

Jéssica Andrade da Silva

**RITMOS CIRCADIANOS EM RATOS
GANGLIONECTOMIZADOS E
PINEALECTOMIZADOS: UM ESTUDO MOLECULAR
E COMPORTAMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

Jéssica Andrade da Silva

**RITMOS CIRCADIANOS EM RATOS
GANGLIONECTOMIZADOS E
PINEALECTOMIZADOS: UM ESTUDO MOLECULAR
E COMPORTAMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

Versão corrigida

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

da Silva, Jéssica Andrade
Ritmos circadianos em ratos ganglionectomizados
e pinealectomizados: um estudo molecular e
comportamental / Jéssica Andrade da Silva;
orientador José Cipolla Neto. -- São Paulo, 2017.
160 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Melatonina. 2. Glândula pineal. 3. Ritmos
biológicos. 4. Genes relógio. 5. Núcleos
supraquiasmáticos. I. Cipolla Neto, José ,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jéssica Andrade da Silva

Título da Tese: Ritmos circadianos em animais ganglionectomizados: um estudo molecular e comportamental

Orientador(a): José Cipolla Neto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

.....

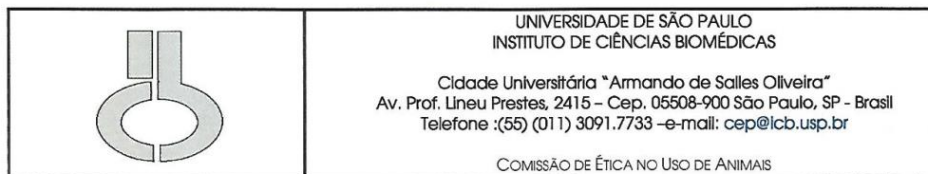
Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



Decl. CEUA.057/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 199/11/CEUA, datado de 24.01.12 e por solicitação do Prof. Dr. **José Cipolla Neto**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Jéssica Andrade da Silva** ao Projeto de Pesquisa "*O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: ações centrais e a regulação circadiana da função metabólica*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 11 de junho de 2013.



Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Melatonina e a regulação do metabolismo energético*", registrado sob o protocolo nº **86/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **12/09/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) José Cipolla Neto**

- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*

- Membros da Equipe: *Luciana Tocci Belpiede, Fernanda Gaspar do Amaral (Pesquisador colaborador), Daniella do Carmo Buonfiglio (Pós-doutorando), Raysa Cerqueira Silva (Iniciação Científica), Rafaela Panaiotta Parthinos (Iniciação Científica), Livia Clemente Motta Teixeira (Pós-graduando), Raphael Afonso de Matos (Pós-graduando), José Sinésio da Silva Junior (Pós-graduando), Caroline Mendes (Pós-graduando), Jéssica Andrade da Silva (Pós-graduando), Nityananda Portellada (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Melatonin and Energy metabolism: experimental studies*", protocol nº **86/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **9/12/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) José Cipolla Neto**

- Team members: *Luciana Tocci Belpiede, Fernanda Gaspar do Amaral (Collaborator Researcher), Daniella do Carmo Buonfiglio (Postdoctoral Researcher), Raysa Cerqueira Silva (Undergraduate Student), Rafaela Panaiotta Parthinos (Undergraduate Student), Livia Clemente Motta Teixeira (Graduate Student), Raphael Afonso de Matos (Graduate Student), José Sinésio da Silva Junior (Graduate Student), Caroline Mendes (Graduate Student), Jéssica Andrade da Silva (Graduate Student), Nityananda Portellada (Graduate Student).*

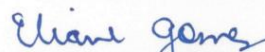
At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Wistar</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>180-250 g</i>	<i>400</i>
	<i>Wistar</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>250 g</i>	<i>370</i>
	<i>Goto-Kakizaki</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>250 g</i>	<i>480</i>
	<i>Wistar</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>12 meses/months</i>	<i>100</i>
	<i>Goto-Kakizaki</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>250 g</i>	<i>120</i>

São Paulo, 13 de setembro de 2016.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Dedico esse trabalho a todos que me acompanharam nessa longa jornada.

Principalmente aos meus pais, Antônio e Tânia, por serem meu porto seguro e fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Realizar esse trabalho foi, em teoria, uma jornada de 4 anos, mas que na realidade reflete uma vida inteira, acadêmica e pessoal. E por esse motivo não poderia deixar de agradecer a quem esteve ao meu lado nesse percurso cheio de vias tranquilas, mas também repleta de obstáculos, mostrando que a união faz a força e deixa tudo mais leve e menos amargo.

Assim sendo, não poderia deixar de agradecer a todos os professores, que desde muito cedo, não só despertaram o meu desejo pelo conhecimento, mas também me apoiaram e incentivaram a ir além do que era proposto e esperado, mesmo perante as atribuições da vida e imposições da sociedade. Sou muito grata à dedicação de cada um de vocês, obrigada!

Entre esses mestres que iluminaram meu caminho, dedico ao Prof. José Cipolla Neto, um agradecimento em especial. Há 10 anos, ele abriu as portas de seu laboratório, e assim como presenciei ao longo dessa década com muitas pessoas, depositou seu crédito numa recém universitária. Obrigada pela generosidade, paciência, puxões de orelha e, principalmente, pelos ensinamentos. Sou muito grata pela oportunidade de te ter como orientador ao longo desse processo de amadurecimento científico, muito obrigada!

Ciência não é feita por uma pessoa só, e sim por um coletivo de pensamentos, e por esse motivo agradeço todas as pessoas que conheci, tanto no laboratório, quanto pelos corredores do ICB. Dedico essas palavras em agradecimento a alguns deles:

Ju, obrigada não só pelas ajudas essenciais nos experimentos, mas principalmente pelo carinho, suporte e amizade! Sou grata e feliz por te ter por perto! Obrigada por tudo, sempre!

Dani C., obrigada pela parceria científica e troca constante. Nossas discussões científicas (nem sempre serenas) são sempre enriquecedoras! Obrigada também por ter se tornado uma amiga tão, tão querida. Qualquer coisa que eu diga aqui não será capaz de expressar a minha gratidão! Pode entrar Daniella, pisa menos!

Ph, meu querido, obrigada por ter se tornado mais do que um colega de laboratório, um amigo para toda a vida! Obrigada pelo carinho e confiança, pode contar comigo sempre!

Fê, obrigada por ter me ensinado, não apenas a ganglionectomia, mas muito sobre ciência! Obrigada também pelas palavras de conforto nos momentos em que eu esmorecia.

Si, obrigada pelas conversas e por ter ajudado em muitos momentos de sufoco. Obrigada!

Rayfa e Rafysa, digo, Rafa e Raysa obrigada por me fazerem lembrar as dores e as delícias que a iniciação científica pode trazer. Fico muito feliz em poder acompanhar o progresso de vocês e de fazer parte disso! Obrigada, meninas!

Carol, obrigada pelas conversas e risadas!

Lívia, obrigada por ser tão atenciosa, mesmo em um lugar distante! Não sei mais ler O Pequeno Príncipe sem lembrar de você.

Lia, obrigada pela colaboração científica e por ter esse coração enorme.

Rodrigo, serei sempre grata pelos seus ensinamentos.

Agradeço também ao Edu, à Paty, à Lu e à Lívia, que também fazem desse laboratório um lugar muito especial!

Prof. Solange de Castro Afeche, obrigada pelo conhecimento doado e a confiança na colaboração científica.

Mit, obrigada pelo apoio científico e espiritual, além dos asilos políticos! Obrigada por todo o carinho!

Angie, obrigada pelas risadas, força e por me ajudar a domar o El Temps!

Agradeço também ao Zé Maria e Paloma, pelo auxílio com toda a burocracia e papelada que a pós-graduação nos traz.

Sou grata à vida dos animais que utilizei ao longo deste trabalho. Obrigada!

Não poderia deixar de agradecer também, a elas, que compartilham comigo muito mais do que a escolha pela biologia. Agradeço à Kaká, praticamente a irmã que a vida não me deu, mas que eu escolhi! À Verô, pelas palavras de força e incentivo nos momentos de maior dificuldade! À Feffers, pela conversas mais filosóficas e políticas possíveis! Obrigada mulherada pelo amor, diversão, parceria, paciência e força, amo vocês!

Agradeço também a vocês, queridas amigas que a ETESP me proporcionou! É na diversidade que a gente se completa, e sou muito orgulhosa em ver as mulheres incríveis que vocês se tornaram! Agradeço à Fê por me ensinar, através do exemplo, a ter persistência; à Lara pelas risadas e doçura; à Cami pelo seu carinho e calma; à Lumi, grande xará, pelo carinho e agora pelo novo e ilustre integrante Lucca, que já amamos muito; à Má, que mesmo não estando mais presente fisicamente, me ensinou (e ensina) muito sobre força e garra, mesmo quando tudo parece ir mal; à Bia, pela parceria e conversas profundas; à Olívia, por acrescentar um pouco mais de fofura em nossas vidas e à Lih, por toda a amizade e cuidados. Amo muito vocês!

Devo muito também à minha família, por todo o apoio e palavras de incentivo. Nomear a todos aqui seria inviável (porque são MUITOS), mas sou eternamente grata de fazer parte dessa grande família! Em especial, gostaria de agradecer duas pessoas que retornaram à minha vida, e que têm feito a diferença. Tia Gordinha, obrigada pelo resgate de tantos sentimentos bons e pela sua força que me inspira a cada dia. Te amo! E Rodrigo, meu irmão, obrigada por trazer ao mundo o pequeno Nico, um verdadeiro bálsamo em nossas vidas e que já amo demais!

Por fim, e não menos importante (muito pelo contrário), gostaria de agradecer aos meus pais, Tânia e Antônio. O sentimento por vocês é tão grande, que expressá-lo corretamente através de palavras se torna impossível. Mas mesmo assim, insisto em dizer: MUITO obrigada! Agradeço o apoio, suporte, confiança, amor e dedicação. Obrigada pelas conversas, brincadeiras e discussões. Vocês são seres humanos incríveis e sou verdadeiramente orgulhosa por ser filha de vocês, e espero poder retribuir nem que seja um pouco todo o bem que fizeram e fazem a mim (e a todos o nosso redor). Obrigada por serem mais do que pais: somos parceiros! Vocês são minha principal fonte de inspiração. E esse momento é só mais um reflexo de toda a luta de vocês por todos esses anos! O meu amor por vocês é o mais profundo e sincero!

Agradeço a Deus por toda a luz e por fazer tudo isso possível, por ter me dado forças e sabedoria para enfrentar os obstáculos da melhor maneira possível.

Agradeço em especial,
ao CNPq (142299/2013-8) e à FAPESP (2014/50457-0),
pelo apoio financeiro.

Our society, in which reigns an eager desire for riches and luxury, does not understand the value of science. It does not realize that science is a most precious part of its moral patrimony. Nor does it take sufficient cognizance of the fact that science is at the base of all the progress that lightens the burden of life and lessens its suffering. Neither public powers nor private generosity actually accord to science and to scientists the support and the subsidies indispensable to fully effective work.

Marie Curie (1867-1934).

Mas, em tudo isso, é preciso não esquecer de uma coisa: ciência é coisa humilde, pois se sabe que a verdade é inatingível. Nunca lidamos com a coisa mesma, que sempre nos escapa. Aquilo que temos são apenas modelos provisórios, coisas que construímos por meio de símbolos, para entrar um pouco no desconhecido.

Rubem Alves (1933-2014)

RESUMO

Silva JA. Ritmos circadianos em ratos ganglionectomizados e pinealectomizados: um estudo molecular e comportamental. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

A melatonina (MEL), hormônio sintetizado pela glândula pineal apenas durante a noite, é um marcador circadiano interno. A sua produção depende de uma via neural temporizada pelos núcleos supraquiasmáticos (NSQs), que culmina na liberação rítmica noturna de noradrenalina na pineal, através de fibras simpáticas vindas do gânglio cervical superior (GCS). Sabendo que a pineal é essencialmente rítmica, foram estudados o oscilador molecular da glândula pineal de ratos após a remoção do GCS (GCSx) e seus efeitos nos osciladores moleculares do fígado e do NSQ. A GCSx alterou o oscilador molecular da pineal, além de reduzir e tornar arrítmica a via de síntese de MEL. O fígado, um oscilador periférico, manteve a robustez de seu oscilador, enquanto que o NSQ, oscilador central, teve sua expressão alterada, tanto no grupo GCSx, quanto após a remoção da pineal (PINX). O NSQ coordena os ritmos de atividade motora e temperatura, os quais exibiram alterações após a GCSx, sendo tais alterações ainda mais intensas após a PINX, com a redução da temperatura e aumento da atividade motora ao longo do tempo. Em conjunto, esses dados demonstram a complexidade do sistema circadiano e a importância da inervação simpática da pineal para direta ou indiretamente mantê-lo inalterado.

Palavras-chave: Melatonina. Glândula pineal. Ganglionectomia. Pinealectomia. Ritmos biológicos. Genes relógio. Temperatura. Circadiano. Diário.

ABSTRACT

Silva JA. Circadian rhythms in ganglionectomized and pinealectomized rats: a molecular and behavioural study. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Melatonin (MEL), a hormone synthesized by the pineal gland on the dark phase, is an internal circadian marker. Its production relies on a neural pathway timed by suprachiasmatic nuclei (SCN), which ends with the rhythmic release of norepinephrine by sympathetic fibers from the superior cervical ganglia (SCG). Since the pineal gland is essentially a rhythmic structure, the aim of this study was to evaluate the molecular clock of pineal gland after the superior cervical ganglia ablation (SCGx) and its effects on liver and SCN molecular clocks. The SCGs modified the molecular clock of pineal gland and, in addition, the MEL synthesis pathway was decreased and became arrhythmic. Besides that, the molecular clock of liver maintained its robustness, while the SCN's, the master clock, was changed in SCGx and after pineal removal. The SCN coordinates the rhythms of motor activity and temperature. Those are changed after SCGx, although the removal of pineal gland had changed them more, decreasing the temperature and increasing motor activity over the time. Together, these data show the complexity of the circadian system and the relevance of pineal sympathetic innervation to, direct or indirectly, maintain it unaltered.

Keywords: Melatonin. Pineal Gland. Ganglionectomy. Pinealectomy. Biological Rhythms. Clock genes. Temperature. Circadian. Daily.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Glândula pineal de ratos	25
Figura 2 – Via neural de regulação da produção de melatonina	26
Figura 3 - Regulação dos osciladores periféricos pelo oscilador central	31
Figura 4 - Modelo do oscilador molecular em mamíferos	31
Figura 5 - Desenho experimental: ganglionectomia de curto prazo (10 dias).....	36
Figura 6 – Desenho experimental: ganglionectomia de longo prazo (12 semanas)	37
Figura 7 – Desenho experimental: avaliação dos ritmos de atividade e temperatura	38
Figura 8 – Remoção bilateral do gânglio cervical superior	40
Figura 9 – Ptose palpebral	40
Figura 10 – Parâmetros rítmicos obtidos após análise Cosinor	47
Figura 11 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Bmal1</i> (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.....	49
Figura 12 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Bmal1</i> na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados analisado pelo método Cosinor.	50
Figura 13 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Clock</i> (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.....	51
Figura 14 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry1</i> (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.....	53
Figura 15 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry1</i> na glândula pineal de animais controles analisado pelo método Cosinor.....	54
Figura 16 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry2</i> (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.....	55
Figura 17 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry2</i> na glândula pineal de animais controles analisado pelo método Cosinor.....	56
Figura 18 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per1</i> (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.....	57
Figura 19 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per1</i> na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.....	58
Figura 20 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per2</i> (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.....	59
Figura 21 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per2</i> na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.....	60
Figura 22 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Reverba</i> (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.	61
Figura 23 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Reverba</i> na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.....	62
Figura 24 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Dbp</i> (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.....	64
Figura 25 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Dbp</i> na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.....	65
Figura 26 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Adra_{1b}</i> (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.....	67
Figura 27 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Adra_{1b}</i> na glândula pineal analisado pelo método Cosinor	68
Figura 28 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Adrb₁</i> (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.....	69

Figura 29 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Adrb1</i> na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.....	70
Figura 30 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Tph</i> (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.....	71
Figura 31 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Tph</i> na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.....	72
Figura 32 – Expressão gênica diurna e noturna do <i>Tph</i> na glândula pineal.....	72
Figura 33 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Aanat</i> (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.....	73
Figura 34 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Aanat</i> na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.....	74
Figura 35 – Expressão gênica diurna e noturna a <i>Aanat</i> na glândula pineal	75
Figura 36 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Asmt (Hiomt)</i> (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.	76
Figura 37 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Hiomt/Asmt</i> na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.....	77
Figura 38 – Expressão gênica diurna e noturna da <i>Asmt (Hiomt)</i> na glândula pineal.....	77
Figura 39 – Mapa de acrofases dos genes analisados nos grupos controle e ganglionectomizados na glândula pineal	79
Figura 40 – Resumo esquemático das alterações vistas na expressão do oscilador molecular da glândula pineal após a ganglionectomia.....	80
Figura 41 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Bmal1</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.	82
Figura 42 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Bmal1</i> no fígado analisado pelo método Cosinor.....	83
Figura 43 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Clock</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.	84
Figura 44 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Clock</i> no fígado analisado pelo método Cosinor.....	85
Figura 45 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry1</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.	86
Figura 46 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry1</i> no fígado analisado pelo método Cosinor.	87
Figura 47 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry2</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.	88
Figura 48 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry2</i> no fígado analisado pelo método Cosinor.	89
Figura 49 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per1</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.	90
Figura 50 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per1</i> no fígado analisado pelo método Corinor.	91
Figura 51 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per2</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.	92
Figura 52 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per2</i> no fígado analisado pelo método Cosinor.	93
Figura 53 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Reverba</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.	94
Figura 54 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Rev-erba</i> analisado pelo método Cosinor no fígado	95

Figura 55 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Dbp</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.	97
Figura 56 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Dbp</i> analisado pelo método Cosinor no fígado.	98
Figura 57 – Análise do momento do ponto de máxima (acrofase) dos genes analisados nos grupos controle e ganglionectomizados no fígado.	100
Figura 58 – Resumo esquemático das alterações vistas na expressão do oscilador molecular do fígado após a ganglionectomia e pinealectomia.	101
Figura 59 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Bmal1</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.	102
Figura 60 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Bmal1</i> analisado pelo método Cosinor no núcleo supraquiasmático.	103
Figura 61 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Clock</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.	104
Figura 62 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry1</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.	105
Figura 63 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry1</i> analisado pelo método Cosinor no núcleo supraquiasmático.	106
Figura 64 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry2</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.	107
Figura 65 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry2</i> analisado pelo método Cosinor no núcleo supraquiasmático.	109
Figura 66 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per1</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.	110
Figura 67 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per1</i> analisado pelo método Cosinor no núcleo supraquiasmático.	111
Figura 68 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per2</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.	112
Figura 69 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per2</i> analisado pelo método Cosinor no núcleo supraquiasmático.	113
Figura 70 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Rev-erba</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.	114
Figura 71 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Reverba</i> analisado pelo método Cosinor no núcleo supraquiasmático.	115
Figura 72 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Dbp</i> (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.	116
Figura 73 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Dbp</i> analisado pelo método Cosinor no núcleo supraquiasmático.	117
Figura 74 – Análise do momento do ponto de máxima (acrofase) dos genes analisados nos grupos controle e ganglionectomizados no núcleo supraquiasmático.	119
Figura 75 – Resumo esquemático das alterações vistas na expressão do oscilador molecular do núcleo supraquiasmático após a ganglionectomia e pinealectomia.	120
Figura 76 – Consumo alimentar dos animais após 12 semanas de protocolo	121
Figura 77 – Peso dos animais durante o protocolo de 12 semanas.	121
Figura 78 – Termograma e periodograma dos animais ao longo do protocolo	123
Figura 79 – Mesor do ritmo de temperatura	124
Figura 80 – Amplitude do ritmo de temperatura	125
Figura 81 – Valor médio da amplitude do ritmo de temperatura.	126
Figura 82 – Variação semanal de temperatura durante a fase de claro e a fase de escuro	127

Figura 83 – Acrofase do ritmo de temperatura	128
Figura 84 – Actograma e periodograma dos animais ao longo do protocolo.....	129
Figura 85 – Mesor do ritmo de atividade motora.....	130
Figura 86 – Valor médio do mesor do ritmo de atividade motora.....	131
Figura 87 – Amplitude do ritmo de atividade motora	132
Figura 88 – Valor médio da amplitude do ritmo de atividade motora.....	133
Figura 89 – Variação semanal de atividade motora durante a fase de claro e a fase de escuro	133
Figura 90 – Mapa de acrofase do ritmo de atividade.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT:** serotonina
- 5-HTP:** 5-hidroxitriptofano
- AANAT:** arilalquilamina-N-acetiltransferase
- AC:** adenilato ciclase
- ACC:** artéria carótida comum
- Adra_{1b}:** receptor adrenérgico α_{1b}
- Adr β_1 :** receptor adrenérgico β_1
- AMPC:** adenosina monofosfato cíclico
- AP-1:** proteína ativadora 1
- ASMT:** acetilserotonina-O-metiltransferase
- Bmal1:** “brain and muscle ARNT-like1”
- cDNA:** DNA complementar
- CEUA:**
- Clock:** “circadian locomotor output cycles kaput”
- CONCEA:**
- CRE:** “cAMP response element”
- CREB:** “cAMP response element binding”
- CRX:** “Cone-rod Homeobox”
- Cry:** “cryptochrome”
- CTL:** controle
- DAG:** diacilglicerol
- Dbp:** “D-box binding protein”
- DEPC:** dietilpirocarbonato
- DNA:** ácido desoxirribonucléico
- dNTP:** desoxirribonucleotídeo trifosfatado
- DTT:** ditioneitol
- EPM:** erro padrão da média
- FCS:** fásia cervical superior
- Fos-1:** “fos-related antigen 2”
- Gapdh:** gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GCS:** gânglio cervical superior
- GCSx:** remoção do gânglio cervical superior (ganglionectomia)

GM: glândulas mandibulares

h: horas

Hdac1: histona deacetilase 1

HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferase

Hprt1: hipoxantina fosforibosil transferase 1

ICB: Instituto de Ciências Biomédicas

IML: coluna intermédia lateral da medula espinhal

IP₃: trifosfato de inositol

LAAD: descarboxilase de L-aminoácido

MEH: músculo esterno-hióideo

NAS: N-acetilserotonina

NC: nervos conários

NSQ: núcleo supraquiasmático

NV: nervo vago

PCR: reação da polimerase em cadeia

Per: “period”

PINX: remoção da glândula pineal (pinelectomia)

PKA: proteína quinase A

PKC: proteína quinase C

Ppia: peptidil prolil isomerase A

PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo

RCI: ramos carotídeos internos

Rev-erba: “reverse strand of the c-erba gene”

RIM: região inter mandibular

RNA: ácido ribonucléico

Rpl37a: proteína ribossomal L37a

TPH: triptofano hidroxilase

VRH: via retino-hipotalâmica

ZT: “zeitgeber time”

