBE, Isa *et al.* Circadian clock network desynchrony promotes weight gain and alters glucose homeostasis in mice. *Molecular Metabolism*, v. 30, p. 140–151, dez. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212877819309159>>.

KOWALSKA, E.; BROWN, S. A. Peripheral Clocks: Keeping Up with the Master Clock. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, v. 72, n. 1, p. 301–305, jan. 2007. Disponível em: <<http://symposium.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/sqb.2007.72.014>>.

KREIER, Felix *et al.* Tracing from Fat Tissue, Liver, and Pancreas: A Neuroanatomical Framework for the Role of the Brain in Type 2 Diabetes. *Endocrinology*, v. 147, n. 3, p. 1140–1147, 1 mar. 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article/147/3/1140/2500607>>.

KWON, Eunjin *et al.* Optogenetic stimulation of the liver-projecting melanocortinergeric pathway promotes hepatic glucose production. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 6295, 8 dez. 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41467-020-20160-w>>.

LA FLEUR, Susanne E. *et al.* A Daily Rhythm in Glucose Tolerance. *Diabetes*, v. 50, n. 6, p. 1237–1243, jun. 2001. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/diabetes.50.6.1237>>.

- LACKEY, Denise E. *et al.* The role of dietary fat in obesity-induced insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 311, n. 6, p. E989–E997, 1 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00323.2016>>.
- LALLUKKA, S.; YKI-JÄRVINEN, H. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 30, n. 3, p. 385–395, jun. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521690X16300239>>.
- LAM, Tony K T; SCHWARTZ, Gary J; ROSSETTI, Luciano. Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nature Neuroscience*, v. 8, n. 5, p. 579–584, 26 maio 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn1456>>.
- LAMIA, K. A.; STORCH, K.-F.; WEITZ, C. J. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008a.
- LAMIA, K. A.; STORCH, K.-F.; WEITZ, C. J. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 39, p. 15172–15177, 30 set. 2008b. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0806717105>>.
- LARYEA, Marie *et al.* Metabolic syndrome in liver transplant recipients: Prevalence and association with major vascular events. *Liver Transplantation*, v. 13, n. 8, p. 1109–1114, ago. 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lt.21126>>.
- LAUTT, W. Wayne. Hepatic nerves: a review of their functions and effects. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 58, n. 2, p. 105–123, 1 fev. 1980. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/y80-019>>.
- LEE, Y. S. *et al.* Inflammation Is Necessary for Long-Term but Not Short-Term High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabetes*, v. 60, n. 10, p. 2474–2483, 1 out. 2011. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db11-0194>>.
- LIU, Hong-Fu *et al.* Distribution of the internal branch of the human accessory nerve. *Anatomical Science International*, v. 90, n. 3, p. 180–186, 18 jun. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12565-014-0244-z>>.
- LIU, Yilin *et al.* Effects of dynamic feeding low- and high-methionine diets on the variation of glucose and lipid metabolism-related genes in the liver of laying hens. *Poultry Science*, v. 98, n. 5, p. 2231–2240, maio 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032579119300744>>.
- LONGO, Miriam *et al.* Remodeling of Mitochondrial Plasticity: The Key Switch from NAFLD/NASH to HCC. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 8, p. 4173, 17 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/8/4173>>.
- LOWREY, Phillip L.; TAKAHASHI, Joseph S. Genetics of Circadian Rhythms in Mammalian Model Organisms. [S.l.: s.n.], 2011. p. 175–230. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123876904000064>>.
- LUCI, Carmelo *et al.* Chronic Inflammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Frontiers in Endocrinology*, v. 11, 14 dez. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2020.597648/full>>.