VIP: polipeptídeo intestinal vasoativo

PACAP: peptídeo ativador da adenil-ciclase pituitária

RNAm: RNA mensageiro

Sp1: proteína de especificidade 1

ICER: “inducible cAMP early repressor”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Os ritmos	23
1.2 A glândula pineal e seu hormônio melatonina	25
1.3 Remoção do gânglio cervical superior	28
1.4 Ritmicidade e o oscilador molecular	30
1.5 Expressão de genes relógio na glândula pineal	33
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivos específicos	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Animais	36
4.2 Desenho experimental	36
4.3 Ganglionectomia	38
4.4 Pinealectomia	41
4.5 Extração de RNA	41
<i>4.5.1 Glândula pineal e núcleo supraquiasmático</i>	41
<i>4.5.2 Fígado</i>	42
4.6 Obtenção de cDNA	43
4.7 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	43
4.8 Análise da atividade e temperatura por telemetria	46
4.9 Análise Estatística	47
5 RESULTADOS	49
5.1 Perfil circadiano dos genes da alça primária do oscilador da glândula pineal	49
<i>5.1.1 Alça primária do oscilador – elementos positivos: Bmal1 e Clock na glândula pineal</i> .	49
<i>5.1.2 Alça primária – elementos negativos: Cry1, Cry2, Per1 e Per2 na glândula pineal</i>	52
5.2 Perfil circadiano do gene da alça secundária do oscilador da glândula pineal	60

5.2.1 <i>Rev-erba</i> na glândula pineal	61
5.3 Perfil circadiano de gene dependente do relógio na glândula pineal.....	63
5.3.1 <i>Dbp</i>	63
5.4 Perfil circadiano de genes envolvidos na produção de melatonina pineal	66
5.4.1 Receptores adrenérgicos: <i>Adra1b</i> e <i>Adrb</i> na glândula pineal.....	66
5.4.2 Triptofano hidroxilase (<i>Tph</i>)	70
5.4.3 Arilalquilamina- <i>N</i> -acetiltransferase (<i>Aanat</i>)	72
5.4.4 Acetil-serotonina <i>O</i> -metiltransferase / Hidroxindol- <i>O</i> -metil-transferase (<i>Asmt/Hiomt</i>) ..	75
5.5 Mapa de acrofases	78
5.6 Perfil circadiano dos genes da alça primária do oscilador no fígado: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia	80
5.6.1 Alça primária do oscilador – elementos positivos: <i>Bmal1</i> e <i>Clock</i> no fígado	81
5.6.2 Alça primária – elementos negativos: <i>Cry1</i> , <i>Cry2</i> , <i>Per1</i> e <i>Per2</i> no fígado	85
5.7 Perfil circadiano do gene da alça secundária do oscilador no fígado: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia	94
5.7.1 <i>Rev-erba</i> no fígado	94
5.8 Perfil circadiano de gene dependente do relógio no fígado: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia	96
5.8.1 <i>Dbp</i> no fígado	96
5.9 Mapa de acrofases no fígado: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia	99
5.10 Perfil circadiano dos genes da alça primária do oscilador no núcleo supraquiasmático: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia	101
5.10.1 Alça primária do oscilador – elementos positivos: <i>Bmal1</i> e <i>Clock</i> no núcleo supraquiasmático	101
5.11 Perfil circadiano do gene da alça secundária do oscilador no núcleo supraquiasmático: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia	114
5.11.1 <i>Rev-erba</i> no núcleo supraquiasmático.....	114
5.12 Perfil circadiano de gene dependente do relógio no núcleo supraquiasmático: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia	116
5.12.1 <i>Dbp</i> no núcleo supraquiasmático	116

5.13 Mapa de acrofases no núcleo supraquiasmático: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia	118
5.14 Análise de peso e consumo alimentar dos animais	120
5.15 Avaliação rítmica da temperatura	122
5.16 Avaliação rítmica da atividade motora	128
6 DISCUSSÃO.....	136
7 CONCLUSÃO.....	148
REFERÊNCIAS	149

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os ritmos

Os ritmos biológicos estão presentes em todos os níveis de organização dos seres vivos, uma adaptação evolutiva que parece vir desde os primórdios.

Os ciclos geofísicos estão presentes na Terra desde a sua constituição. E por bilhões de anos, ao girar ao redor de seu próprio eixo, há na Terra um regime cíclico de seus parâmetros geofísicos, como luz, temperatura e regime de marés. A matéria viva surgiu nesse ambiente rítmico, que exercendo uma importante pressão seletiva, contribuiu para a organização temporal dos seres vivos como vemos hoje (1). Antecipar tais alterações cíclicas permitiu aos seres vivos otimizar sua fisiologia e seus comportamentos garantindo-lhes a sobrevivência através da seleção natural.

Essa ideia de antecipação temporal dos seres vivos, demorou a ser aceita pelos cientistas e estudiosos. O primeiro relato escrito sobre observações acerca de ritmos biológicos é antigo e data de 400 a.C., quando Andróstenes descreveu a abertura e fechamento cíclicos da folha do tamarindeiro (*Tamarindus indica*). E apesar de a história da cronobiologia não se dar de forma linear, por muitos séculos, o pensamento vigente era de que tal expressão de ritmicidade nos organismos se dava apenas em resposta às oscilações do meio ambiente.

O primeiro a se opor publicamente a essa ideia foi Jean Jacques d'Ortois de Mairan, um astrônomo francês do século XVIII. Ao ver o movimento que sua planta fazia ao longo do dia, questionou-se sobre os efeitos causados pela ausência do estímulo ambiental de variação de luz. Sendo assim, de Mairan colocou a *Mimosa pudica* em uma caixa preta, a qual deixou na escuridão de seu porão. Mesmo na ausência de estímulos ambientais ele observou que a planta continuava se movimentando, e surpreendentemente, a abertura das folhas continuava coincidindo com o dia, enquanto que o fechamento coincidia com a noite. Como se, de alguma maneira, a planta fosse capaz de prever o ciclo ambiental mesmo sem ser exposta a ele. Ao expor sua teoria na Academia Real de Ciências em Paris, foi duramente criticado. Outros cientistas seguiram-se a ele, tentando provar que o ritmo biológico é gerado endogenamente. Complementando seu trabalho, em 1832, Augustin Pyrame de Candolle, um botânico suíço concluiu que essa mesma planta, quando privada de estímulos externos, abriam as suas folhas de 1 a 2 horas (h) mais cedo a cada dia. Apesar de não ser completamente compreendido na época, isso demonstrou que as plantas possuem um período endógeno, que apesar de próximo, não é igual ao do claro-escuro ambiental que é de 24 h. Compartilhando desse pensamento,

Darwin também acreditava que a movimentação das folhas das plantas era uma característica inerente ao organismo, e não apenas uma resposta a um estímulo ambiental (2,3).

Esse pensamento só ganhou força na primeira metade do século XX, com os experimentos feitos com abelhas por August Forel (físico suíço), Ingeborg Beling (etologista alemão) e pelo grupo dirigido por Karl Ritter von Frisch (etologista alemão) (2). E a partir de então, uma série de importantes estudos para a cronobiologia foram realizados, fundamentando ainda mais essa área da ciência que era considerada mística.

Entender, portanto, que os ritmos biológicos são gerados internamente é de fundamental importância para compreendê-los. E por ter se desenvolvido em um ambiente com flutuações constantes, esse oscilador interno passou a se ajustar a tais estímulos rítmicos do ambiente toda vez que eles acontecem. Esse ajuste a cada ciclo é o que mantém a sincronização dos osciladores biológicos do organismo com o meio ambiente (4). Os fatores ambientais capazes de ajustar essa ritmicidade endógena são chamados, na cronobiologia, de *zeitgebers*, proveniente do alemão, essa expressão significa “doador de tempo”. O *zeitgeber* mais potente na natureza é o ciclo de iluminação ambiental, porém outros eventos ambientais periódicos também são marcadores de tempo importantes, como os ciclos de temperatura, alimentação e outros (5).

Classificados de acordo com sua frequência, se o ritmo ocorre a cada 24 ± 4 h, ele é chamado circadiano. Os ultradianos são os ritmos com período menor que 20 h, enquanto que os infradianos são os que tem períodos maiores que 28 h (4). Em mamíferos o sistema circadiano é composto por três elementos: uma via de entrada (representada pela informação ambiental que chega ao sistema do indivíduo), um marcapasso central (que em mamíferos é o núcleo supraquiasmático (NSQ), sincronizado pela informação ambiental e que promove a sincronização de outras estruturas) e a via de saída (representada pela ritmicidade dos processos fisiológicos e comportamentais do organismo) (6).

A manutenção desse sistema se dá por uma relação estável entre o ritmo endógeno do organismo e os *zeitgebers*, e pela relação de fase mantida entre os diferentes processos biológicos rítmicos dos seres, o que garante a organização da ordem temporal interna do indivíduo. Alterações nessas relações de fase, podem levar à dessincronização, que quando mantida por muito tempo pode acarretar em desorganização da ordem temporal interna do organismo. Muitos trabalhos têm demonstrado que a sua manutenção é fundamental para a saúde e sua alteração pode levar a patologias. A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer -IARC*) considerou a ruptura do sistema circadiano um provável agente carcinogênico (7), dentre as evidências viu-se que lesar o NSQ aumentou a velocidade de crescimento tumoral em camundongos (8) e que alterações em genes

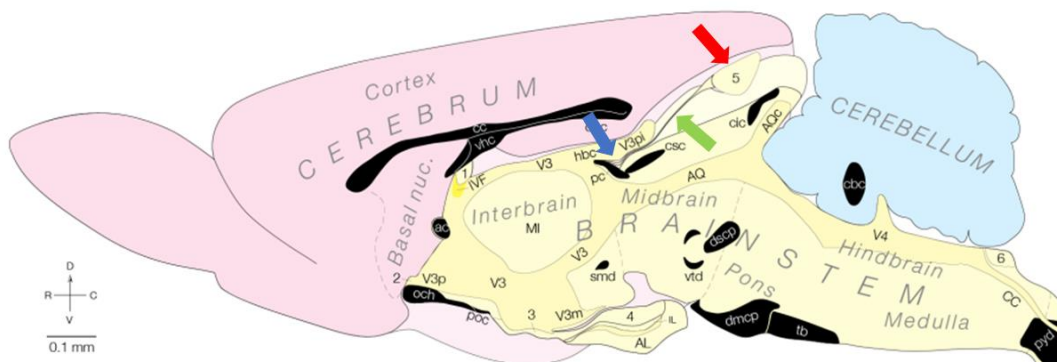
envolvidos na manutenção da ritmicidade impedem a supressão de tumores e modulam o risco de desenvolvimento do câncer (9–12). Além disso, a desregulação do sistema circadiano também parece estar relacionado com alterações do padrão alimentar e de parâmetros metabólicos que podem promover quadros de obesidade e diabetes (13–16), mesmo quando o indivíduo ainda está sendo gerado pela sua mãe (17).

Portanto, a presença de marcadores temporais, internos e externos, é fundamental para que não haja tal ruptura. Além da temperatura e do cortisol, outro importante marcador temporal interno é a melatonina, hormônio sintetizado durante a noite pela glândula pineal.

1.2 A glândula pineal e seu hormônio melatonina

O hormônio melatonina é produzido e secretado pela glândula pineal, presente em diversas classes de vertebrados. Sua localização varia de acordo com a espécie em questão. Em humanos, o órgão pineal se encontra na região central do encéfalo, especificamente no epitélamo, entre as comissuras habenulares e posterior (18), diferentemente do que é visto em roedores, nos quais é dividida em três partes: pineal profunda (entre as comissuras habenular e posterior, delimitando o recesso pineal), pedúnculo pineal e pineal superficial (19) (Figura 1), formando o complexo pineal.

Figura 1 – Glândula pineal de ratos



Representação gráfica de encéfalo de ratos, com ênfase na glândula pineal e suas porções: pineal superficial (seta vermelha), pedúnculo pineal (seta verde) e pineal profunda (seta azul). Adaptado de (20).

Apesar das diferenças encontradas na anatomia desse órgão, a constituição histológica da glândula pineal permanece a mesma nas diferentes espécies. Por volta de 80% de sua estrutura é composta por pinealócitos, mas também apresenta células gliais (das quais algumas são astrócitos) e tecido conjuntivo (18).

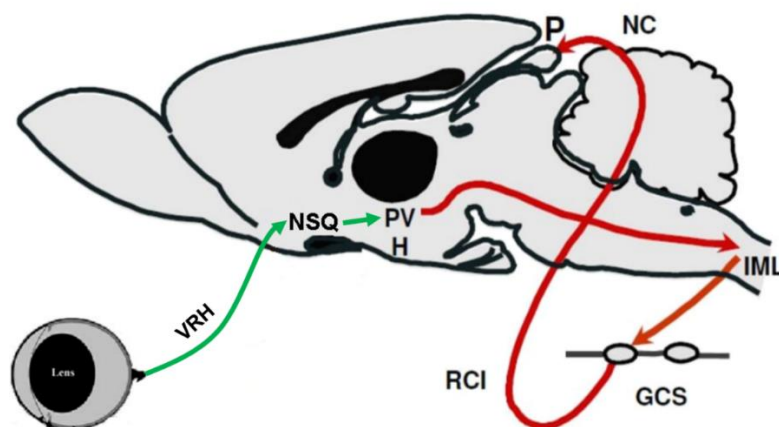
Interessantemente, a melatonina é um hormônio ubíquo, presente em quase todos os seres vivos de procariotos e eucariotos (21). Em mamíferos, a produção de melatonina é circadiana e se dá exclusivamente durante a noite (22–24), independentemente do ciclo de atividade e repouso da espécie, garantindo seu papel como sinalizador temporal interno.

Muitas são as funções atribuídas à melatonina, entre elas estão a capacidade de sequestrar radicais hidroxilas (25), ser um importante antioxidante natural (26), mobilizar mecanismos reparadores do DNA, regular processos biológicos como atividades de enzimas, o transporte de elétron na mitocôndria e processos de apoptose (21), ajustar o ciclo sono/vigília, auxiliar o sistema imunológico e, principalmente, participar da organização temporal de ritmos biológicos, sendo um importante sincronizador circadiano e sazonal (18,27).

A sincronização da produção de melatonina ao ciclo de iluminação ambiental depende de uma via neural que culmina na inervação simpática da glândula pineal (27,28). Essa via regulatória se inicia nos núcleos paraventriculares do hipotálamo (PVH), passando pela coluna intermédio lateral da medula espinhal (IML), de onde partem projeções pré-ganglionares para o gânglio cervical superior (GCS). A partir dessa estrutura, fibras simpáticas se projetam e, através do nervo carotídeo interno que, seguindo-se como nervo conário, inerva a glândula pineal liberando noradrenalina em seu interstício (27–30) (Figura 2), sendo esse o principal estímulo para a síntese de melatonina.

Essa via acima mencionada é temporizada pelo oscilador central, o NSQ, que está sincronizado, através de uma via retino-hipotalâmico, ao ciclo de iluminação ambiental, garantindo que a produção de melatonina se dê exclusivamente durante a noite (24,31).

Figura 2 – Via neural de regulação da produção de melatonina



Representação gráfica da via neural que regula a produção de melatonina através da liberação de noradrenalina no interstício glandular da pineal. Essa via neural é temporizada pelo núcleo supraquiasmático, que por sua vez está sincronizado pelo ciclo de iluminação ambiental graças às informações captadas pela retina e projetadas através

da via retino-hipotalâmica até o NSQ. (VRH): via retino-hipotalâmica; (NSQ): núcleo supraquiasmático; (PVH): núcleo paraventricular do hipotálamo; (IML): Coluna intermédio lateral da medula espinhal; (GCS): gânglios cervicais superiores; (RCI): ramos carotídeos internos; (NC): nervos conários; (P): glândula pineal. Modificado de (32).

Uma vez liberada no interstício glandular, a noradrenalina interage com seus receptores adrenérgicos. Quando ativado, o adrenoceptor β_1 promove, através da mediação da proteína G estimulatória, o aumento da quantidade intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) pela ativação da enzima adenilato ciclase (AC). Esse mecanismo é potencializado pela ativação do adrenoceptor α (α_{1B}). Quando isso acontece, sua proteína Gq ativa a fosfolipase C, que hidrolisa os fosfoinositídeos de membrana, produzindo diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP3). O IP3, ao se ligar com seus receptores do retículo endoplasmático, induz a liberação de cálcio dessas organelas, aumentando sua concentração intracelularmente. Esse aumento de cálcio é caracterizado por um pico seguido de um platô. O cálcio e o DAG são importantes, pois serão os responsáveis por ativar a proteína quinase C (PKC), potencializando o aumento de AMPC. O cálcio intracelular e o AMPC são de fundamental importância na síntese de melatonina, pois irão participar da ativação da arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT), enzima passo limitante da síntese de melatonina, como descrito posteriormente (33–37).

A produção de melatonina se dá através de uma via catalítica, na qual a primeira enzima é a triptofano hidroxilase (TPH). Essa enzima é responsável por hidroxilar o aminoácido triptofano, transformando-o em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Tal substância é então descarboxilada pela descarboxilase de L-aminoácido (LAAD), dando origem à serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). Essa por sua vez, sofre ação da AANAT, que transfere um grupamento acetil para a serotonina, tendo como produto final a N-acetilserotonina (NAS). Por fim, a NAS sofre ação da acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT, antigamente conhecida como HIOMT), que substitui o hidrogênio do grupamento hidroxila do carbono 5 do grupo indólico por um grupamento metil, formando a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (28).

A TPH apresenta ritmo circadiano de sua atividade na glândula pineal de ratos, apresentando maiores valores durante a noite. Esse aumento se deve, pelo aumento da transcrição e síntese protéica, assim como pela ativação da enzima por fosforilação. Ambos são induzidos pelo estímulo noradrenérgico que aumenta os níveis de AMPC e PKA, culminando na fosforilação da proteína CREB (*cAMP response element binding*), um fator de transcrição que promove a transcrição do gene que codifica a TPH ao se ligar ao sítio CRE (*cAMP response*

elements sites). Além disso, a fosforilação da enzima também pode ser realizada pela PKA, pela quinase dependente de cálcio e calmodulina (CAMK) e pela PKC (33,34,36,38,39).

A AANAT, responsável pela acetilação da serotonina, apresenta diferentes características de acordo com a espécie. Em ratos essa enzima está presente em diversos tecidos, como retina, intestino, fígado, pele, entre outros (33), permitindo a produção local de melatonina. A expressão do gene que codifica essa enzima apresenta variação rítmica, sendo maior durante a noite, assim como a atividade de seu correspondente proteico. Durante a noite, esse aumento chega a ser 150 vezes se comparado aos valores diurnos em ratos (33,40–42). Um dos mecanismos de ativação da transcrição do gene da *Aanat* se dá através da fosforilação do CREB pelo AMPc após estímulo adrenérgico. O pCREB se liga ao sítio CRE da região promotora da *Aanat*, estimulando sua transcrição (39,42). Além do pCREB, outros fatores de transcrição também podem se ligar à região promotora da *Aanat*, levando à sua transcrição, como a proteína ativadora 1 (*Activator Protein 1*: AP-1), o antígeno relacionado ao Fos 2 (*Fos-related antigen 2*: Fra2) e a *Cone-rod Homeobox* (CRX) (43).

Por fim, a última enzima da via de síntese, a ASMT/HIOMT. Seu nome foi recentemente modificado para ASMT, a fim de especificar sua ação sobre a metilação da NAS, convertendo-a em melatonina. Sua atividade proteica aumenta 1,5 vezes durante a noite, enquanto sua expressão gênica aumenta 2 vezes durante essa fase. O ritmo circadiano do RNAm da HIOMT/ASMT é dependente da estimulação adrenérgica, da ativação do receptor β -adrenérgico e do aumento na concentração de AMPc. Já a regulação do ritmo de atividade da enzima HIOMT/ASMT parece ser dependente de eventos pós-transcricionais, induzidos por neurotransmissores que aumentem o cálcio (44,45) não estando diretamente relacionada com a noradrenalina assim como sua transcrição gênica.

De acordo com o visto, na regulação de todas as enzimas da via, podemos encontrar um elo em comum: a importância da estimulação noradrenérgica cíclica na glândula pineal, permitindo a manutenção do perfil rítmico deste órgão e de sua produção hormonal.

1.3 Remoção do gânglio cervical superior

O gânglio cervical superior é o gânglio mais alto da cadeia paravertebral de onde parte a inervação simpática da cabeça e do pescoço (46), incluindo face e estruturas intracranianas, como a glândula pineal, através dos nervos carotídeos internos e externos. Suas ramificações inervam não só a pineal superficial, mas também a pineal profunda, e a ablação bilateral do gânglio leva a uma redução significativa da quantidade de fibras simpáticas nessas duas regiões

(47), e no pedúnculo pineal (48) por meses, reduzindo consideravelmente a liberação de noradrenalina no interstício da glândula.

Vários estudos demonstram que a remoção bilateral do gânglio cervical superior é capaz de modificar significativamente a via de síntese de melatonina e, conseqüentemente, a sua produção. A enzima AANAT sofre importantes alterações, não só em sua expressão gênica, mas também em sua atividade. De acordo com a literatura, após 10 dias de ganglionectomia, o ritmo circadiano de expressão gênica da *Aanat* em ratos foi abolido, assim como naqueles animais que sofreram lesão no núcleo supraquiasmático ou no núcleo paraventricular, demonstrando a importância dessa via neural para a manutenção de seu ritmo (49,50). O mesmo resultado foi visto na pineal superficial e profunda de hamsters (51). Seguindo a flutuação vista na expressão gênica, a atividade de AANAT e produção de melatonina também apresentaram abolição em seus ritmos, não havendo diferenças entre a produção diurna e noturna (49,51). Nesses trabalhos observou-se também um pequeno aumento da expressão gênica de *Aanat* durante o dia, o equivalente a aproximadamente 12% da produção noturna de animais intactos. Mesmo após 21 dias, a ganglionectomia continua tendo o seu efeito de abolir o ritmo e reduzir a atividade da AANAT durante a noite e aumentar levemente sua atividade durante o dia (52).

Ao serem tratados com isoproterenol (agonista β adrenérgico), os animais ganglionectomizados apresentaram reversão do quadro e aumento da expressão gênica de *Aanat* (50). Semelhantemente, glândulas pineais de ratos ganglionectomizados mantidas *in vitro* tiveram a atividade de AANAT aumentada após tratamento com noradrenalina quando comparadas com a atividade vista nesses animais (52), demonstrando que os efeitos observados de redução e abolição de ritmo, foram de fato devido à ausência de estimulação noradrenérgica. Não houve diferença nos resultados obtidos entre animais no qual houve a simulação da cirurgia e animais intactos (51,52).

A ganglionectomia não altera apenas a AANAT, mas também leva a alterações na última enzima da via, a ASMT/HIOMT. Viu-se que a remoção bilateral do gânglio cervical reduziu a atividade de ASMT/HIOMT e alterou o momento em que houve sua maior atividade. E assim como o visto para a AANAT, o tratamento com agonistas que ativam a sinalização noradrenérgica alterou esse quadro (53).