- MANTOVANI, Alessandro *et al.* Complications, morbidity and mortality of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, v. 111, p. 154170, out. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049520300342>>.
- MARCHEVA, Biliana *et al.* Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*, v. 466, n. 7306, p. 627–631, 18 jul. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature09253>>.
- MARIA A. PATESTAS, Leslie P. Gartner. *A Textbook of Neuroanatomy*. [S.l.: s.n.], 2016.
- MARQUES, Pedro E *et al.* Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. *Nature Protocols*, v. 10, n. 2, p. 258–268, 8 fev. 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nprot.2015.006>>.
- MATSUMURA, Takuro *et al.* Liver-specific dysregulation of clock-controlled output signal impairs energy metabolism in liver and muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 534, p. 415–421, jan. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X20321100>>.
- MAZZOCCOLI, Gianluigi; DE COSMO, Salvatore; MAZZA, Tommaso. The Biological Clock: A Pivotal Hub in Non-alcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. *Frontiers in Physiology*, v. 9, 15 mar. 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.00193/full>>.
- MCCARTHY, John J. *et al.* Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle. *Physiological Genomics*, v. 31, n. 1, p. 86–95, set. 2007. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physiolgenomics.00066.2007>>.
- MCCOMMIS, Kyle S; BUTLER, Andrew A. The Importance of Keeping Time in the Liver. *Endocrinology*, v. 162, n. 2, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article/doi/10.1210/endo/bqaa230/6035148>>.
- MCCUSKEY, Robert S. Anatomy of efferent hepatic nerves. *The Anatomical Record*, v. 280A, n. 1, p. 821–826, set. 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.a.20087>>.
- MELKONIAN, Erica A.; ASUKA, Edinen; SCHURY, Mark P. *Physiology, Gluconeogenesis*. [S.l.: s.n.], 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31082163>>.
- MOHAWK, Jennifer A.; GREEN, Carla B.; TAKAHASHI, Joseph S. Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. *Annual Review of Neuroscience*, 2012.
- MONKHOUSE, Stanley. *Cranial Nerves: Functional Anatomy*. [S.l.]: Cambridge University Press; 1st edition (January 1, 2005), 2005.
- MORO, Tatiana *et al.* Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males. *Journal of Translational Medicine*, v. 14, n. 1, p. 290, 13 dez. 2016. Disponível em: <<http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-016-1044-0>>.
- MORRIS, Christopher J. *et al.* Circadian misalignment increases cardiovascular disease risk factors in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 10, p. E1402–E1411, 8 mar. 2016. Disponível em:

<<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1516953113>>.

MUKHERJI, Atish *et al.* The circadian clock and liver function in health and disease. *Journal of Hepatology*, mar. 2019a. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827819301916>>.

MUKHERJI, Atish *et al.* The circadian clock and liver function in health and disease. *Journal of Hepatology*, v. 71, n. 1, p. 200–211, jul. 2019b. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827819301916>>.

NAIFEH, Jeffrey; DIMRI, Manjari; VARACALLO, Matthew. *Biochemistry, Aerobic Glycolysis*. [S.l: s.n.], 2021. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262043>>.

NAJJAR, Raymond P.; ZEITZER, Jamie M. Temporal integration of light flashes by the human circadian system. *Journal of Clinical Investigation*, v. 126, n. 3, p. 938–947, 8 fev. 2016. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/82306>>.

OBEN, Jude A.; DIEHL, Anna Mae. Sympathetic nervous system regulation of liver repair. *The Anatomical Record*, v. 280A, n. 1, p. 874–883, set. 2004. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.a.20081>>.

OIKE, Hideaki *et al.* Feeding Cues and Injected Nutrients Induce Acute Expression of Multiple Clock Genes in the Mouse Liver. *PLoS ONE*, v. 6, n. 8, p. e23709, 25 ago. 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0023709>>.

OSTER, Henrik. The interplay between stress, circadian clocks, and energy metabolism. *Journal of Endocrinology*, v. 247, n. 1, p. R13–R25, out. 2020. Disponível em:

<<https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/247/1/JOE-20-0124.xml>>.

PANDA, Satchidananda. Circadian physiology of metabolism. *Science*, v. 354, n. 6315, p. 1008–1015, 25 nov. 2016. Disponível em:

<<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aah4967>>.