Esses dados em conjunto indicam que a presença de estimulação noradrenérgica de maneira rítmica, proveniente do gânglio cervical superior, é fundamental para a expressão rítmica circadiana e sazonal, além de garantir a quantidade de produção fisiológica de melatonina diária. A ausência da inervação simpática, através da ganglionectomia, altera radicalmente a síntese de melatonina, fazendo com que essa intervenção cirúrgica seja um bom

modelo para estudar o papel da inervação simpática no controle neural da produção de melatonina pela glândula pineal de mamíferos.

1.4 Ritmicidade e o oscilador molecular

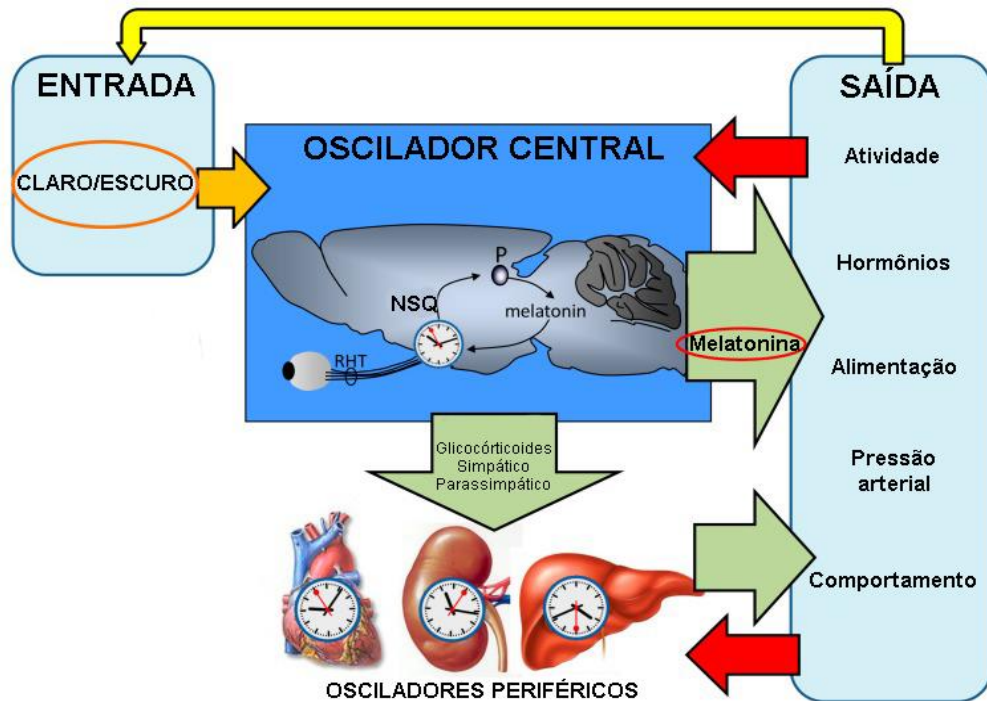
A síntese de melatonina apresenta variação circadiana e sazonal, com produção ocorrendo apenas durante a noite. Essa periodicidade é garantida através da temporização e sincronização de osciladores encontradas em todas as células. Uma vez temporizado e sincronizado pelos osciladores do NSQ, considerado como oscilador central em mamíferos, os osciladores da glândula pineal permanecem sincronizados com o ciclo de iluminação ambiental.

O núcleo supraquiasmático foi destacado como oscilador central pelo fato de que lesões bilaterais levaram à abolição de ritmos importantes, como atividade, temperatura, alimentação e ingestão hídrica (54–57), demonstrando que são regulados por essa estrutura. A princípio, pensava-se que os osciladores circadianos estavam presentes apenas em células do NSQ, mas hoje sabe-se que também podem ser encontrados em tecidos periférico, como o coração, rim e fígado, e que o núcleo supraquiasmático é um importante coordenador da expressão rítmica desses osciladores através de sinais neurais e humorais (22,23,58) (Figura 3), garantindo a ritmicidade dos processos fisiológicos em mamíferos.

A base molecular dos osciladores, centrais e periféricos, compreende um grupo de genes, que através de alças transcricionais e traducionais sustentam o sistema circadiano de expressão gênica. Em mamíferos, *Bmal1* (*Brain and muscle ARNT-like1*), *Clock* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*), *Rev-erba* (*Reverse strand of the c-erba gene*), *Per* (*Period*) *1, 2 e 3*, *Cry* (*Chryptochrome*) *1 e 2* foram considerados genes relógio. Além deles, o sistema circadiano também conta com os genes controlados pelo relógio como, por exemplo, o *Dbp* (*D-box binding protein*) (59), para a sua manutenção.

Portanto, para que a ritmicidade seja mantida esses genes estão envolvidos em basicamente duas alças de retroalimentação (Figura 4).

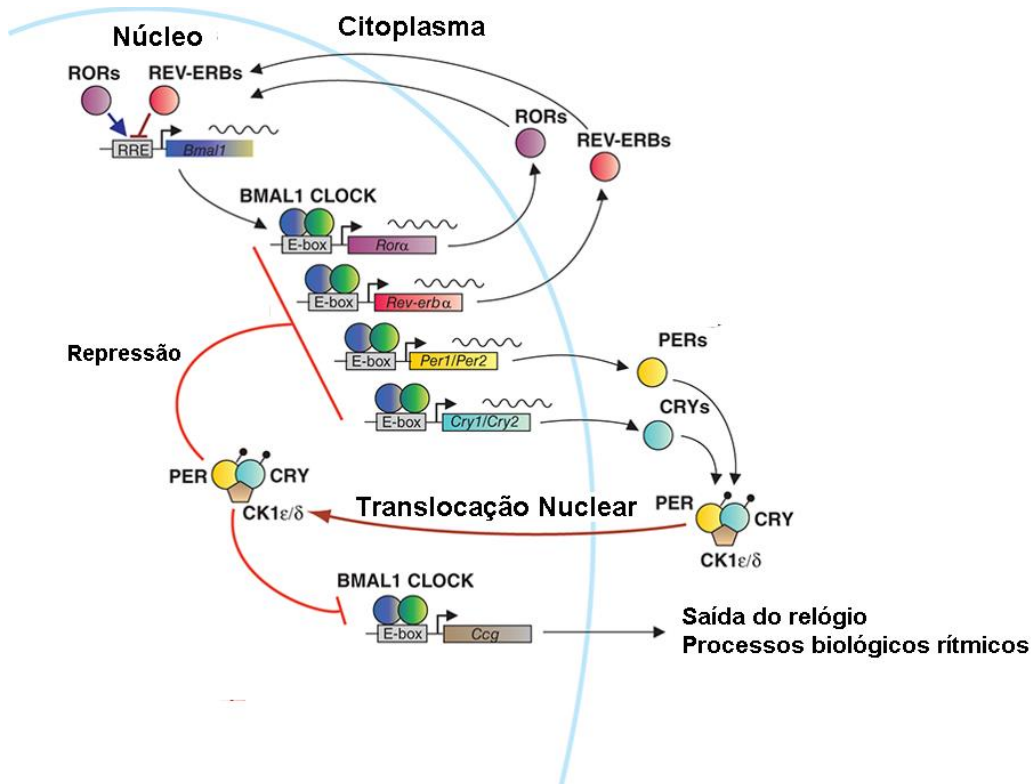
Figura 3 - Regulação dos osciladores periféricos pelo oscilador central



Através de sinais neurais e humorais, o núcleo supraquiasmático, considerado oscilador central, é capaz de, juntamente com outros fatores, coordenar a expressão rítmica dos osciladores periféricos, como coração, rins e fígado, garantindo a sincronização e a manutenção da ritmicidade de processos fisiológicos. A via de saída também contribui para a regulação da expressão rítmica dos osciladores.

Modificado de (6)

Figura 4 - Modelo do oscilador molecular em mamíferos



Alças primária e secundária do oscilador molecular de mamíferos. Na alça primária, o complexo CLOCK:BMAL1 ativa a transcrição dos genes *Per* e *Cry*, que quando retornam ao núcleo regulam a sua própria expressão através

da inibição da ação de CLOCK:BMAL1. Na alça secundária há a regulação da expressão de *Bmal1*, através da ação de ROR que ativa sua transcrição e REVERB que a inibe. O correto funcionamento dessa maquinaria garante a expressão de genes controlados pelo relógio, que sustentam a ritmicidade de processos biológicos. Modificado de (60).

A alça primária envolve os genes *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* e *Cry2*. Primeiramente, os genes *Clock* e *Bmal1* são transcritos e traduzidos, no citoplasma ocorre a heterodimerização das proteínas CLOCK e BMAL1, formando o complexo CLOCK/BMAL1 que migra para o núcleo e pode se ligar à região ativadora de transcrição de diversos genes alvos. Na alça primária esse complexo se liga às regiões *E-boxes* (sequências específicas de DNA encontrados na região promotora) dos genes *Pers* e *Crys* ativando sua transcrição, o que culmina na tradução dessas proteínas. Quando as proteínas PER1 e PER2 se acumulam no citoplasma formam um complexo negativador juntamente com proteínas CRY1 e CRY2, que entrando no núcleo suprime a atividade do complexo CLOCK/BMAL1, impedindo assim sua ação indutora da transcrição dos genes relógio. Essa supressão da atividade ocorreria através de dois mecanismos distintos. No primeiro, ocorre a inibição, propriamente dita, da atividade do complexo CLOCK:BMAL1, através da ligação de CRY1 no heterodímero CLOCK:BMAL1 (repressão tipo bloqueio) que ocorre no início da fase circadiana (ZT0). No segundo modelo proposto, a repressão seria através da dissociação do complexo CLOCK:BMAL1 do sítio de transcrição realizada pela ligação do complexo PER2:CRY1, formando um novo complexo transiente PER2:CRY1:CLOCK:BMAL1 que ocorreria durante a noite (Figura 4) (61).

Para o funcionamento da alça secundária, há o envolvimento dos genes *Bmal1*, *Rev-erba/β* e *Rora/β*. O complexo ativador CLOCK/BMAL1 também pode promover a transcrição dos genes *Rev-erba/β* e *Rora/β*. Após transcrição e tradução, os ROR α/β migram para o núcleo e agem ativando a transcrição do gene *Bmal1*, diferentemente de REV-ERB α/β que migram para o núcleo e atuam inibindo a transcrição do gene. Dessa forma essas proteínas são reguladoras da expressão de *Bmal1*, realizando a sintonia fina desse oscilador intracelular (22,23,58,62).

Outras proteínas secundárias, que são controladas por genes do relógio, aumentam a complexidade do *feedback* e aumentam a amplitude do ritmo, como a proteína DBP (proteína ligante do elemento D albumina). O complexo BMAL1/CLOCK aumenta a transcrição do gene *Dbp* através de presença de um E-box no seu segundo íntron mostrando, portanto, que o gene *Dbp* é controlado pelos genes do relógio (58).

Como já mencionado, esse oscilador molecular não está presente apenas no NSQ, mas também está em praticamente todas as regiões neurais centrais estudadas, além de praticamente todas as regiões periféricas, como fígado, coração, rins, músculos, tecido adiposo, entre outros

(23,63–65). Os genes relógio, presentes na glândula pineal, são responsáveis pelo metabolismo glandular que leva à síntese de melatonina (66).

1.5 Expressão de genes relógio na glândula pineal

Em glândula pineal de roedores, já foi vista a presença da expressão dos genes relógio que não só garantem a função rítmica da glândula, mas também agem diretamente sobre a via de síntese de melatonina, controlando por exemplo, o ciclo de atividade da AANAT (59,65–68).

A sinalização noradrenérgica garante a correta síntese de melatonina agindo sobre as enzimas da via, mas também garante o perfil rítmico da glândula pineal por meio da regulação dos genes relógio lá presentes. Simonneaux et al. (2004)(59), viram, em ratos Wistar, a variação circadiana dos genes *Bmall*, *Per1*, *Per3*, *Cry1* e *Cry2* com adequada relação de fase entre eles. Ao serem tratados com isoproterenol (agonista β adrenérgico), viu-se o aumento da expressão dos genes *Per1* e *Cry2*, sugerindo que o perfil rítmico desses genes pode ser disparado pela noradrenalina. Corroborando esse dado, a injeção de propranolol (antagonista inespecífico receptores β adrenérgicos) durante a fase de claro por 3 h reduziu a expressão de *Per1* e *Cry2*, enquanto que os genes *Bmall* e *Rev-erba* não foram afetados (67).

Experimentos *in vitro*, também demonstram a influência de noradrenalina sobre a expressão dos genes relógio na glândula pineal. Fukuhara, Dirden e Tosini (2002) (69) viram que o tratamento das glândulas com noradrenalina após o quinto dia de cultura aumentou a expressão de *Per1*, mas não de *Per2*. Esse efeito também foi visto quando astrócitos medulares de ratos foram tratados com essa catecolamina, havendo o aumento de *Per1*, mas não de *Per2* e *Clock* (70), demonstrando que os genes relógio respondem diferentemente à estimulação noradrenérgica.

Todos esses estudos *in vitro* foram feitos com estimulação aguda da sinalização noradrenérgica. Quando tais genes foram avaliados circadianamente, de fato viu-se que a estimulação aguda com noradrenalina não alterou as expressões de *Bmall*, *Per2*, *Cry2* e *Rev-erba*, de modo que esses se mostraram arrítmicos. Porém, quando essas glândulas foram mantidas em cultura com tratamento temporizado de noradrenalina, mimetizando o ciclo que ocorreria no animal *in vivo*, viu-se a manutenção do ritmo e da fase de expressão desses genes relógio (71), demonstrando que pelo menos *in vitro* a ausência de sinalização adrenérgica altera o sistema circadiano da glândula pineal, além da própria síntese de melatonina que também fica alterada.

2 JUSTIFICATIVA

Esses trabalhos em conjunto demonstram que o oscilador molecular está presente na glândula pineal e é essencial para sua fisiologia e função. E apesar de estar clara a importância da noradrenalina nesse processo, ainda não está definida a maneira que ela age modulando a expressão dos genes relógio de forma global *in vivo*, portanto, uma análise do funcionamento do oscilador molecular da glândula pineal se torna imprescindível. Na literatura há dados que correlacionam o rompimento do sistema circadiano com alterações metabólicas em diferentes tecidos periféricos (72). Sendo a melatonina um hormônio ubíquo e com ação cronobiótica, qualquer alteração no órgão produtor desse hormônio poderá se refletir em alguma alteração no resto do organismo, principalmente alterações em outros osciladores, como o núcleo supraquiasmático, que apresenta receptores para melatonina (73). Além disso, modificações no oscilador do núcleo supraquiasmático pode alterar a ritmicidade de outros territórios no organismo, já que é responsável por coordenar a ritmicidade de osciladores periféricos e por controlar processos biológicos rítmicos fundamentais, como ciclo de atividade/repouso e temperatura. Sendo assim, este trabalho se torna essencial para melhorar a compreensão de se e como a ausência de sinalização noradrenérgica na glândula pineal pode afetar o sistema circadiano da própria pineal e de outras estruturas centrais e periféricas.

3 OBJETIVOS

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo principal estudar a influência da sinalização noradrenérgica sobre o funcionamento do oscilador intracelular da glândula pineal através da ganglionectomia e suas influências na fisiologia deste órgão, além de elucidar as relações entre este oscilador periférico localizado centralmente e outros no organismo, como o núcleo supraquiasmático e o fígado.

3.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar a importância da inervação simpática para o oscilador molecular da glândula pineal, através da análise gênica dos elementos envolvidos neste oscilador após a ganglionectomia de curto (10 dias) e longo prazo (12 semanas) do animal;
- b) Avaliar a importância da inervação simpática para a fisiologia da glândula pineal, através da análise gênica circadiana de elementos envolvidos na síntese de melatonina após a ganglionectomia de curta e longo prazo do animal;
- c) Avaliar os efeitos da ausência da sinalização noradrenérgica na glândula pineal, a curto e longo prazo, além dos efeitos da pinealectomia à longo prazo sobre o oscilador molecular do núcleo supraquiasmático;
- d) Avaliar os efeitos da ausência da sinalização noradrenérgica na glândula pineal, a curto e longo prazo, além dos efeitos da pinealectomia à longo prazo, sobre o oscilador molecular de um oscilador periférico, o fígado;
- e) Avaliar possíveis alterações a longo prazo nos ritmos de atividade e temperatura de animais ganglionectomizados e pinealectomizados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

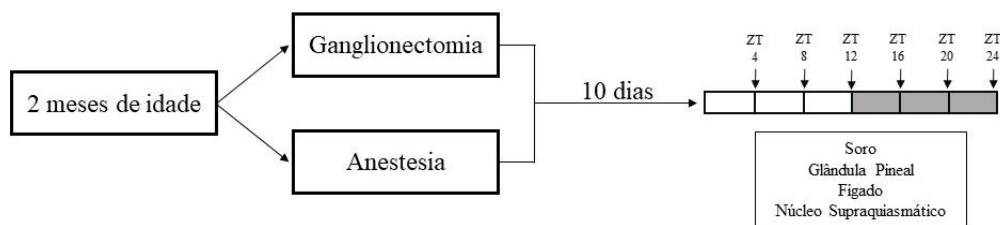
Os animais utilizados para experimentação foram ratos albinos da linhagem Wistar (250 - 300 g) provenientes do Biotério de Produção de Ratos (ICB, Rede USP de Biotérios), mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia e utilizados de acordo com certificados aprovados pela CEUA ICB (números 199/11/CEUA e 86/2016) e normas estabelecidas pelo CONCEA, sob ciclo claro/escuro de 12 / 12 h e temperatura regulada (23 ± 2 °C). Durante todo o período experimental, os animais tiveram acesso a água e comida à vontade.

4.2 Desenho experimental

Para a avaliação da influência da inervação simpática na regulação do oscilador intracelular da glândula pineal e possíveis alterações fisiológicas, foram realizados três experimentos.

No primeiro deles (Figura 5), os animais foram divididos em dois grupos: ganglionectomizados e controles. A eutanásia circadiana por decapitação ocorreu 10 dias após a intervenção cirúrgica, tempo necessário para que a glândula pineal sofresse completa desnervação simpática (51,74) e passasse a ser considerada, do ponto de vista da inervação simpática, uma estrutura exclusivamente pós sináptica. Durante a eutanásia foram coletados soro, glândula pineal, fígado e núcleo supraquiasmático.

Figura 5 - Desenho experimental: ganglionectomia de curto prazo (10 dias)



Ao atingirem dois meses de idade os animais foram divididos em dois grupos. O grupo ganglionectomia (GCSx) foi submetido à remoção bilateral do gânglio cervical superior, enquanto que o grupo controle foi submetido apenas à anestesia na mesma dosagem que os animais operados. Após 10 dias do procedimento cirúrgico, houve a eutanásia circadiana por decapitação em 6 pontos ao longo das 24 h. Esses pontos correspondem aos ZTs 4, 8, 12, 16, 20 e 24. Sendo que ZT 0 representa o início da fase de claro; ZT 4 representa 4 h após a transição da fase de escuro para a fase de claro; ZT 12 representa o início da fase de escuro; ZT16 corresponde a 4 h após a transição da fase de claro para a fase de escuro, e assim por diante). Foram coletados o soro, a glândula pineal, o fígado e o núcleo supraquiasmático.

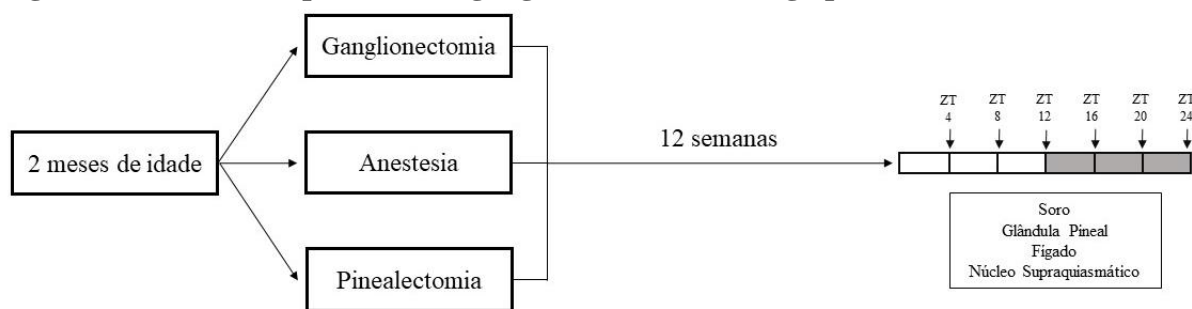
Fonte: do próprio autor.

Os núcleos supraquiasmáticos foram retirados imediatamente após a decapitação e retirada do cérebro da caixa craniana. Os cérebros foram cortados coronalmente, tomando como referência anterior do corte, o limite imediatamente anterior ao quiasma óptico e, posteriormente, a eminência mediana. Neste corte, sob visão direta com microscópio cirúrgico, 40 x de aumento, localizou-se os núcleos supraquiasmáticos que foram retirados por dissecação. Análises histológicas prévias, feitas para padronização da técnica em nosso grupo com o material neural restante, mostrou a retirada dos núcleos desejados.

Para que as análises rítmicas fossem realizadas, a eutanásia dos animais foi realizada em intervalos regulares de 4 h. Para uniformizar os horários do ciclo circadiano sincronizado pelo claro-escuro ambiental, convencionou-se usar a nomenclatura ZT, referente a *Zeitgeber Time*. Em ciclos claro-escuro de 12 h/12 h o ZT 0 representa a transição da fase de escuro, para a fase de claro, enquanto que o ZT 12, a transição da fase de claro para a fase de escuro. Dentro dessa lógica, ZT 1 representa 1 hora após o início da fase de claro, ZT 2 representa 2 h e assim por diante.

No segundo experimento (Figura 6), ao atingirem dois meses de idade os animais também foram divididos em três grupos experimentais: controles (CTL), pinealectomia (PINX) e ganglionectomia (GCSx). A eutanásia circadiana aconteceu 12 semanas após as intervenções cirúrgicas e durante esse tempo houve o acompanhamento de peso e consumo alimentar. Foram coletados o soro, a glândula pineal, o núcleo supraquiasmático e o fígado.