PANDA, Satchidananda *et al.* Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell*, v. 109, n. 3, p. 307–320, maio 2002. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867402007225>>.

PASCHOS, Georgios K *et al.* Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component Arntl. *Nature Medicine*, v. 18, n. 12, p. 1768–1777, 11 dez. 2012. Disponível em:

<<http://www.nature.com/articles/nm.2979>>.

PAVLOV, V. A. *et al.* Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 13, p. 5219–5223, 28 mar. 2006. Disponível em:

<<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0600506103>>.

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, 21 dez. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrendo.2012.189>>.

PAVLOV, Valentin A; TRACEY, Kevin J. Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation. *Nature Neuroscience*, v. 20, n. 2, p. 156–166, 16 fev. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn.4477>>.

- PAYOLLA, Tanyara Baliani *et al.* High-fat diet during pregnancy and lactation impairs the cholinergic anti-inflammatory pathway in the liver and white adipose tissue of mouse offspring. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 422, p. 192–202, fev. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720715301593>>.
- PERITO, Emily R. *et al.* Hepatic steatosis after pediatric liver transplant. *Liver Transplantation*, v. 23, n. 7, p. 957–967, jul. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lt.24773>>.
- PETRENKO, V.; DIBNER, C. Cell-specific resetting of mouse islet cellular clocks by glucagon, glucagon-like peptide 1 and somatostatin. *Acta Physiologica*, v. 222, n. 4, p. e13021, abr. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apha.13021>>.
- PILORZ, Violetta; HELFRICH-FÖRSTER, Charlotte; OSTER, Henrik. The role of the circadian clock system in physiology. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, v. 470, n. 2, p. 227–239, 4 fev. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00424-017-2103-y>>.
- PROVENCIO, Ignacio *et al.* A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *The Journal of Neuroscience*, v. 20, n. 2, p. 600–605, 15 jan. 2000. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.20-02-00600.2000>>.
- PÜSCHEL, Gerhard P. Control of hepatocyte metabolism by sympathetic and parasympathetic hepatic nerves. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, v. 280A, n. 1, p. 854–867, set. 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.a.20091>>.
- QIAN, Jingyi *et al.* Sex differences in the circadian misalignment effects on energy regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 116, n. 47, p. 23806–23812, 19 nov. 2019. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1914003116>>.
- RAFF, Evan J. Diabetes Mellitus Predicts Occurrence of Cirrhosis and Hepatocellular Cancer in Alcoholic Liver and Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, v. 3, n. 1, p. 9–16, 15 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.xiahepublishing.com/ArticleFullText.aspx?sid=2&jid=1&id=10.14218%2FJCTH.2015.00001>>.
- REINKE, Hans; ASHER, Gad. *Crosstalk between metabolism and circadian clocks*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. [S.l: s.n.], 2019
- REPPERT, Steven M.; WEAVER, David R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, v. 418, n. 6901, p. 935–941, ago. 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature00965>>.
- 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*, 2014.
- ROENNEBERG, Till; MERROW, Martha. The Circadian Clock and Human Health. *Current Biology*, v. 26, n. 10, p. R432–R443, maio 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982216303335>>.
- ROSKAMS, Tania *et al.* Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver.

The Anatomical Record, v. 280A, n. 1, p. 910–923, set. 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.a.20096>>.

RUI, Liangyou. Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*. [S.l.]: Wiley, 2014. p. 177–197. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c130024>>.

RUSSELL, W. *et al.* Free Triiodothyronine Has a Distinct Circadian Rhythm That Is Delayed but Parallels Thyrotropin Levels. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 93, n. 6, p. 2300–2306, 1 jun. 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article/93/6/2300/2598837>>.

SAMUEL, Varman T.; SHULMAN, Gerald I. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metabolism*, v. 27, n. 1, p. 22–41, jan. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413117304874>>.