Figura 6 – Desenho experimental: ganglionectomia de longo prazo (12 semanas)



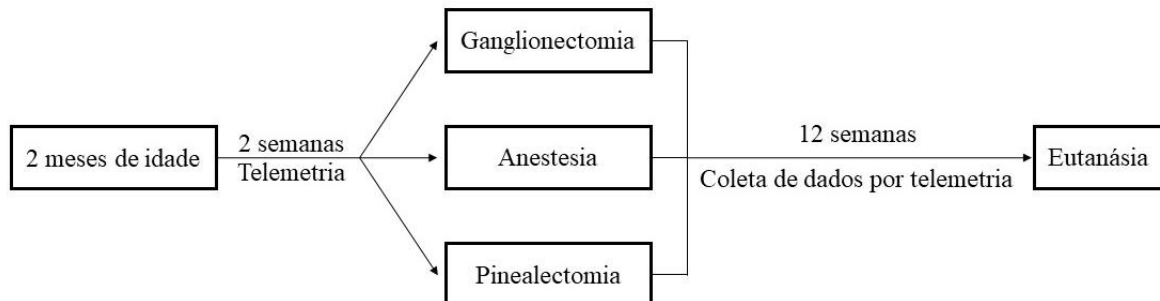
Ao atingirem dois meses de idade, os animais foram divididos em três grupos: ganglionectomizados, controles e pinealectomizados. Após 12 semanas do procedimento cirúrgico, houve a eutanásia circadiana por decapitação, em 6 pontos ao longo das 24 h. Esses pontos correspondem ao ZTs 4, 8, 12, 16, 20 e 24. Foram coletados o soro, a glândula pineal, o fígado e o núcleo supraquiasmático. Durante o período do protocolo experimental, houve o registro de peso e consumo alimentar.

Fonte: do próprio autor.

Por fim, no terceiro experimento (Figura 7), foi implantado um transmissor individual nos animais com 2 meses de idade para a leitura telemétrica dos dados de atividade e temperatura. Após 2 semanas, os animais foram divididos em 3 grupos: controle (CTL, que só

recebeu anestesia), ganglionectomia (GCSx) e pinealectomia (PINX). Após 12 semanas de coleta os animais foram eutanasiados.

Figura 7 – Desenho experimental: avaliação dos ritmos de atividade e temperatura



Ao atingirem dois meses de idade, foi implantado nos animais um transmissor individual que permite a coleta de dados de temperatura e atividade do mesmo. Tal leitura controle ocorreu por duas semanas, quando então os animais foram submetidos ao protocolo de ganglionectomia, ou pinealectomia, ou apenas anestesia. Em seguida, voltaram para o registro telemétrico por mais 12 semanas. Após esse período os animais foram eutanasiados por decapitação. Durante o período do protocolo experimental, houve o registro de peso e consumo alimentar.

Fonte: do próprio autor.

Todo material biológico coletado foi imediatamente congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises posteriores.

4.3 Ganglionectomia

Para a realização da ganglionectomia (GCSx) os animais foram anestesiados com uma mistura de Anasedan[®] (Vetbrands, Brasil), composto por xilazina, e Dopalen[®] (Vetbrands, Brasil) composto por cloridrato de quetamina. A mistura foi aplicada intraperitonealmente na concentração de 0,15 ml/ 100 g (sendo 0,9 mg/100 g de xilazina e 11,2 mg/100 g de quetamina). Os animais controles também receberam a anestesia, já que a quetamina aplicada durante o período de atividade do animal reduz o nível de melatonina durante o primeiro dia após a aplicação e promove uma redução da atividade motora, com alteração do momento em que se vê o ponto de máxima da atividade durante três dias (75).

Depois de anestesiados houve a remoção parcial da pelagem da região cervical ventral do animal a ser operado e o mesmo foi posicionado em decúbito dorsal em um suporte cirúrgico.

Primeiramente houve uma incisão longitudinal mediana na região ventral do pescoço para a exposição da fáscia cervical superior (Figura 8A). Uma vez exposta, a mesma sofreu uma incisão longitudinal mediana para exposição das glândulas mandibulares que foram afastadas lateralmente para exposição do músculo esterno-hióideo (Figura 8B). Novamente uma incisão longitudinal mediana foi realizada nesse músculo, expondo-se a traquéia e os feixes nervosos e vasos adjacentes (Figura 8C). Com o auxílio de um afastador o corte foi mantido

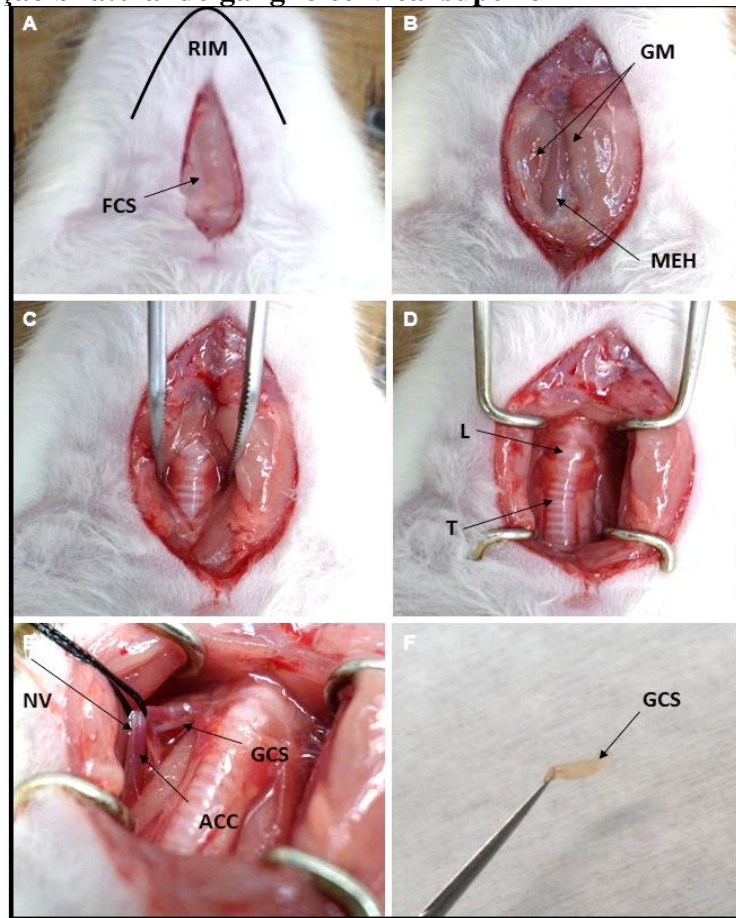
devidamente aberto e as primeiras estruturas a serem visualizadas foram a traquéia e a laringe (Figura 8D). Com o auxílio de uma pinça envolta em algodão úmido com salina a região foi divulsionada, afastando-se o tecido conjuntivo que atrapalha a visualização das estruturas. Ainda com o auxílio da pinça envolta em algodão, o nervo vago e a artéria carótida comum foram isolados cuidadosamente. Nesse momento foi prioritário o cuidado com estruturas sensíveis e essenciais, como o nervo laríngeo recorrente. Uma vez isoladas, com o auxílio de uma linha cirúrgica houve o enlaçamento dessas estruturas. Por um breve instante esse laço foi tracionado para que o gânglio cervical superior pudesse ser exposto e visualizado (Figura 8E). Com o auxílio de uma pinça cirúrgica ponta reta e fina o gânglio foi pinçado e puxado para fora da cavidade vagarosamente e cuidadosamente (Figura 8F) para que não houvesse rompimento e nem perfuração da carótida. Após a retirada do GCS a linha cirúrgica pôde ser retirada.

Removido de um dos lados, todo o processo foi realizado novamente para a retirada do gânglio cervical superior do lado oposto.

Após a remoção bilateral, foram feitos os procedimentos necessários ao fechamento da incisão cirúrgica. Após a sutura, a assepsia do local foi realizada e os animais foram adequadamente aquecidos para que durante o retorno da anestesia não sofressem com a hipotermia. Imediatamente ao acordarem, os animais receberam uma dose de analgésico.

Como o esperado, horas após a cirurgia observou-se a ptose palpebral bilateral nos animais, característico da remoção aguda dos gânglios cervicais superiores. Por esse motivo esperou-se um período de 10 dias para a realização de qualquer manipulação experimental, garantindo assim a completa degeneração anterógrada das fibras pós-ganglionares e o completo cessar da liberação de noradrenalina pelos terminais neuronais nos tecidos alvos, como a glândula pineal e o músculo de Müller. O resultado visual da ausência de inervação deste músculo é a ptose palpebral bilateral com redução da abertura ocular (Figura 9). A observação bilateral da ptose palpebral (além da própria inspeção do gânglio excisado) foi a garantia de que houve, de fato, a remoção bilateral do gânglio cervical superior (76).

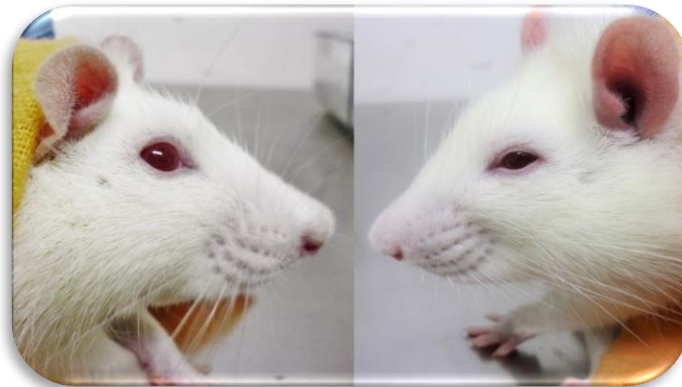
Figura 8 – Remoção bilateral do gânglio cervical superior



(A) Primeira incisão superficial longitudinal na região intermandibular (RIM) para exposição da fáscia cervical superior (FCS). (B) Incisão longitudinal na fáscia superficial para exposição das glândulas mandibulares (GM). Essas são afastadas para a exposição do músculo esterno-hióideo (MEH). (C) Incisão longitudinal do MEH. (D) Utilização do afastador para exposição da cavidade cervical. (L) laringe; (T) traqueia. (E) Laçamento do nervo vago (NV) e artéria carótida comum (ACC) para exposição do gânglio cervical superior (GCS). (F) Gânglio cervical superior removido (figura aumentada).

Fonte: do próprio autor.

Figura 9 – Ptose palpebral



Animal controle e ganglionectomizado por 10 dias, com indício de sucesso na remoção do GCS, através da observação da ptose que é caracterizado pela queda da pálpebra superior de ambos os lados.

Fonte: do próprio autor.

4.4 Pinealectomia

Para a realização da pinealectomia (PINX) os animais foram anestesiados com uma mistura de Anasedan[®] (Vetbrands, Brasil) composto por xilazina, e Dopalen[®] (Vetbrands, Brasil) composto por cloridrato de quetamina. A mistura foi aplicada intraperitonealmente na concentração de 0,15 ml/100 g (sendo 0,9 mg/100 g de xilazina e 11,2 mg/100 g de quetamina).

Em seguida, a cabeça do rato foi posicionada e fixada em um aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA). Como primeiro procedimento, houve a abertura do escalpo seguindo a linha média do animal, a fim de expor a sutura lambda. Com o auxílio de uma broca circular, fez-se a trepanação circular do osso craniano tendo-se como referência o encontro entre as suturas lambda e a linha média do crânio. O disco ósseo foi então delicadamente elevado para exposição da glândula pineal, a qual foi removida cuidadosamente com o auxílio de uma pinça cirúrgica. Após a remoção, a calota foi reposicionada e o escalpo suturado.

Após a sutura, a assepsia do local foi realizada e os animais foram adequadamente aquecidos para que durante o retorno da anestesia não sofressem com a hipotermia. Imediatamente ao acordarem, os animais receberam uma dose de analgésico.

4.5 Extração de RNA

4.5.1 Glândula pineal e núcleo supraquiasmático

Para que fosse realizada a extração do RNA, as glândulas pineais e os núcleos supraquiasmáticos foram mantidos em gelo seco para que seu RNA não degradasse. Em seguida cada tecido foi homogeneizado em 800 µL de Trizol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) com o auxílio de um pistilo. Esse macerado foi então deixado durante 5 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se a cada amostra 160 µL de clorofórmio e as amostras foram submetidas a homogeneização no Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, EUA). Essa mistura foi deixada mais uma vez em temperatura ambiente durante 10 minutos (com homogeneização a cada 2 minutos) e então levada à centrifuga refrigerada (5417R, Eppendorf, Alemanha) durante 15 minutos a 4 °C e a uma velocidade de 12000 g. Em seguida, o sobrenadante aquoso foi transferido para uma nova série de tubos Eppendorfs[®] com 10 µg de glicogênio. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente e em cada uma foi acrescentado 400 µL de isopropanol. Após misturá-las por inversão, as amostras foram acondicionadas a -20 °C por um período de até 24 h.

Após esse período, as amostras foram levadas para a centrífuga durante 20 minutos a 4 °C e à velocidade de 12000 g, para a formação do precipitado. Após a centrifugação jogou-se fora o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado 800 µL de álcool etílico gelado a uma concentração de 75%. A seguir as amostras foram levadas à centrífuga durante 10 minutos a 4 °C, à velocidade de 12000 g. O precipitado foi então localizado e o sobrenadante descartado, as amostras foram deixadas por 10 minutos em temperatura ambiente para que o álcool anteriormente adicionado evaporasse por completo. Após esse período, foi adicionado em cada amostra 12 µL de H₂O deionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) para dissolução do precipitado. As amostras sofreram então uma rápida centrifugação para garantir a completa dissolução do precipitado e foram armazenadas a -80 °C.

4.5.2 Fígado

Para que fosse realizada a extração do RNA, os fígados foram mantidos em gelo seco para que seu RNA não degradasse. Em seguida cada tecido foi homogeneizado em 1 mL de Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) com o auxílio do Polytron. Esse macerado foi então deixado durante 5 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se em cada amostra 200 µL de clorofórmio e as amostras foram submetidas a homogeneização no Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, EUA). Essa mistura foi deixada mais uma vez em temperatura ambiente durante 3 minutos e então levada à centrífuga refrigerada (5417R, Eppendorf, Alemanha) durante 15 minutos a 4 °C e em uma velocidade de 12000 g. Em seguida, o sobrenadante aquoso foi transferido para uma nova série de tubos Eppendorfs®. Às amostras foi adicionado 500 µL de isopropanol e as mesmas foram deixadas 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, foram levadas para a centrífuga durante 10 minutos a 4 °C e à velocidade de 12000 g para a formação do precipitado. Após a centrifugação jogou-se fora o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado 1 mL de álcool etílico gelado a uma concentração de 75%. A seguir as amostras foram levadas à centrífuga durante 5 minutos a 4 °C, à velocidade de 7500 g. O precipitado foi localizado e o sobrenadante descartado, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente, para que o álcool anteriormente adicionado evaporasse por completo. Após esse período, adicionou-se 50 µL de H₂O deionizada previamente tratada com DEPC para dissolução do precipitado. As amostras sofreram então uma rápida agitação, a fim de garantir a completa dissolução do precipitado. Em seguida, foram armazenadas a -80 °C.

Após a extração de RNA, as amostras de todos os tecidos sofreram tratamento com DNase utilizando-se o kit Turbo DNA-free™ (Ambion, Austin, Texas, EUA) de acordo com

as especificações do fabricante. Portanto, à cada amostra foram adicionados 1,2 µL da enzima Turbo DNase e 1 µL de Tampão Turbo DNase. Posteriormente foram misturadas por inversão e levadas à centrífuga para uma rápida centrifugação. Em seguida, foram deixadas a 37 °C por 30 min. Ao término desse período foram imediatamente colocadas em gelo e sofreram a adição de 2,2 µL do reagente de inativação do kit. Todos os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos com constante homogeneização. A seguir foram centrifugados por 1,5 minutos à velocidade de 10000 g. O sobrenadante foi transferido para uma nova série de tubos Eppendorfs® e o precipitado foi então descartado.

As amostras de RNA, agora livres de DNA, foram quantificadas e analisadas quanto à sua pureza e integridade, por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 a 280 nm pelo NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, EUA). Os dados obtidos a partir dessa análise foram utilizados para calcular o volume necessário oriundo da extração de RNA total para a conversão de 1 µg de RNA em cDNA e também para aferir a qualidade da amostra. Amostras com razão 260/280 acima de 1,8 foram utilizadas.

4.6 Obtenção de cDNA

Após a extração, amostras de 1 µg de RNA total foram submetidas à reação de transcrição reversa com primers randômicos. Para tal, utilizou-se o kit SuperScript™ III Antisense Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. Às amostras foram adicionados: tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂), DTT (10 mM), mistura de dNTPs (10 mM cada), *primers* randômicos (150 ng), inibidor de RNase (40 U) e a enzima SuperScript III, obtendo um volume final de 20 µl. As amostras foram incubadas no termociclador MyGene™ Series Gradient (Long Gene®, China) por 5 minutos à 65 °C, seguida de 10 minutos à 25 °C, com aquecimento para 42 °C por 75 minutos e 70 °C por 15 minutos para desnaturação da enzima. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C.

4.7 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

A análise da expressão gênica foi realizada através da técnica de PCR em tempo real utilizando o aparelho QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR (Thermo Fischer Inc., Waltham, MA, USA). Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando 0,96 µL de cDNA (5 ng / µL) previamente sintetizado, adicionado à mistura da reação contendo 3 µL de *Power SYBR*® Green

(Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), 3,25 de água Ultra-Pure™ Distilled Water (Gibco, EUA) e 400 nM dos primers específicos parra cada gene.

Os primers utilizados foram desenhados de modo que sua localização lhes permitisse flanquear um íntron, impossibilitando a amplificação de DNA genômico. A eficiência dos pares de *primers* foi testada e determinada por reação de PCR em tempo real utilizando diluições de cDNA. A determinação da eficiência se deu pela análise de regressão linear feita utilizando o software 7500 2.0.3 (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA). Todos os pares de *primers* usados foram considerados adequados quando apresentaram eficiência entre 1,8 e 2,0.

Para a avaliação da expressão rítmica foram analisados os genes *Bmal1*, *Clock*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1*, *Per2*, *Dbp* e *Rev-erba* em todos os tecidos. Especificamente para a glândula pineal também foram avaliados os genes *Adra_{1B}*, *Adr_{β1}*, *Tph*, *Aanat* e *Hiomt (Asmt)*.

Todos os pares de *primers* foram desenhados a partir da sequência genômica de rato disponível no GenBank® (NCBI – NIH, EUA) e fabricados pela IDT e Exxtend. A tabela com as sequências genômicas dos primers utilizados encontram-se na Tabela 1.

Em cada placa, também foi adicionado um poço denominado testemunho. Esse poço continha a mesma amostra de cDNA (no caso um *pool* de todas as amostras) em todas as placas, afim de se manter um controle entre placas e possibilitar a normalização entre blocos experimentais quando necessário.

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados.

Primer	Nº Acesso	Sequências	Fragmento
<i>Aanat</i>	NM_012818.2	5' – CCGGAGGATGCCACCA – 3' 5' – CCGGATCTCATCCAAGTGGGA – 3'	89bp
<i>Adra1b</i>	NM_016991.2	5' – GGGTCTACATCGTGGCCAAG – 3' 5' – CCTCATGAAAGTTCTTGGAGT – 3'	114bp
<i>Adrβ1</i>	NM_012701.1	5' – TCTCCGCGCTGGTGTCCCTTC – 3' 5' – GAAATCGCAGCACTTGGGGT – 3'	101bp
<i>Bmal1</i>	NM_024362.2	5' – CCGATGACGAACTGAAACACC – 3' 5' – TCTTCCCTCGGTCACATCCT – 3'	77bp
<i>Clock</i>	NM_021856.1	5' – AGAACTTGGCGTTGAGGAGTCT – 3' 5' – GTGATCGAACCTTCCAGTGCT – 3'	117bp
<i>Cry1</i>	NM_198750.2	5' – TTCGCCGGCTCTTCCAA – 3' 5' – ATTGGCATCAAGGTCCTCAAGA – 3'	74bp
<i>Cry2</i>	NM_133405.1	5' – TCAGCGTGAATGCAGGCA – 3' 5' – AGGGCAGTAGCAGTGAAGAAG – 3'	76bp
<i>Dbp</i>	NM_012543.2	5' – CTGCAGGGAAACAGCAAGC – 3' 5' – GAGGGCAGAGTTGCCTTGC – 3'	76bp
<i>Gapdh</i>	NM_017008.4	5' – GGGCAGCCCAGAACATCAT – 3' 5' – CCGTTCAGCTCTGGGATGAC – 3'	76bp
<i>Hdac1</i>	NM_001025409.1	5' – TGGTCTCTACCGAAAAATGGAAA – 3' 5' – GTCGTCGCTGTGGTACTTGGT – 3'	78bp
<i>Hiomt</i>	NM_144759.2	5' – CCGCACCCACTTCCTGTC – 3' 5' – CAAGAATGAAGAGCTCAGCGC – 3'	100bp
<i>Hprt1</i>	NM_012583.2	5' – CTCCTCAGACCGTTTTCCC – 3' 5' – TCACTAATCACGACGCTGGG – 3'	75bp
<i>Per1</i>	NM_001034125.1	5' – CTGCCTCAGGCCCTCGA – 3' 5' – GTCCGAGTGGCCAGGATCTT – 3'	71bp
<i>Per2</i>	NM_031678.1	5' – GCAGCCTTTCGATTATTCTCCC – 3' 5' – GGACCAGCTAGTGTCCAGTGTG – 3'	75bp
<i>Ppia</i>	NM_017101.1	5' – AAGACTGAGTGGCTGGATGG – 3' 5' – GGCTTCCACAATGCTCATGC – 3'	72bp
<i>Rev-erba</i>	NM_145775.1	5' – AGGTGACCCTGCTTAAGGCTG – 3' 5' – ACTGTCTGGTCCTTACGTTGA – 3'	81bp
<i>Rpl37a</i>	NM_001108801	5' – CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG – 3' 5' – GCCACTGTTTTTCATGCAGGAAC – 3'	93bp

Nessa tabela estão listados os primers utilizados, desenhados a partir das informações obtidas pelo GenBank™ (NCBI – NIH, Bethesda, EUA), sendo informadas também as sequências sense e antisense, além do tamanho dos fragmentos amplificados.

Fonte: NCBI – NHI, Bethesda, EUA.

Para a amplificação do material contido na placa, os seguintes parâmetros de amplificação foram utilizados: etapa inicial de ativação da enzima mantendo as amostras à 50 °C durante 1 minutos e 95 °C por 10 min. Em seguida as amostras foram submetidas a 40 ciclos que incluíram a desnaturação à 95 °C por 15 s, seguido por anelamento dos primers e a extensão a 60 °C por 1 minuto. Finalmente após essa série de ciclos, foram submetidas à 1 ciclo para

análise do *melting* que consistiu em 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 minuto e posterior aumento gradativo da temperatura até atingir 95 °C.

As curvas de *melting* foram determinados pelo software do equipamento e quando se observou múltiplos picos de temperatura de *melting* a placa foi desconsiderada e as etapas do processo até então foram reavaliados para solução do problema.

Para análise dos resultados obtidos pela PCR utilizou-se o método de $2^{-\Delta CT}$ adaptado de (77). Para a obtenção do delta, a média geométrica dos CTs dos genes constitutivos foi subtraída do CT (*cycle treshold*, calculado pelo software do aparelho) de cada amostra.

Para a normalização das amostras de glândula pineal utilizou-se como genes constitutivos: *Rpl37a*, *Hdac1* e *Ppia*. Para a normalização das amostras de fígado foram utilizados os genes: *Rpl37a*, *Hprt1* e *Ppia*. E, finalmente, para a normalização das amostras de núcleo supraquiasmático foram utilizados: *Hprt1*, *Hdac1* e *Gapdh*.

4.8 Análise da atividade e temperatura por telemetria

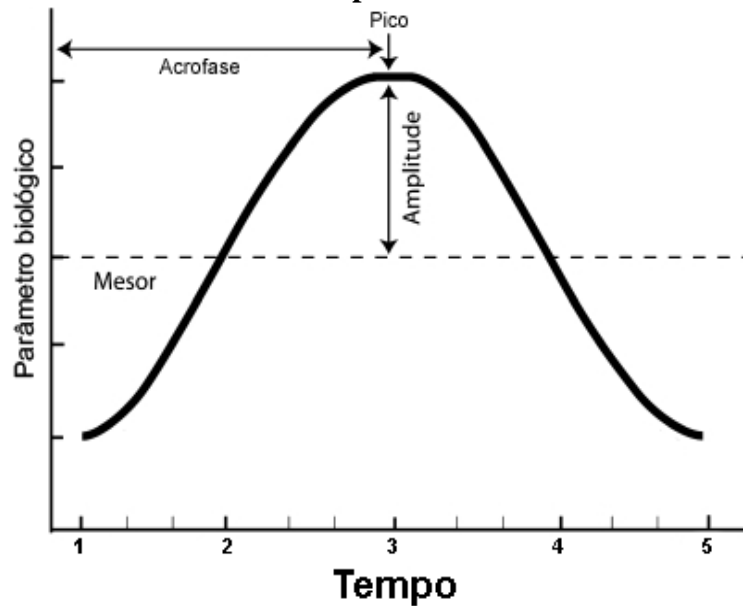
Para a aquisição dos dados de atividade e temperatura utilizou-se um sistema de telemetria (RESPIRONICS, Mini Mitter, Oregon, USA). Com um transmissor individual (E-mitter) implantado na cavidade abdominal do rato e uma placa receptora (ER-4000) localizada na base de cada gaiola, a atividade motora e a temperatura de cada animal puderam ser coletadas (78). O intervalo de aquisição de dados foi de 1 minuto utilizando o software VitalView (Mini Mitter, Oregon, USA). Os dados foram coletados por 14 semanas, as duas primeiras semanas foram consideradas como o período basal da atividade e temperatura do próprio animal. Ao término deste período, os animais foram submetidos às manipulações experimentais e as coletas prosseguiram por mais 12 semanas.

Para a realização dos actogramas, termogramas e a análise por periodograma foi utilizado o software *El Temps* (v. 1,292+, Díez-Noguera, Barcelona, Espanha) a partir dos dados brutos obtidos na telemetria.

A análise dos parâmetros circadianos rítmicos foi realizada através da utilização do software COSANA (Benedito Silva, São Paulo, Brasil), gerados a partir de uma curva média diária baseada em uma média semanal para cada animal e parâmetro (temperatura e atividade). Primeiramente, para a realização dessa curva média, fez-se a somatória dos dados de atividade e a média da temperatura a cada hora. Em seguida, a cada semana foi feita a média de cada hora a fim de obtermos a curva média diária representativa da semana.

Cada curva média foi submetida ao COSANA que foi responsável pela análise Cosinor, que ajusta, pelo método dos quadrados mínimos, uma curva cosseno aos dados e testa estatisticamente se a amplitude da curva obtida foi diferente ou não de zero. Foi considerado como variação rítmica significativa quando $p < 0,05$. Além disso, para cada série temporal, a acrofase (instante referente ao ponto de máximo da curva ajustada), o mesor (valor médio da curva ajustada) e a amplitude (diferença entre o mesor e o pico de máxima da curva ajustada) foram calculados (Figura 10).

Figura 10 – Parâmetros rítmicos obtidos após análise Cosinor



Representação gráfica dos parâmetros rítmicos obtidos após o ajuste da curva diária de um parâmetro biológico pelo método Cosinor. Mesor: valor médio da curva ajustada; Acrofase: momento em que se dá o ponto de máxima; Amplitude: diferença entre o mesor e o valor máximo da curva ajustada. Modificado de (79).

4.9 Análise Estatística

Todos os resultados obtidos a partir da expressão gênica foram representados como média \pm EPM. Os grupos experimentais foram analisados individualmente, através do teste ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni, com múltiplas comparações, a fim de se avaliar a influência da variável “tempo” em cada série temporal usando o programa computacional *Graphpad Prism data analysis and graph package* (v 6.01, Graphpad Software, Inc., San Diego, Califórnia, USA). Portanto, cada série temporal que apresentou variação ao longo das 24 h estatisticamente definida pela ANOVA de uma via, teve a sua ritmicidade avaliada pela aplicação do método do Cosinor (pelo software COSANA) e quando $p < 0,05$, houve a determinação dos parâmetros rítmicos (mesor, amplitude e acrofase), que foram

comparados entre si através do teste *T Student's* ou de ANOVA de uma via (de acordo com a necessidade). Ainda com relação à expressão gênica, a fim de se avaliar a influência e relação entre as variáveis cirurgia e tempo, utilizou-se a análise de variância bi fatorial (ANOVA de duas vias), com pós teste Bonferroni usando o programa computacional *Graphpad Prism data analysis and graph package* (v. 6.01).

Os parâmetros mesor e amplitude obtidos após análise rítmica da atividade e temperatura dos animais foram expressos como média \pm EPM da variação com relação ao período basal de cada grupo, enquanto que o parâmetro acrofase foi expressão apenas como média \pm EPM. Nesses casos os grupos foram analisados individualmente pela ANOVA de uma via, e em conjunto pela ANOVA de duas vias, sempre tendo como pós teste o método Bonferroni com múltiplas comparações.

5 RESULTADOS

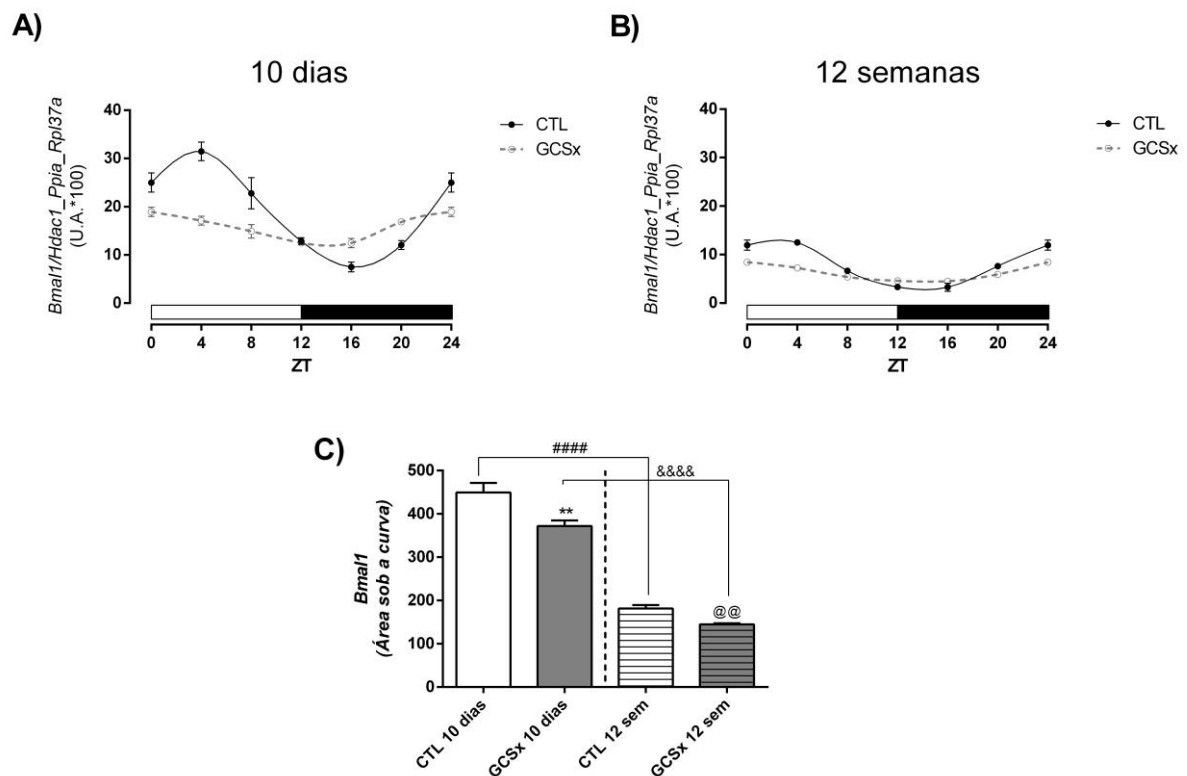
5.1 Perfil circadiano dos genes da alça primária do oscilador da glândula pineal

Os genes *Bmal1*, *Clock*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per2* participam da alça primária existente no oscilador circadiano e para avaliar o perfil rítmicos desses genes na pineal de animais ganglionectomizados utilizou-se a técnica de PCR em tempo real.

5.1.1 Alça primária do oscilador – elementos positivos: *Bmal1* e *Clock* na glândula pineal

A expressão do gene *Bmal1* variou ao longo do dia em todos os grupos analisados (Figuras 11A e B) e a remoção do gânglio cervical superior, e consequente eliminação da inervação noradrenérgica na glândula pineal, resultou em redução da expressão desse gene (Figura 11C) a curto e longo prazo.

Figura 11 – Perfil diário de RNAm do gene *Bmal1* (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.



(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Bmal1* na glândula pineal de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os fatores cirurgia, ZT e interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL e GCSx. $n = 8$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Bmal1* na glândula pineal de animais controles e após 12 semanas

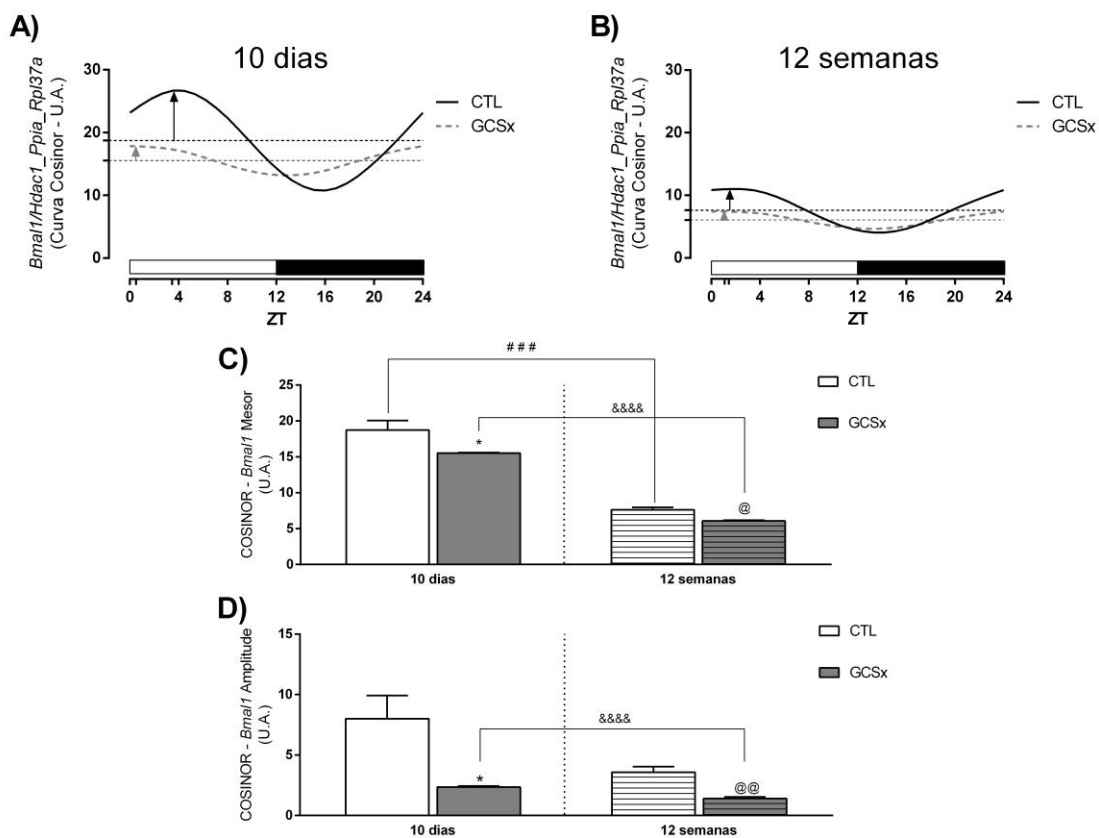
de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os fatores cirurgia, ZT e interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL e GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Bmal1*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com ** $p = 0,0096$ vs CTL 10 dias; @ $p = 0,0051$ vs CTL 12 semanas; #### e @@@@ $p < 0,0001$ vs CTL 10 dias e GCSx 10 dias, respectivamente. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Uma vez verificada a variação circadiana em todos os grupos, fez-se a análise rítmica da expressão de *Bmal1*. Após o ajuste da expressão à curva cosseno, viu-se que a remoção da inervação noradrenérgica na glândula pineal, a curto ou longo prazo, não eliminou o ritmo circadiano encontrado nos animais controles (Figuras 12A e B).

A análise dos parâmetros definidos pelo método Cosinor, demonstrou a redução da expressão de *Bmal1* após a ganglionectomia através da redução dos parâmetros mesor e amplitude, independentemente da duração do protocolo (Figuras 12C e D).

A ganglionectomia a curto prazo promoveu um adiantamento da acrofase da expressão de *Bmal1* (Figura 39), diferença essa que não foi encontrada após 12 semanas de protocolo.

Figura 12 – Perfil diário de RNAm do gene *Bmal1* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados analisado pelo método Cosinor.

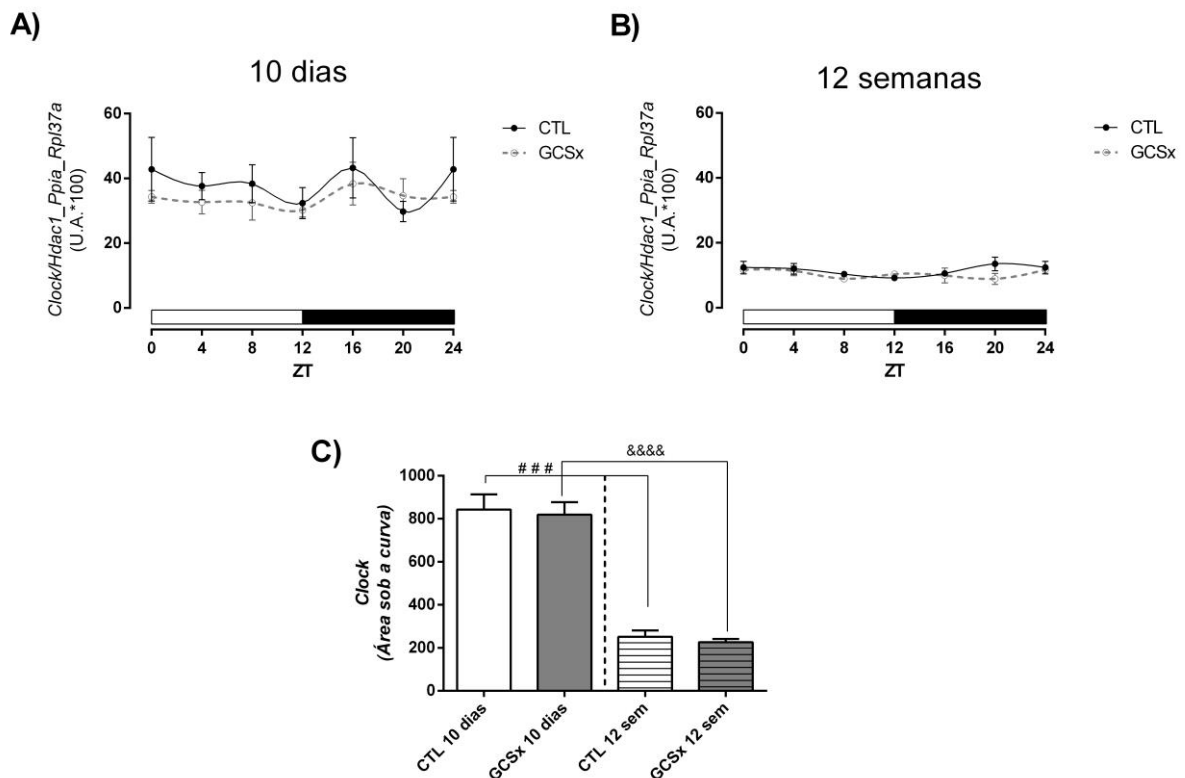


(A) Perfis diários de expressão de *Bmal1* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Bmal1* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e

seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 dias e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com * $p = 0,0296$ vs CTL 10 dias; @ $p = 0,047$ vs CTL 12 semanas; ### $p = 0,0002$ vs CTL 10 dias; &&&& $p < 0,0001$ vs GCSx 10 dias. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 dias e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com * $p = 0,0109$ vs CTL 10 dias; @@ $p = 0,0039$ vs CTL 12 semanas; &&&& $p < 0,0001$ vs GCSx 10 dias. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

A expressão do segundo gene da alça positiva analisado (*Clock*), não exibiu variação ao longo do dia em nenhum dos grupos estudados, não havendo, portanto, oscilação rítmica na expressão do mesmo (Figura 13A e B). Além disso, a realização da ganglionectomia não afetou a expressão de *Clock* na glândula pineal, já que a área sob a curva dos respectivos grupos controle e ganglionectomizados não se modificou (Figura 13C). Em compensação, viu-se um efeito do tempo na redução da expressão desse gene, já que houve a redução da área sob a curva em ambos os grupos após 12 semanas de protocolo experimental (Figura 13C).

Figura 13 – Perfil diário de RNAm do gene *Clock* (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.



(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Clock* na glândula pineal de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,1689$ para o fator cirurgia, $p=0,6127$ para o fator ZT e $p=0,9276$ para p fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,7409$ para o grupo CTL e $p = 0,8916$ para o GCSx. $n = 8$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Clock* na glândula pineal de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p=0,1872$ para o fator cirurgia, $p=0,4516$ para o fator ZT e $p=0,5830$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida

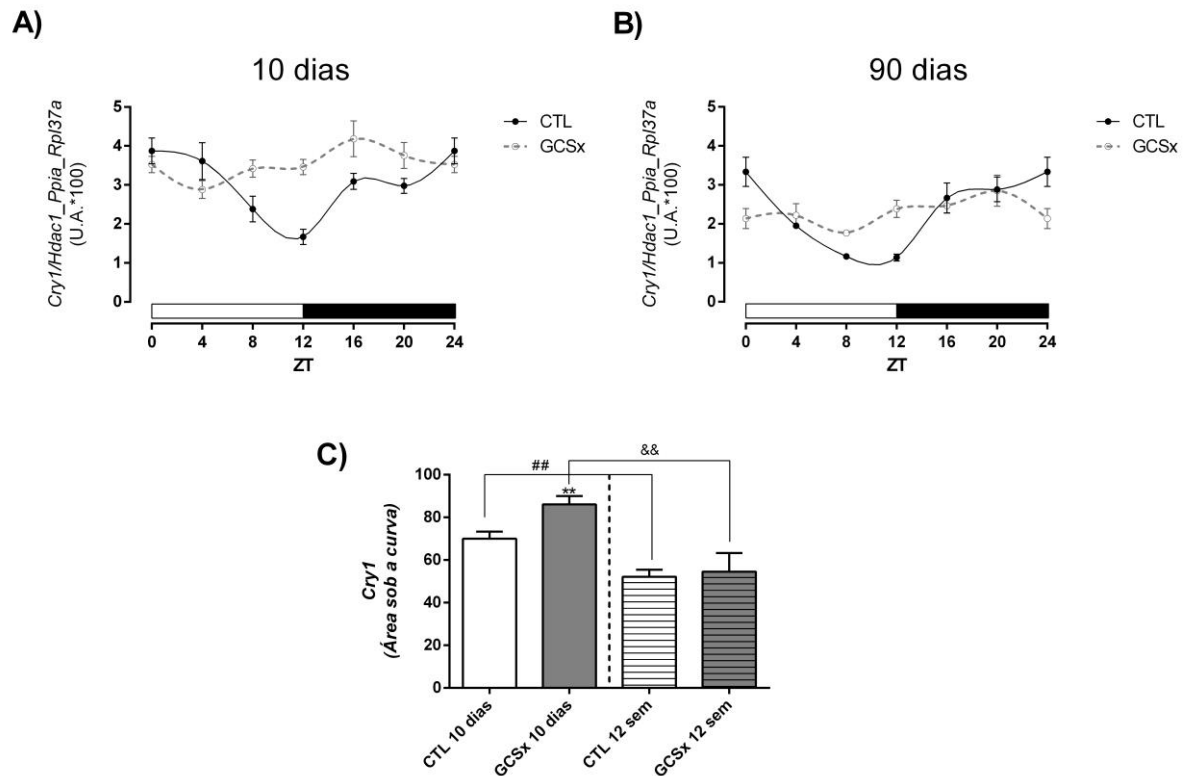
por pós teste Bonferroni, no qual $p=0,3975$ para o grupo CTL e $p=0,6856$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Clock*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com ** $p = 0,0096$ vs CTL 10 dias; @ $p = 0,0051$ vs CTL 12 semanas; #### e &&&& $p < 0,0001$ vs CTL 10 dias e GCSx 10 dias, respectivamente. Dados plotados como média \pm EPM. Valores x 100 para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Dessa forma nota-se que, no oscilador molecular da glândula pineal, a alça de regulação positiva sofre importante influência após ablação do gânglio cervical superior e consequente ausência da sinalização noradrenérgica, vista principalmente pela redução da expressão de *Bmal1*, observada através da diminuição da área sob a curva e do mesor. Além disso, nesse gene, a ausência da inervação simpática gerou atenuação da robustez do perfil rítmico, visto através da redução da amplitude. Entretanto, a acrofase pareceu ser afetada apenas a curto prazo.

5.1.2 Alça primária – elementos negativos: *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per2* na glândula pineal

O primeiro gene dentre os elementos negativadores a ser analisado foi o *Cry1*, cuja expressão apresentou variação ao longo das 24 h nos grupos controles. Após o animal ser submetido à ablação do gânglio cervical superior, tal variação não foi mais observada (Figuras 14A e B). Além de alterar a variação da expressão ao longo do dia, a remoção por curto prazo da estrutura acima mencionada resultou em um aumento da expressão desse gene, observado através do aumento da área sob a curva da expressão de *Cry1* (Figura 14C). Também se observou um efeito do tempo na redução da expressão desse gene em ambos os grupos estudados, uma vez que a área sob a curva após 12 semanas de protocolo foi menor do que após 10 dias nos animais controles e ganglionectomizados (Figura 14C).