SAVASTANO, David M.; COVASA, Mihai. Adaptation to a High-Fat Diet Leads to Hyperphagia and Diminished Sensitivity to Cholecystokinin in Rats. *The Journal of Nutrition*, v. 135, n. 8, p. 1953–1959, 1 ago. 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article/135/8/1953/4663969>>.

SCHEER, F. A. J. L. *et al.* Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 11, p. 4453–4458, 17 mar. 2009. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0808180106>>.

SCHEER, F. A. J. L. *et al.* Physiological and anatomic evidence for regulation of the heart by suprachiasmatic nucleus in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 280, n. 3, p. H1391–H1399, 1 mar. 2001. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.2001.280.3.H1391>>.

SCHEIERMANN, Christoph; KUNISAKI, Yuya; FRENETTE, Paul S. Circadian control of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 3, p. 190–198, 8 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nri3386>>.

SCHWIMMER, Jeffrey B. *et al.* Heritability of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, v. 136, n. 5, p. 1585–1592, maio 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508509001528>>.

SEGAL, Julia P. *et al.* Circadian control of pain and neuroinflammation. *Journal of Neuroscience Research*, v. 96, n. 6, p. 1002–1020, jun. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.24150>>.

SHARMA, Anudeepa; DAVIS, Ajuah; SHEKHAWAT, Prem S. Hypoglycemia in the preterm neonate: etiopathogenesis, diagnosis, management and long-term outcomes. *Translational Pediatrics*, v. 6, n. 4, p. 335–348, out. 2017. Disponível em: <<http://tp.amegroups.com/article/view/16974/17488>>.

SHETTY, Akshay *et al.* Role of the Circadian Clock in the Metabolic Syndrome and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 63, n. 12, p. 3187–3206, 18 dez. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10620-018-5242-x>>.

SHIBATA, Shigenobu. Neural regulation of the hepatic Circadian rhythm. *The Anatomical Record*, v. 280A, n. 1, p. 901–909, set. 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.a.20095>>.

SHIMAZU, T. *Liver Innervation and the Neural Control of Hepatic Function*. [S.l.: s.n.], 1996.

SINTUREL, Flore *et al.* Diurnal Oscillations in Liver Mass and Cell Size Accompany Ribosome Assembly Cycles. *Cell*, v. 169, n. 4, p. 651- 663.e14, maio 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867417304282>>.

SMITH, Gordon I. *et al.* Insulin resistance drives hepatic de novo lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, v. 130, n. 3, p. 1453–1460, 4 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/134165>>.

SO, A. Y.-L. *et al.* Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 41, p. 17582–17587, 13 out. 2009. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0909733106>>.

STREBA, Letitia Adela Maria. Role of intrahepatic innervation in regulating the activity of liver cells. *World Journal of Hepatology*, v. 6, n. 3, p. 137, 2014. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v6/i3/137.htm>>.

SUL, Hei Sook *et al.* Regulation of the Fatty Acid Synthase Promoter by Insulin. *The Journal of Nutrition*, v. 130, n. 2, p. 315S-320S, 1 fev. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article/130/2/315S/4686377>>.

SUSSMAN, Whitney *et al.* BMAL1 controls glucose uptake through paired-homeodomain transcription factor 4 in differentiated Caco-2 cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 317, n. 3, p. C492–C501, 1 set. 2019. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00058.2019>>.

SWARTZ, T.D.; DUCA, F.A.; COVASA, M. Differential feeding behavior and neuronal responses to CCK in obesity-prone and -resistant rats. *Brain Research*, v. 1308, p. 79–86, jan. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899309022239>>.

SWINBURN, Boyd A *et al.* The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet*, v. 378, n. 9793, p. 804–814, ago. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673611608131>>.

TAHER, Jennifer; FARR, Sarah; ADELI, Khosrow. Central nervous system regulation of hepatic lipid and lipoprotein metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, v. 28, n. 1, p. 32–38, fev. 2017. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00041433-201702000-00006>>.

TAL, Yael; CHAPNIK, Nava; FROY, Oren. Non-obesogenic doses of fatty acids modulate the functionality of the circadian clock in the liver. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019.

TANOUE, Shintaro *et al.* Circadian Clocks in Antennal Neurons Are Necessary and Sufficient for Olfaction Rhythms in *Drosophila*. *Current Biology*, v. 14, n. 8, p. 638–649, abr. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982204002611>>.

TIMMERMANS, Jean-Pierre; GEERTS, Albert. Nerves in liver: Superfluous structures? A special issue of *The Anatomical Record* updating our views on hepatic innervation. *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist*, v. 282B, n. 1, p. 4–4, jan. 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.b.20049>>.

- TRACEY, Kevin J. The inflammatory reflex. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 853–859, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature01321>>.
- TROY, Stephanie *et al.* Intestinal Gluconeogenesis Is a Key Factor for Early Metabolic Changes after Gastric Bypass but Not after Gastric Lap-Band in Mice. *Cell Metabolism*, v. 8, n. 3, p. 201–211, set. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413108002490>>.
- TUREK, Fred W. *et al.* Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. *Science*, v. 308, n. 5724, p. 1043–1045, 13 maio 2005. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1108750>>.
- UNO, Kenji *et al.* Neuronal Pathway from the Liver Modulates Energy Expenditure and Systemic Insulin Sensitivity. *Science*, v. 312, n. 5780, p. 1656–1659, 16 jun. 2006. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1126010>>.
- VERNON, G.; BARANOVA, A.; YOUNOSSE, Z. M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 34, n. 3, p. 274–285, ago. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x>>.
- VOLLMAR, Brigitte; MENGER, Michael D. The Hepatic Microcirculation: Mechanistic Contributions and Therapeutic Targets in Liver Injury and Repair. *Physiological Reviews*, v. 89, n. 4, p. 1269–1339, out. 2009. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00027.2008>>.
- VYAS, Manav V. *et al.* Shift work and vascular events: Systematic review and meta-analysis. *BMJ (Online)*, 2012.
- WAISE, T. M.Zaved; DRANSE, Helen J.; LAM, Tony K.T. *The metabolic role of vagal afferent innervation. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. [S.l.: s.n.], 2018
- WALLACE, Martina; METALLO, Christian M. Tracing insights into de novo lipogenesis in liver and adipose tissues. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 108, p. 65–71, dez. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952118303021>>.
- WANG, Feng-Bin; YOUNG, Yao Kuang; KAO, Chih-Kuan. Abdominal vagal afferent pathways and their distributions of intraganglionic laminar endings in the rat duodenum. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 520, n. 5, p. 1098–1113, 1 abr. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.22812>>.
- WANG, Jingkui *et al.* Nuclear Proteomics Uncovers Diurnal Regulatory Landscapes in Mouse Liver. *Cell Metabolism*, v. 25, n. 1, p. 102–117, jan. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413116305344>>.
- WANG, Penny Y. T. *et al.* Upper intestinal lipids trigger a gut–brain–liver axis to regulate glucose production. *Nature*, v. 452, n. 7190, p. 1012–1016, 9 abr. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature06852>>.
- WANG, Wei *et al.* Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature*, v. 470, n. 7332, p. 110–114, 2 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature09766>>.
- WEIGL, Yuval *et al.* Peripheral circadian clocks-a conserved phenotype? *Chronobiology*

International, 2013.

WEST, Alexander C. *et al.* Misalignment with the external light environment drives metabolic and cardiac dysfunction. *Nature Communications*, v. 8, n. 1, p. 417, 12 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41467-017-00462-2>>.

WILLIAMS, Erika K. *et al.* Sensory Neurons that Detect Stretch and Nutrients in the Digestive System. *Cell*, v. 166, n. 1, p. 209–221, jun. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867416305591>>.