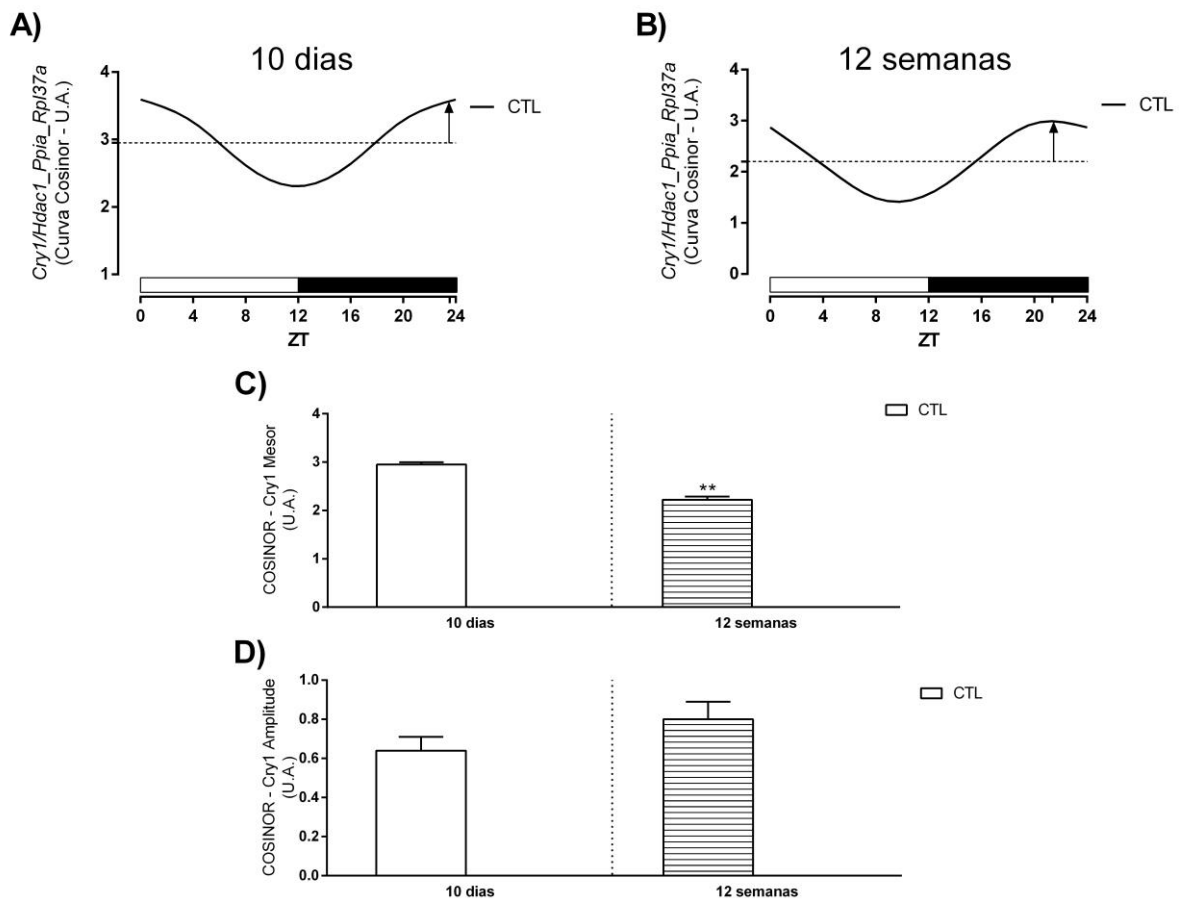
Figura 14 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry1* (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal



(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Cry1* na glândula pineal de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0040$ para o fator cirurgia, $p = 0,0005$ para o fator ZT e $p = 0,0001$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL e $p = 0,0985$ para o GCSx. $n = 8$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Cry1* na glândula pineal de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,6335$ para o fator cirurgia, $p < 0,0001$ para o fator ZT e $p = 0,0008$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL e $p = 0,2525$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Cry1*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com ** $p = 0,0070$ vs CTL 10 dias; ## $p = 0,0071$ vs CTL 10 dias e &&&& $p = 0,0031$ vs GCSx 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Como houve variação ao longo das 24 h apenas nos grupos controles, apenas estes foram submetidos à análise pelo Cosinor (Figura 15A e B). Após esta análise viu-se que a variação circadiana encontrada foi de fato rítmica, ajustando-se à uma curva cosseno, em ambos os tempos de protocolo. A partir de então, os parâmetros mesor, amplitude e acrofase foram determinados (Figura 15C, D e Figura 39) apenas para o animal controle. A duração do protocolo experimental não alterou a amplitude, mas resultou em redução do mesor e adiantamento da acrofase da expressão de *Cry1* (Figuras 15C, D e 39, respectivamente).

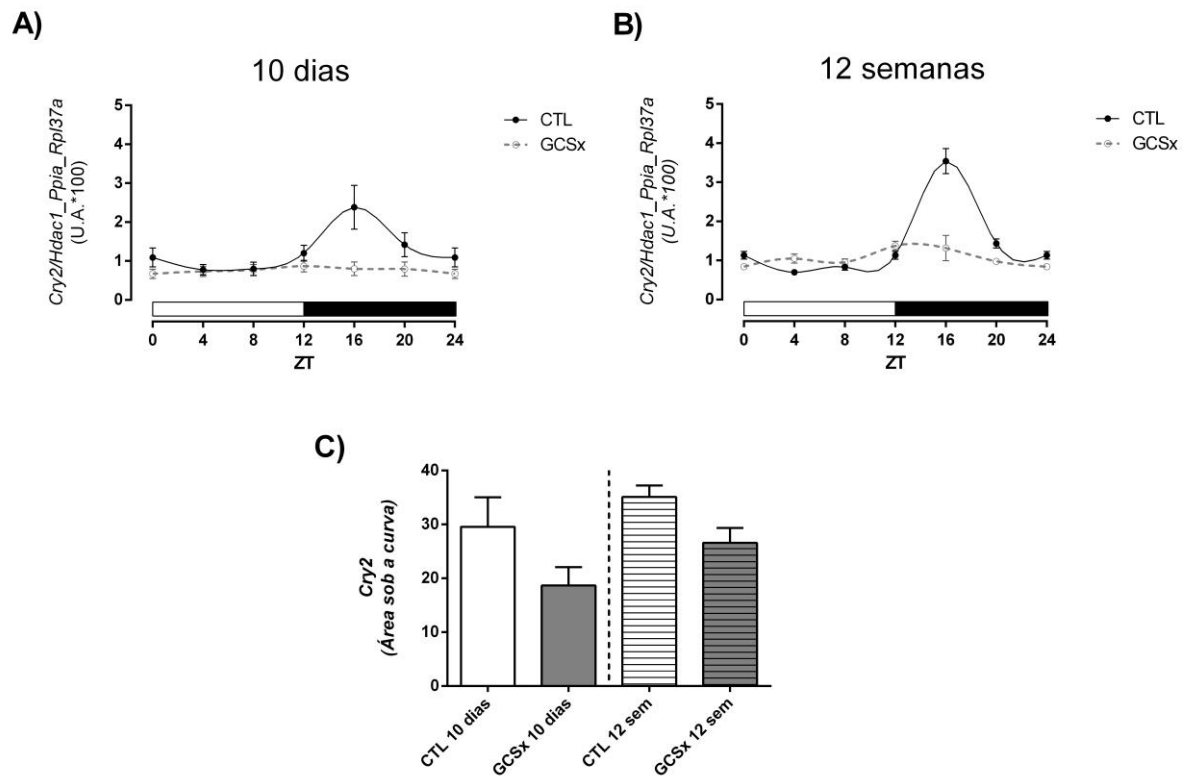
Figura 15 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry1* na glândula pineal de animais controles analisado pelo método Cosinor.



(A) Perfil diário de expressão de *Cry1* na glândula pineal de animais controles após protocolo experimental de 10 dias, analisado pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfil diário de expressão de *Cry1* na glândula pineal de animais controles após protocolo experimental de 12 semanas, analisado pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor no grupo controle após 10 dias e 12 semanas de protocolo experimental, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $**p = 0,0017$ vs CTL 10 dias. (D) Parâmetro amplitude no grupo controle após 10 dias e 12 semanas de protocolo experimental, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $p > 0,05$. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

O segundo gene da alça negativa a ser analisado foi o *Cry2*, e assim como o visto na expressão do gene *Cry1*, houve variação de sua expressão gênica ao longo das 24 h apenas nos grupos controles (Figura 16A e B). E apesar de alterar a variação circadiana da expressão de *Cry2*, a cirurgia e a duração do protocolo experimental não promoveram alterações significativas na área sob a curva de sua expressão (Figura 16C).

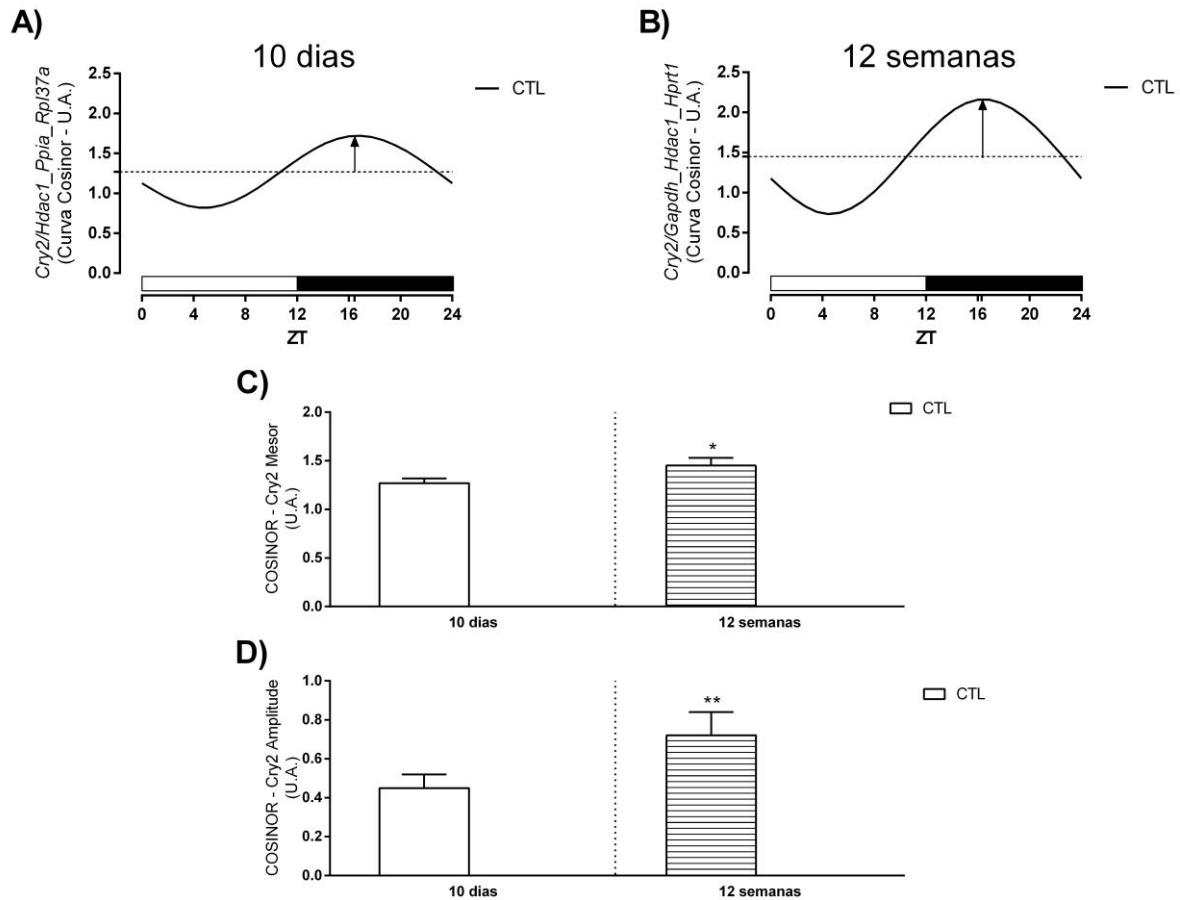
Figura 16 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry2* (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.



(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Cry2* na glândula pineal de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator cirurgia, $p=0,0055$ para o fator ZT e $p=0,0164$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0063$ para o grupo CTL e $p = 0,9595$ para o GCSx. $n = 8$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Cry2* na glândula pineal de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os fatores cirurgia, ZT e interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL e $p = 0,1046$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Cry2*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado $p > 0,05$ em todas as comparações. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Ao serem submetidas à análise Cosinor, as curvas referentes à expressão de *Cry2* nos animais controles foram consideradas rítmicas já que se ajustaram à uma curva cosseno, independentemente da duração do protocolo (Figura 17A e B). Após a determinação de seus parâmetros rítmicos viu-se que a duração do protocolo promoveu um aumento nos parâmetros de mesor e amplitude (Figura 17C e D respectivamente), mas a acrofase não foi alterada (Figura 39).

Figura 17 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry2* na glândula pineal de animais controles analisado pelo método Cosinor.

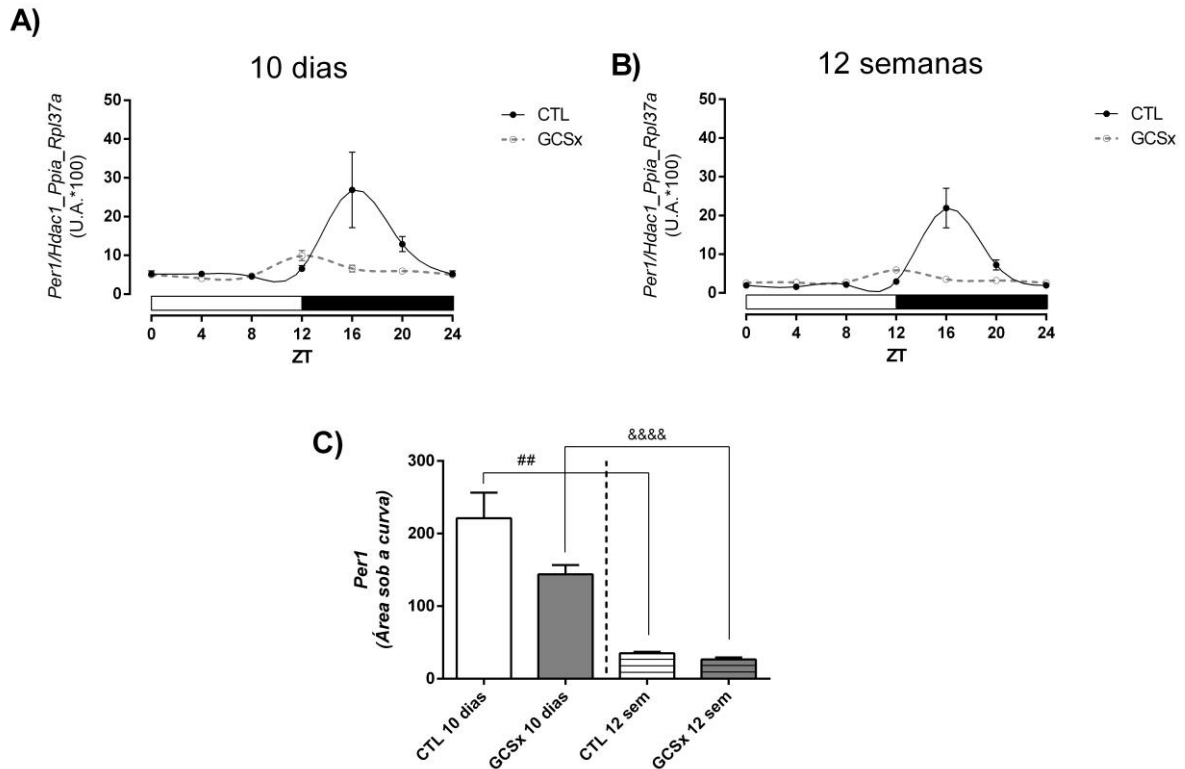


(A) Perfil diário de expressão de *Cry2* na glândula pineal de animais controles após protocolo experimental de 10 dias, analisado pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfil diário de expressão de *Cry2* na glândula pineal de animais controles após protocolo experimental de 12 semanas, analisado pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor no grupo controle após 10 dias e 12 semanas de protocolo experimental, Teste T de Student, bicaudal não pareado com * $p = 0,0125$ vs CTL 10 dias. (D) Parâmetro amplitude no grupo controle após 10 dias e 12 semanas de protocolo experimental, Teste T de Student, bicaudal não pareado com * $p = 0,0081$. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Seguindo na análise dos elementos negativos que compõem a alça primária do oscilador molecular da glândula pineal, viu-se que a expressão do gene *Per1* variou ao longo das 24 h independentemente da duração do protocolo ou ablação do gânglio cervical superior (Figuras 18A e B).

Enquanto a ganglionectomia não alterou a quantidade da expressão de *Per1*, a duração do protocolo promoveu sua redução, observada através da redução da área sob a curva de expressão após 12 semanas de protocolo, tanto nos grupos controles, quanto ganglionectomizados (Figura 18C).

Figura 18 – Perfil diário de RNAm do gene *Per1* (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.

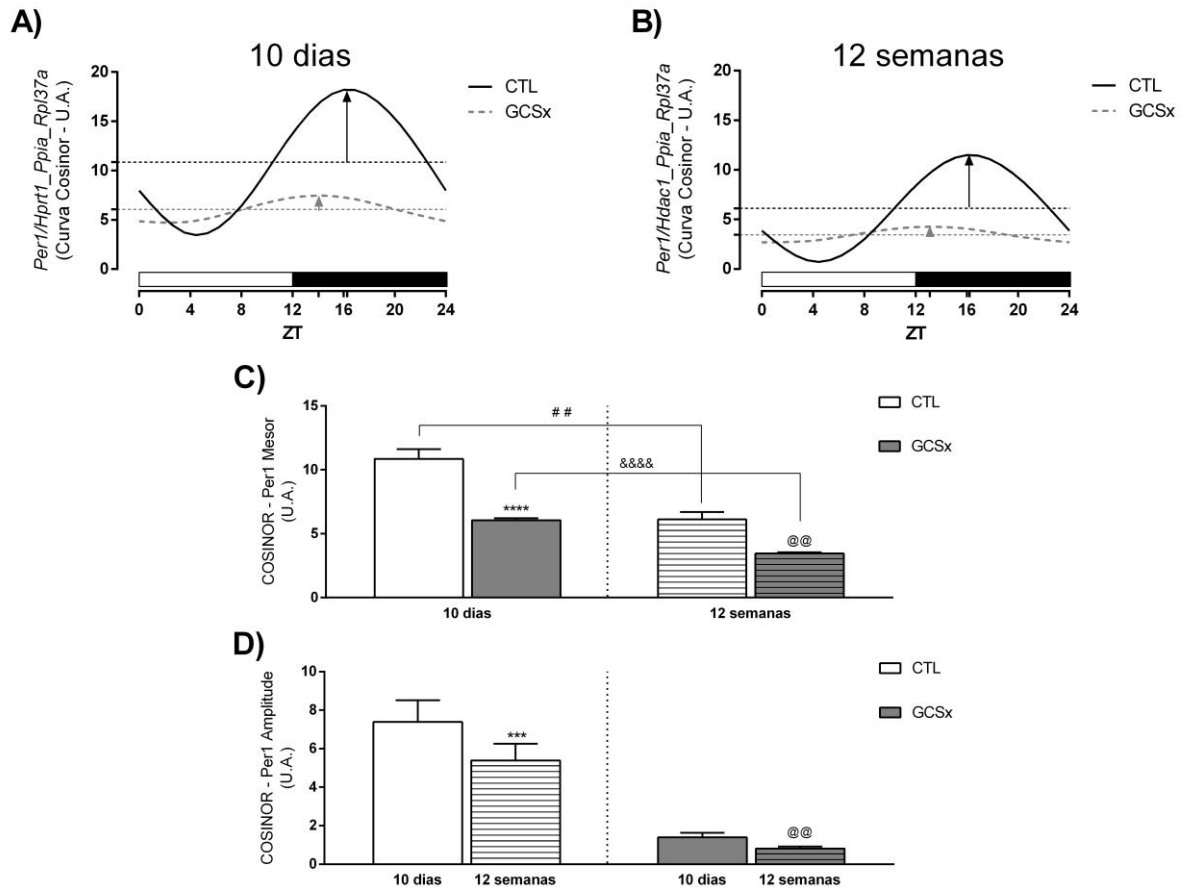


(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Per1* na glândula pineal de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os fatores ZT e interação e $p = 0,0004$ para o fator cirurgia. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL e GCSx. $n = 8$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Per1* na glândula pineal de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os fatores ZT e interação e $p = 0,0043$ para o fator cirurgia. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL e GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Per1*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com $## p = 0,0047$ vs CTL 10 dias e $##### p < 0,0001$ vs GCSx 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Após serem submetidos à análise Cosinor, observou-se que a remoção da inervação simpática da glândula pineal não resultou em abolição do ritmo de expressão de *Per1*, já que as curvas de todos os grupos analisados se ajustaram à uma curva cosseno (Figura 19 A e B). Apesar de não abolir ritmicidade, a ablação bilateral do gânglio cervical superior resultou na redução do mesor e amplitude de *Per1* (Figuras 19 C e D) e no adiantamento da acrofase tanto em 10, quanto em 12 semanas (Figura 39).

Com relação ao efeito da duração do protocolo sobre a expressão rítmica de *Per1*, apenas o parâmetro mesor foi afetado por essa variável (Figura 19 C).

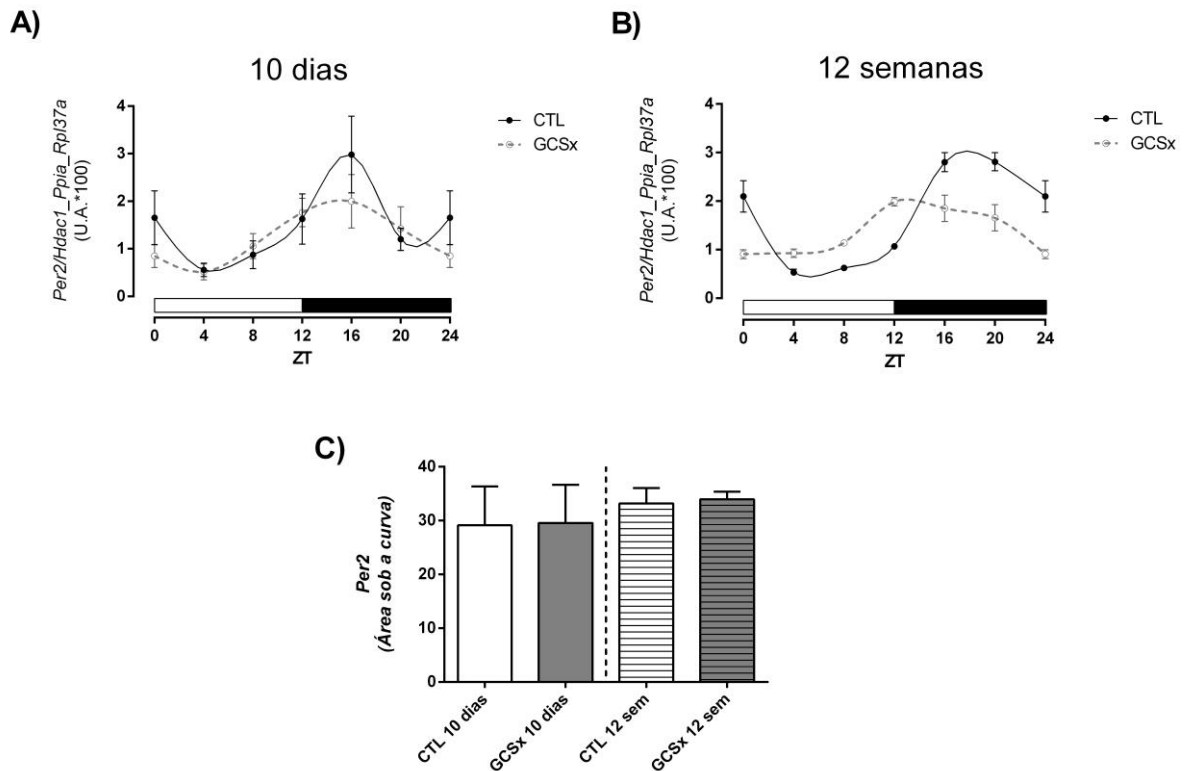
Figura 19 – Perfil diário de RNAm do gene *Per1* na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.



(A) Perfis diários de expressão de *Per1* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Per1* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 dias e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $***p < 0,0001$ vs CTL 10 dias; $@@p = 0,0039$ vs CTL 12 semanas; $\#p = 0,0023$ vs CTL 10 dias; $\&\&\&p < 0,0001$ vs GCSx 10 dias. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 dias e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $***p = 0,0001$ vs CTL 10 dias; $@@p = 0,0019$ vs CTL 12 semanas. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Acompanhando o visto em *Per1*, viu-se variação na expressão do gene *Per2* ao longo das 24 h em todos os grupos analisados (Figuras 20 A e B), porém a retirada da inervação simpática na glândula pineal e a duração do protocolo não levaram a alterações na área sob a curva de expressão do gene em nenhum dos grupos (Figura 20 C).

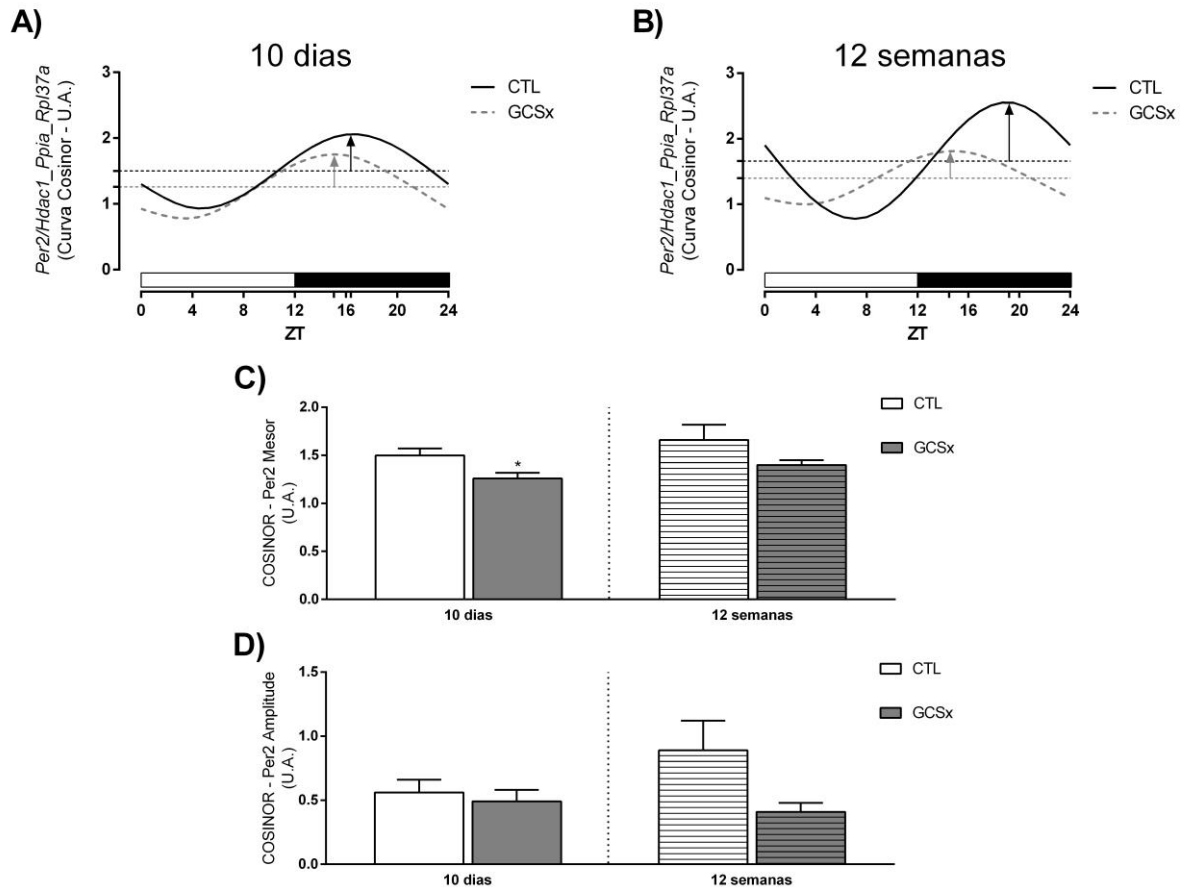
Figura 20 – Perfil diário de RNAm do gene *Per2* (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.



(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Per2* na glândula pineal de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p=0,0005$ para o fator ZT, $p=0,1757$ para o fator cirurgia e $p = 0,5302$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0287$ para o grupo CTL e $p = 0,0407$ para o grupo GCSx. $n = 8$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Per2* na glândula pineal de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p<0,0001$ para os fatores ZT e interação e $p = 0,0013$ para o fator cirurgia. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL e $p = 0,0002$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Per2*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com $p > 0,05$. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Ao serem submetidos a análise Cosinor, foi observada variação rítmica tanto em animais controles, quanto em animais ganglionectomizados, podendo-se avaliar os parâmetros obtidos (Figuras 21A e B). Apenas a ganglionectomia por 10 dias resultou em redução do mesor (Figura 21C), enquanto que a amplitude não foi afetada nem pela cirurgia e nem pela duração do protocolo (Figura 21D). Independentemente do tempo de protocolo a remoção do gânglio cervical superior adiantou a acrofase de *Per2* (Figura 39).

Figura 21 – Perfil diário de RNAm do gene *Per2* na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.



(A) Perfis diários de expressão de *Per2* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Per2* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 dias e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com * $p = 0,0208$ vs CTL 10 dias. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 dias e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $p > 0,05$ em todas as combinações. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro

Desse modo, nota-se que a ausência da estimulação noradrenérgica na glândula pineal altera a expressão de todos os elementos negativos da alça primária do oscilador molecular deste órgão, seja abolindo o ritmo, como no caso dos genes *Cry1* e *Cry2*, ou alterando os parâmetros rítmicos, como mesor, amplitude e acrofase dos genes *Per1* e *Per2*.

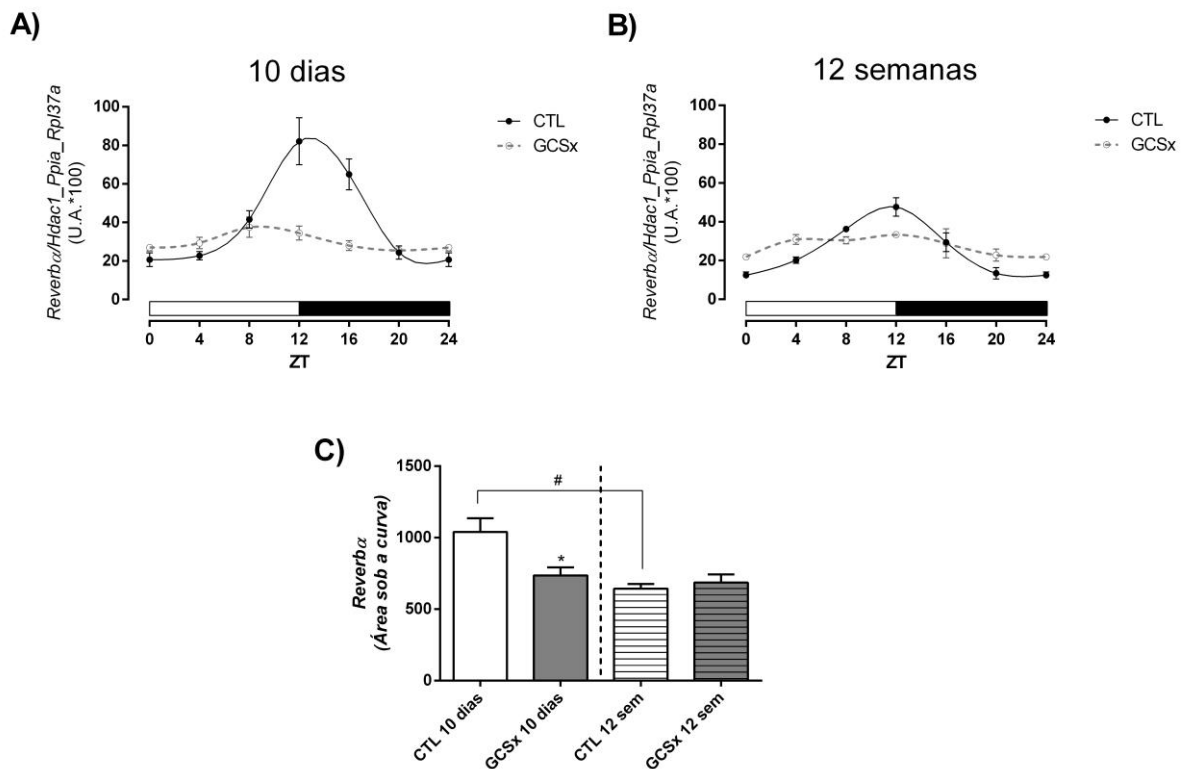
5.2 Perfil circadiano do gene da alça secundária do oscilador da glândula pineal

Com relação à alça secundária do oscilador, o gene analisado por PCR em tempo real foi o *Rev-erba*.

5.2.1 *Rev-erba* na glândula pineal

No que se refere ao gene da alça secundária do oscilador molecular, viu-se que na glândula pineal os grupos controles apresentaram variação ao longo das 24 h e que tal variação foi perdida após o animal ser submetido à ablação do gânglio cervical superior (Figuras 22A e B). A curto prazo, além de alterar a variação da expressão circadiana do gene, a remoção da inervação simpática resultou em uma redução de sua expressão, observada através da redução da área sob a curva de nos animais ganglionectomizados por 10 dias (Figura 22C).

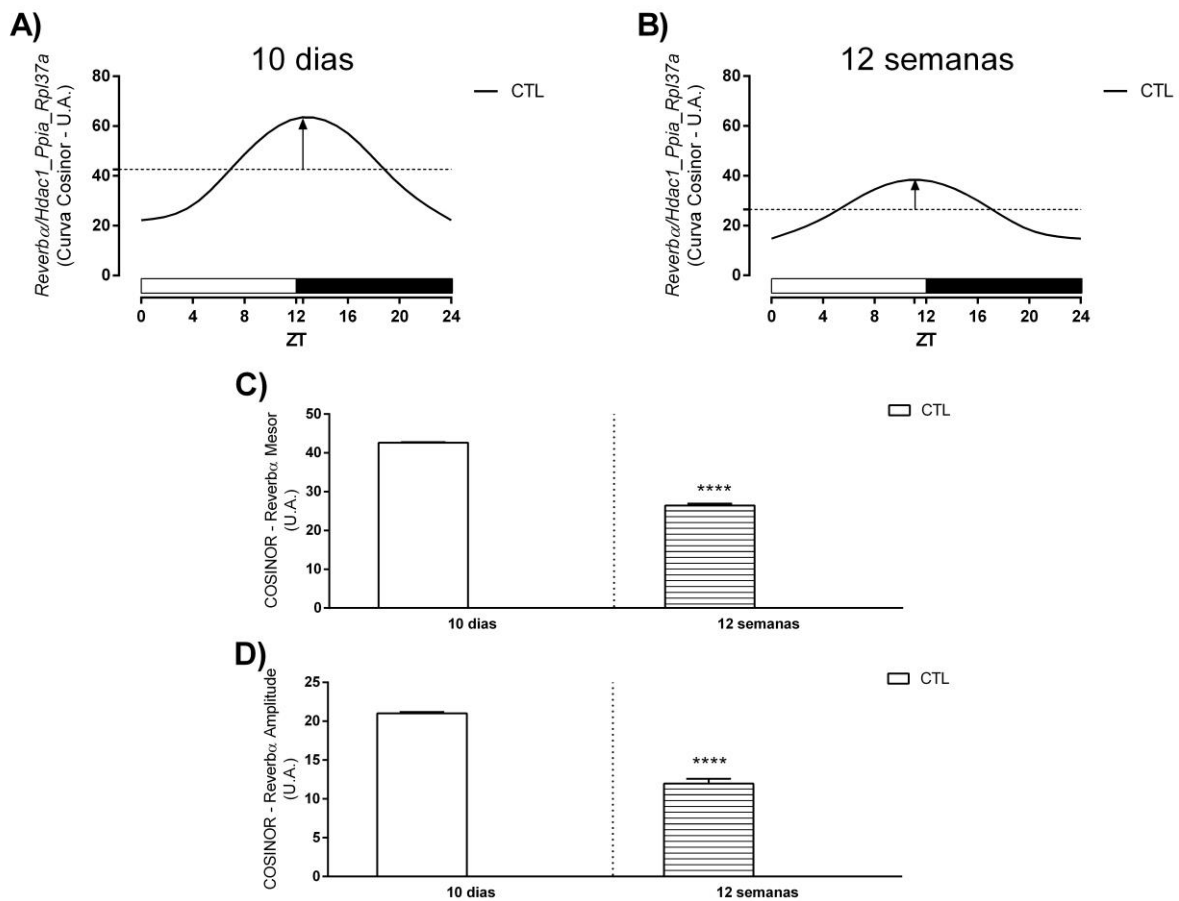
Figura 22 – Perfil diário de RNAm do gene *Reverba* (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.



(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Reverba* na glândula pineal de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os fatores ZT e interação e $p = 0,0006$ para o fator cirurgia. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL e $p = 0,0573$ para o grupo GCSx. $n = 8$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Reverba* na glândula pineal de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,1441$ para o fator cirurgia e $p = 0,0018$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL e $p = 0,1734$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Reverba*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com * $p = 0,0161$ vs CTL 10 dias; # $p = 0,0181$ vs CTL 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Ao serem submetidas à análise Cosinor, as curvas de expressão de *Reverba* dos animais controles foram ajustadas à curva cosseno, demonstrando assim a existência da variação rítmica (Figura 23 A e B). Com a perda da variação ao longo das 24 h nos animais mediante a ausência da inervação simpática na glândula pineal, apenas os parâmetros rítmicos dos grupos controles foram analisados, e viu-se que a duração do protocolo experimental foi capaz de alterar os parâmetros rítmicos analisados: houve redução de mesor e amplitude (Figuras 23C e D, respectivamente) e um adiantamento da acrofase desse gene (Figura 39).

Figura 23 – Perfil diário de RNAm do gene *Reverba* na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.



(A) Perfis diários de expressão de *Reverba* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Reverba* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 dias e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com **** $p < 0,0001$ vs CTL 10 dias. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 dias e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com **** $p < 0,0001$ vs CTL 10 dias. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Demonstrando assim, que não apenas a alça primária do oscilador molecular é afetada após a remoção bilateral do gânglio cervical superior, mas também a alça secundária, aqui

representada pela expressão do gene *Reverba*, cuja variação rítmica foi completamente abolida pela cirurgia, de maneira irreversível já que em 12 semanas também não foi encontrada variação rítmica.

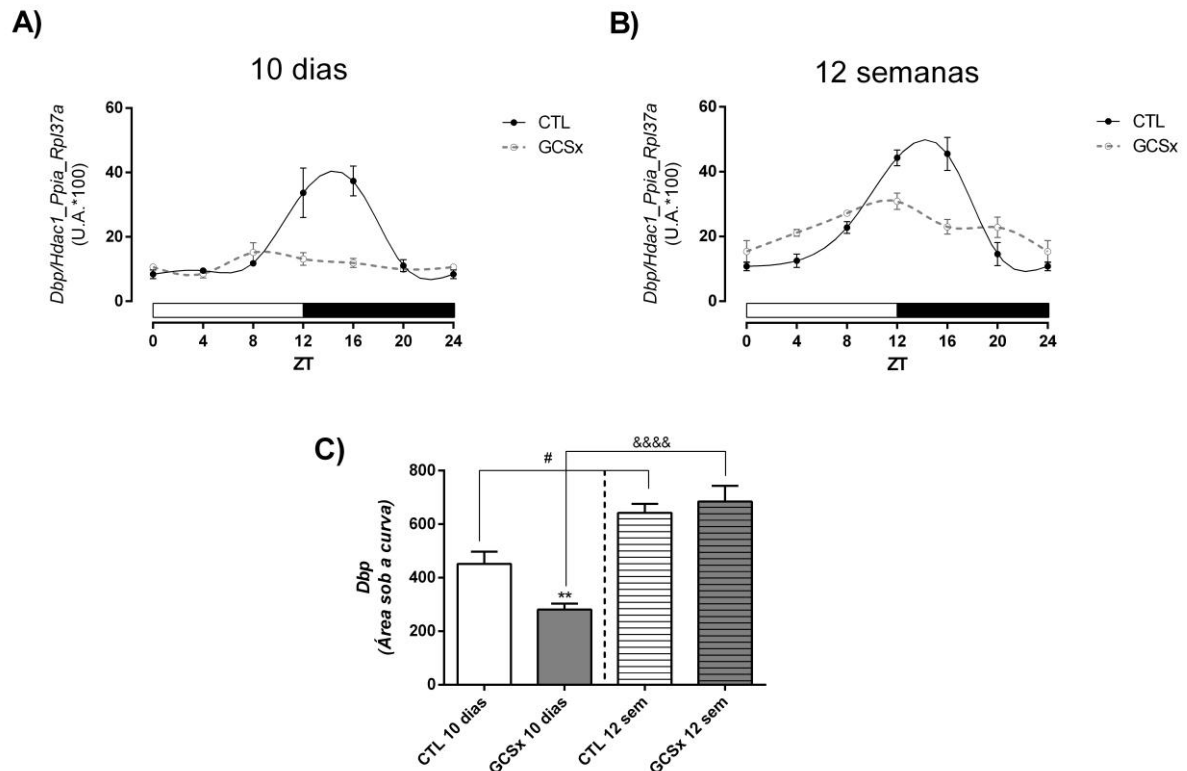
5.3 Perfil circadiano de gene dependente do relógio na glândula pineal

Para analisar se as alterações vistas comprometeriam a saída do oscilador, um gene dependente do relógio foi analisado.

5.3.1 Dbp

Assim como o esperado, viu-se variação ao longo do dia na expressão de *Dbp* nos grupos controles e apenas a cirurgia por um curto prazo foi capaz de abolir essa variação (Figura 24 A e B) e reduzir sua expressão (Figura 24 C). Concomitante a isso, a duração do protocolo experimental alterou a expressão do gene *Dbp*, levando ao seu aumento em ambos os grupos estudados (Figura 24 C).

Figura 24 – Perfil diário de RNAm do gene *Dbp* (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.

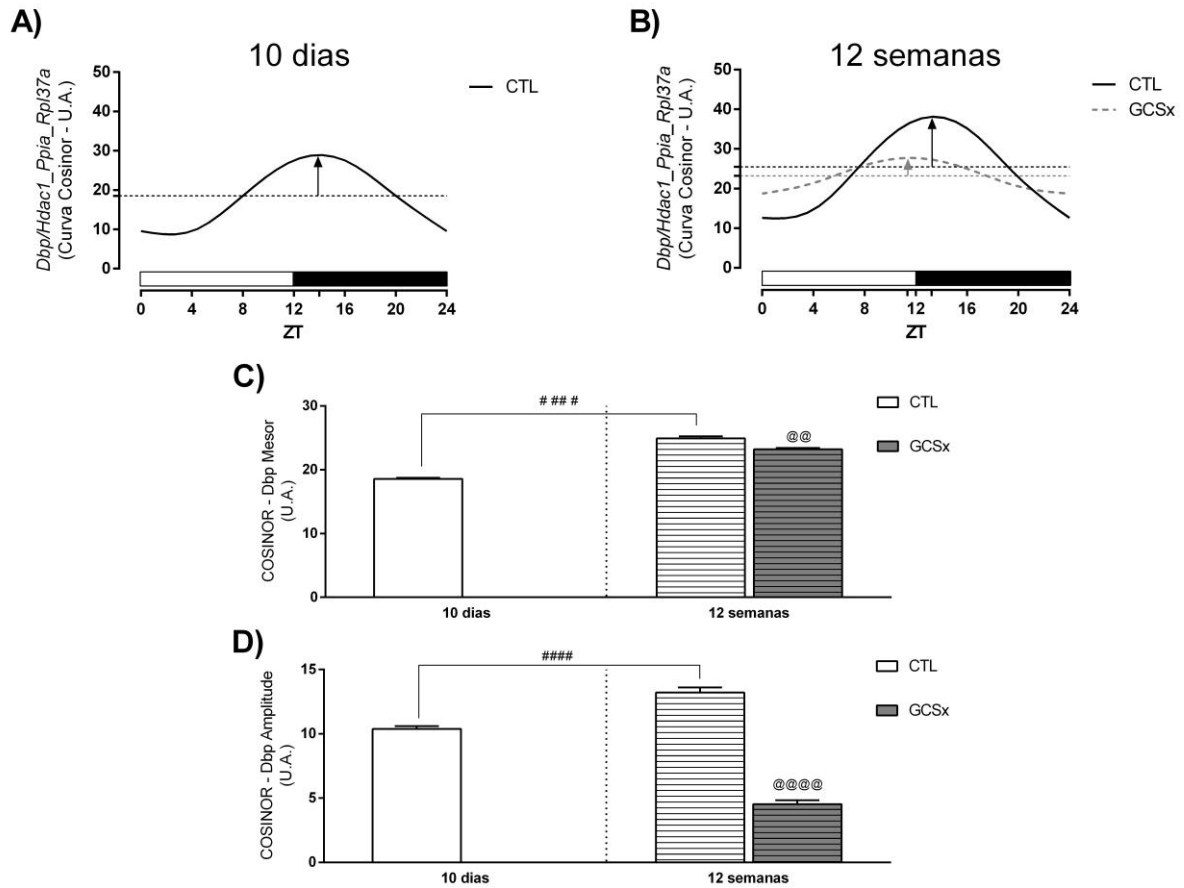


(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Dbp* na glândula pineal de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os fatores ZT e interação e $p = 0,0004$ para o fator cirurgia. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL e $p = 0,1083$ para o grupo GCSx. $n = 8$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Dbp* na glândula pineal de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os fatores ZT e interação e $p = 0,5931$ para o fator cirurgia. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL e $p = 0,0106$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Dbp*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com $**p = 0,0048$ vs CTL 10 dias; $\#p = 0,0210$ vs CTL 10 dias e $\&\&\&p < 0,0001$ vs GCSx 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Após a análise rítmica pelo método Cosinor, viu-se ritmicidade circadiana em todas as curvas testadas, demonstrando que apesar de abolir a ritmicidade a curto prazo, esse quadro foi reversível de forma que com 12 semanas de ganglionectomia a ritmicidade circadiana na expressão do gene *Dbp* foi encontrada (Figuras 25A e B). Porém, apesar de ter seu ritmo restaurado durante o período experimental, os parâmetros rítmicos permaneceram alterados já que houve a redução dos parâmetros mesor e amplitude (Figuras 25C e D), além de haver adiantamento da acrofase (Figura 39) devido à ganglionectomia. Independentemente da cirurgia em si, a duração do protocolo experimental resultou em modificações nos parâmetros rítmicos

observados nos animais controles, como o aumento de mesor e amplitude (Figuras 25C e D) e adiantamento da acrofase (Figura 39).