WONG, Chak-Lam; WAI, Man-Keung. Effects of aspirin and paracetamol on naloxone reversal of morphine-induced inhibition of gastrointestinal propulsion in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 73, n. 1, p. 11–19, jul. 1981. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014299981901400>>.

YAMADA, Tetsuya *et al.* Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: Neuronal involvement in food-intake regulation. *Cell Metabolism*, v. 3, n. 3, p. 223–229, mar. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413106000611>>.

YANG, Shutong *et al.* The Role of mPer2 Clock Gene in Glucocorticoid and Feeding Rhythms. *Endocrinology*, v. 150, n. 5, p. 2153–2160, 1 maio 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article/150/5/2153/2455856>>.

YI, C.-X. *et al.* Glucocorticoid Signaling in the Arcuate Nucleus Modulates Hepatic Insulin Sensitivity. *Diabetes*, v. 61, n. 2, p. 339–345, 1 fev. 2012. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db11-1239>>.

YOUNOSSI, Zobair M. *et al.* Changes in the Prevalence of the Most Common Causes of Chronic Liver Diseases in the United States From 1988 to 2008. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 9, n. 6, p. 524–530.e1, jun. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S154235651100317X>>.

YOUNOSSI, Zobair M. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, v. 64, n. 1, p. 73–84, jul. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.28431>>.

ZHANG, Yuxiang *et al.* HNF6 and Rev-erba integrate hepatic lipid metabolism by overlapping and distinct transcriptional mechanisms. *Genes & Development*, v. 30, n. 14, p. 1636–1644, 15 jul. 2016. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.281972.116>>.

ZHENG, Yan; LEY, Sylvia H.; HU, Frank B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 14, n. 2, p. 88–98, 8 fev. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrendo.2017.151>>.

ZHOU, Dexi *et al.* Evolving roles of circadian rhythms in liver homeostasis and pathology. *Oncotarget*, 2016a.

ZHOU, Dexi *et al.* Evolving roles of circadian rhythms in liver homeostasis and pathology. *Oncotarget*, v. 7, n. 8, p. 8625–8639, 23 fev. 2016b. Disponível em: <<https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.7065>>.

ZHOU, Jian-Ying *et al.* Simple Sodium Dodecyl Sulfate-Assisted Sample Preparation

Method for LC-MS-Based Proteomics Applications. *Analytical Chemistry*, v. 84, n. 6, p. 2862–2867, 20 mar. 2012. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac203394r>>.

ANEXO

Tabela. Sequências de primers utilizados nos ensaios de RT-PCR.

Nome da sequência	Sequência (5' – 3')
Mm Clock (forward)	AGAACTTGGCATTGAAGAGTCTC
Mm Clock (reverse)	GTCAGACCCAGAATCTTGGCT
Mm Rev-erb alpha (forward)	TACATTGGCTCTAGTGGCTCC
Mm Rev-erb alpha (reverse)	CAGTAGGTGATGGTGGGAAGTA
Mm Ror alpha (forward)	GTGGAGACAAATCGTCAGGAAT
Mm Ror alpha (reverse)	TGGTCCGATCAATCAAACAGTTC
Mm Cry 1 (forward)	CACTGGTTCCGAAAGGGACTC
Mm Cry 1 (reverse)	CTGAAGCAAAAATCGCCACCT
Mm Per1 (forward)	CGGATTGTCTATATTTCCGGAGCA
Mm Per1 (reverse)	TGGGCAGTCGAGATGGTGTA
Mm Per2 (forward)	GAAAGCTGTCACCACCATAGAA
Mm Per2 (reverse)	AACTCGCACTTCTTTTCAGG
Mm Bmal1 (forward)	TGACCCTCATGGAAGGTTAGAA
Mm Bmal1 (reverse)	GGACATTGCATTGCATGTTGG
Mm S26 (forward)	TCATTCCGGAACATTGTAGAAGCC
Mm S26 (reverse)	ACAGCTCACGCAATAATGCAG