Figura 25 – Perfil diário de RNAm do gene *Dbp* na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.



(A) Perfis diários de expressão de *Dbp* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Dbp* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 dias e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com @p = 0,0039 vs CTL 12 semanas; ####p < 0,0001 vs CTL 10 dias. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 dias e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com @@@p < 0,0001 vs CTL 12 semanas; #####p < 0,0001 vs CTL 10 dias. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

A partir desse resultado viu-se que as alterações no oscilador molecular da glândula pineal geradas pela ausência da noradrenalina foram relevantes ao ponto de alterar a regulação do gene dependente do relógio, *Dbp*, e talvez de outros genes dependentes do relógio responsáveis pela fisiologia celular da pineal.

5.4 Perfil circadiano de genes envolvidos na produção de melatonina pineal

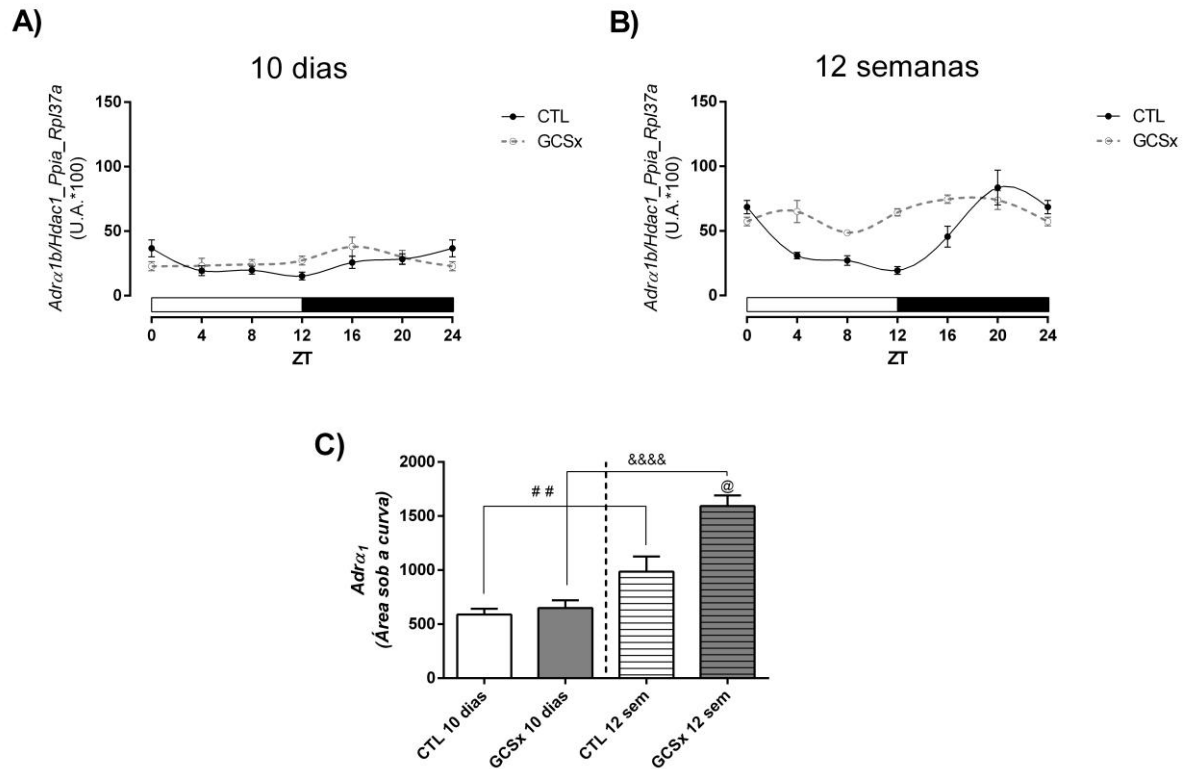
Sabendo-se que a ganglionectomia por 10 e por 12 semanas geraram importantes alterações no oscilador molecular da glândula pineal, tornou-se interessante avaliar como se encontra a fisiologia da glândula após esse período. Para tanto, avaliou-se através da técnica de PCR em tempo real, uma série de genes envolvidos na manutenção da principal função fisiológica da glândula pineal, a síntese de melatonina.

5.4.1 Receptores adrenérgicos: *Adra1b* e *Adrβ* na glândula pineal

A síntese de melatonina na glândula pineal se inicia após a interação da noradrenalina com os receptores noradrenérgicos, α_{1b} e β_1 . Sendo esses, portanto, os primeiros genes a serem avaliados.

Através da avaliação da expressão gênica do receptor adrenérgico α_{1b} (*Adra1b*), viu-se a variação ao longo das 24 h nos grupos controles e no grupo ganglionectomizado por 12 semanas, de forma que a curto prazo houve eliminação da variação diária observada (Figuras 26A e C). Além disso, após 12 semanas da ausência de inervação simpática na glândula pineal, notou-se um aumento da expressão de *Adra1b* nos animais ganglionectomizados (Figuras 26B e C). A duração do protocolo experimental também foi capaz de alterar a expressão desse gene, já que se observou o aumento da área sob a curva dos animais controles (Figura 26C).

Figura 26 – Perfil diário de RNAm do gene *Adra_{1b}* (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.

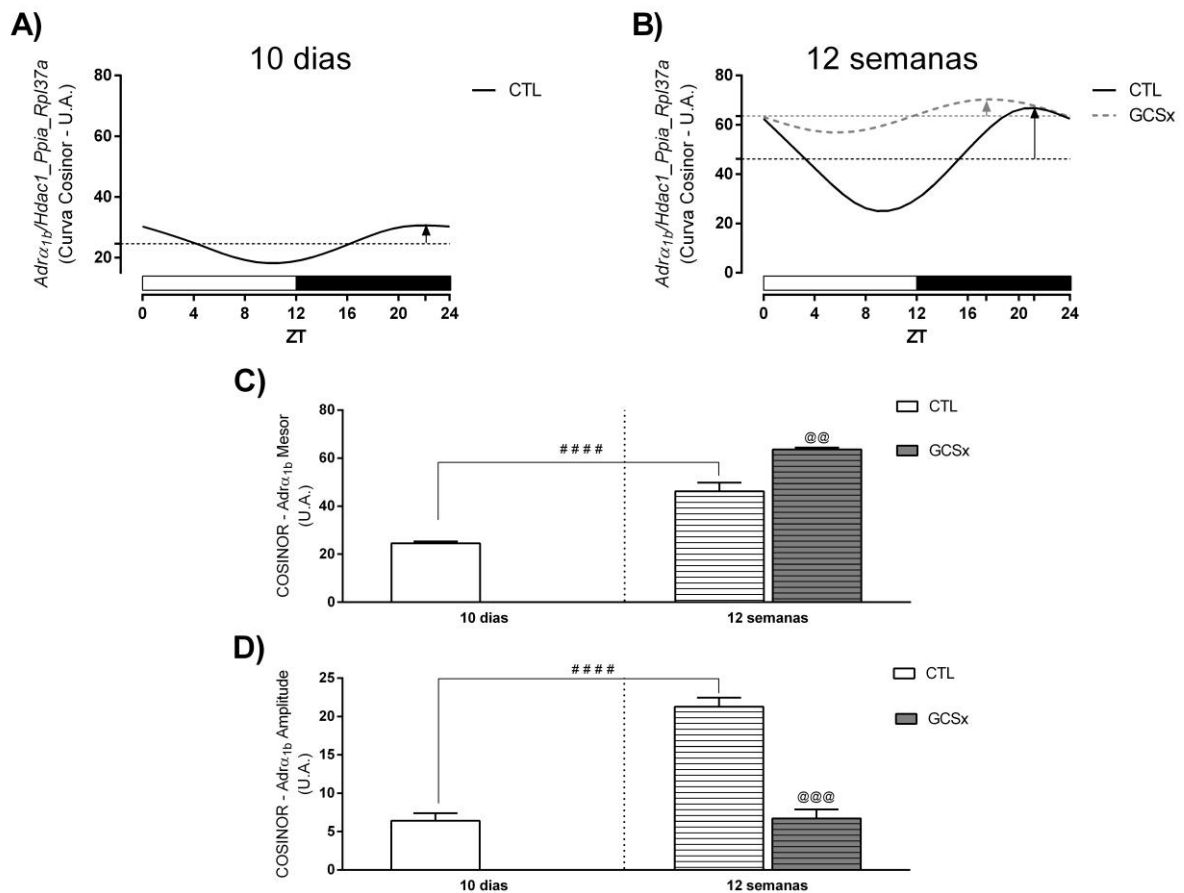


(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Adra_{1b}* na glândula pineal de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p=0,0913$ para o fator ZT, $p=0,7218$ para o fator cirurgia e $p=0,0913$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0101$ para o grupo CTL e $p = 0,2540$ para o grupo GCSx. $n = 8$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Adra_{1b}* na glândula pineal de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os fatores ZT e interação e $p = 0,0003$ para o fator cirurgia. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL e $p = 0,0435$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Adra_{1b}*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com @ $p = 0,0120$ vs CTL 12 semanas; # $p = 0,008$ vs CTL 10 dias e &&&& $p < 0,0001$ vs GCSx 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores x 100 para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Após a análise individual do perfil de expressão das curvas que exibiram variação ao longo das 24 h, viu-se que de todas elas apresentaram ritmicidade circadiana e que, portanto, a longo prazo a remoção do gânglio cervical superior não foi capaz de abolir o ritmo de expressão desse gene (Figuras 27A e B), como o visto a curto prazo. Apesar de não promover a abolição do ritmo, a ausência da inervação simpática na glândula pineal levou ao amortecimento desse ritmo, observado através da redução do parâmetro amplitude (Figura 27D) e ao aumento da expressão gênica desse receptor, visto através do aumento do mesor (Figura 27). Adicionalmente, viu-se também o adiantamento da fase após 12 semanas (Figura 39). Além

disso, após 12 semanas houve o aumento de expressão do gene *Adra1b* nos animais controles (Figuras 27C e D), demonstrando um efeito da idade do animal na expressão desse gene em ratos.

Figura 27 – Perfil diário de RNAm do gene *Adra1b* na glândula pineal analisado pelo método Cosinor

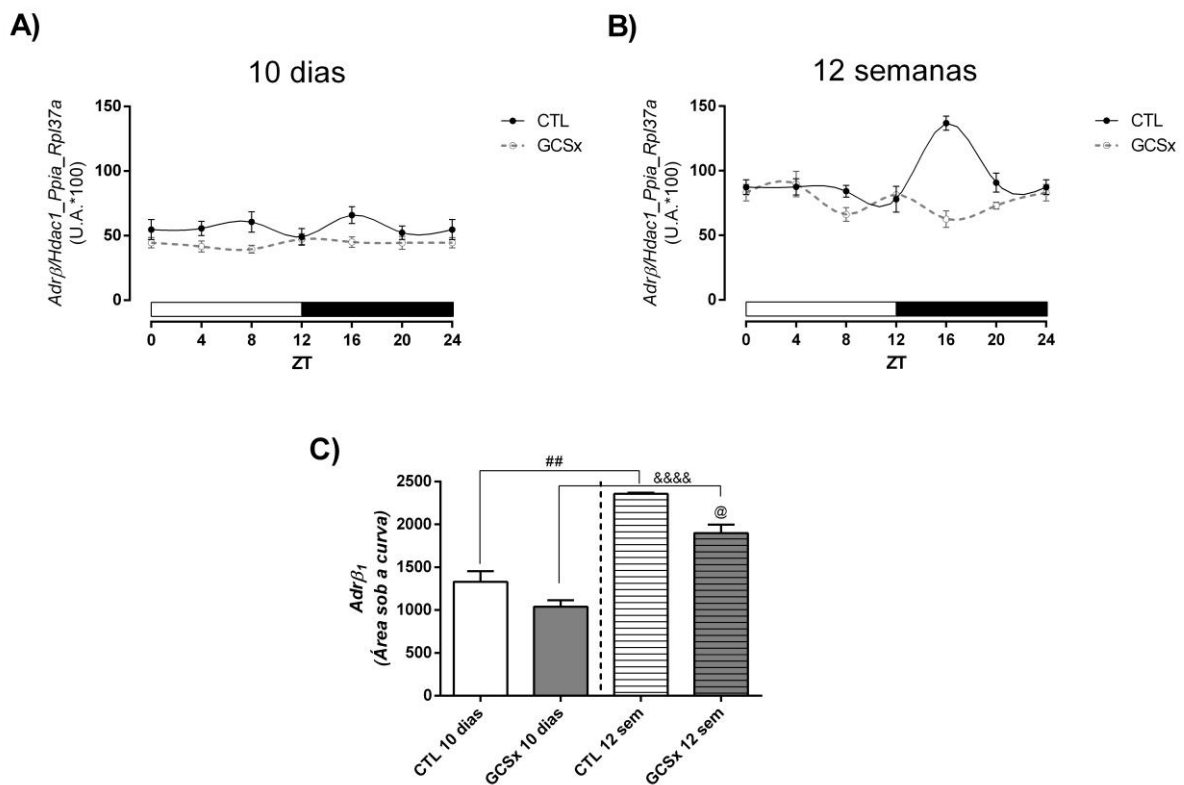


(A) Perfis diários de expressão de *Adra1b* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Adra1b* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 dias e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com @@p = 0,0032 vs CTL 12 semanas; #####p < 0,0001 vs CTL 10 dias. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 dias e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com @@@@p = 0,0001 vs CTL 12 semanas; ##### p < 0,0001 vs CTL 10 dias. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

A expressão do receptor β_1 adrenérgico (*Adrb*), o principal envolvido da síntese de melatonina, respondeu diferentemente à ganglionectomia de curto ou longo prazo. Após 10 dias de intervenção cirúrgica (ou aplicação de anestésico), não foram encontradas variações ao longo das 24 h em nenhum dos grupos (Figura 28A), porém após 12 semanas observou-se variação apenas no grupo controle (Figura 28B). Nos animais ganglionectomizados a ausência de

variação ao longo das 24 h permaneceu, levando a crer que a ausência da inervação simpática na glândula pineal por 12 semanas levou à abolição das alterações circadianas (Figura 28B), já que a variação encontrada nos animais controles do protocolo de 12 semanas não foi mantida. Além da ausência de variação ao longo das 24 h, viu-se que a ablação do gânglio cervical superior por 12 semanas também levou à redução da expressão de *Adrb β* (Figura 28C) quando comparado aos animais controles.

Figura 28 – Perfil diário de RNAm do gene *Adrb β* (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.

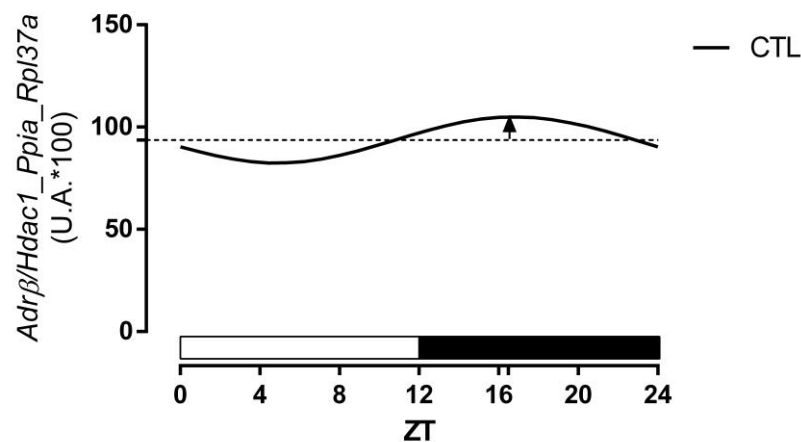


(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Adrb β* na glândula pineal de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p=0,8618$ para o fator ZT, $p<0,0001$ para o fator cirurgia e $p=0,5547$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,6616$ para o grupo CTL e $p = 0,8814$ para o grupo GCSx. $n = 8$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Adrb β* na glândula pineal de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p<0,0001$ para os fatores cirurgia e interação e $p = 0,0290$ para o fator ZT. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL e $p = 0,0817$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Adrb β* , avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com @ $p = 0,0113$; ## $p = 0,0091$ vs CTL 10 dias e &&&& $p < 0,0001$ vs GCSx 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Apenas a curva de expressão dos animais controles no protocolo de 12 semanas foi submetida à análise Cosinor, no qual foi constatada a presença de ritmicidade circadiana (Figura 29) e a determinação dos parâmetros rítmicos: mesor, amplitude e acrofase (Figuras 29 e 39).

Portanto, a ausência da inervação simpática na glândula pineal levou a alterações na expressão gênica dos receptores adrenérgicos, principalmente quando a falta do estímulo noradrenérgico permaneceu por 12 semanas.

Figura 29 – Perfil diário de RNAm do gene *Adrβ₁* na glândula pineal analisado pelo método Cosinor



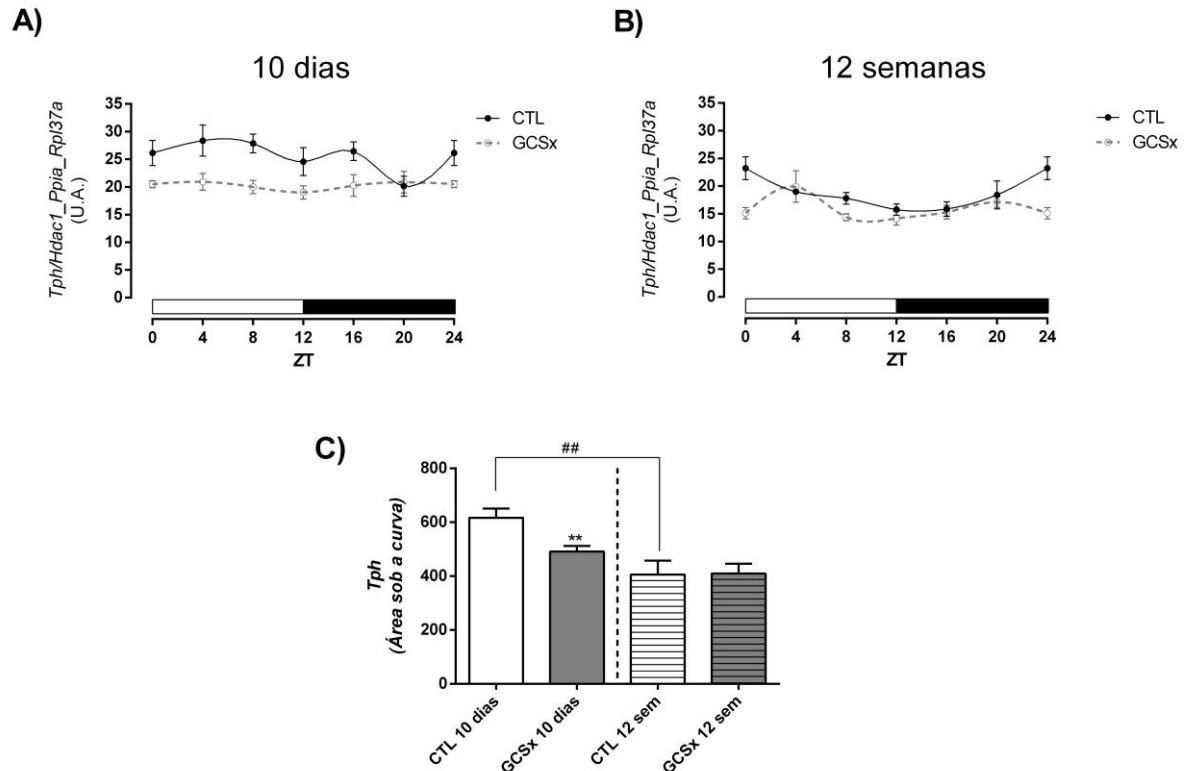
Perfil diário de expressão de *Adrβ₁* na glândula pineal de animais controles sob o protocolo de 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Além dos receptores, para avaliar os efeitos da retirada do gânglio cervical superior na síntese de melatonina, se fez necessária a avaliação da expressão gênica das enzimas relacionada à síntese desse hormônio.

5.4.2 Triptofano hidroxilase (*Tph*)

Através da análise da expressão gênica da primeira enzima da via de síntese de melatonina, a *Tph*, viu-se que apenas nos animais controles sob o protocolo experimental de 12 semanas houve variação da expressão ao longo das 24 h (Figuras 30 A e B). Além disso, a ganglionectomia a curto prazo foi capaz de reduzir a expressão desse gene (Figura 30 C), porém esse quadro foi revertido após 12 semanas. Viu-se também um efeito do tempo sob a expressão de *Tph* já que a área sob a curva reduziu após 12 semanas nos animais controles (Figura 30 C).

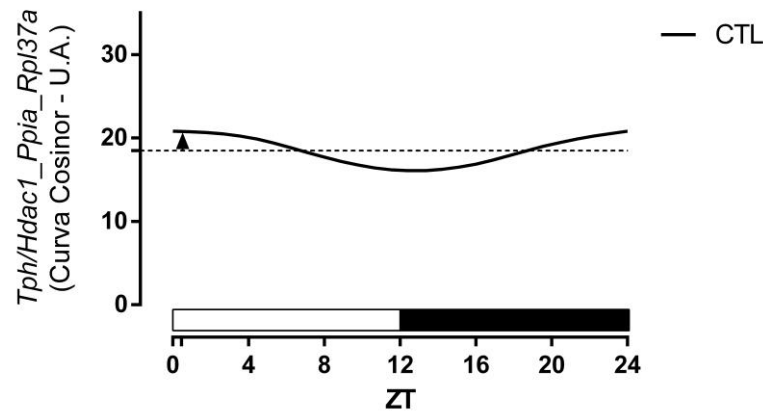
Figura 30 – Perfil diário de RNAm do gene *Tph* (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.



(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Tph* na glândula pineal de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p=0,3878$ para o fator ZT, $p<0,0001$ para o fator cirurgia e $p=0,3272$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,1853$ para o grupo CTL e $p = 0,9683$ para o grupo GCSx. $n = 8$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Tph* na glândula pineal de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0007$ para o fator cirurgia, $p = 0,0243$ para o fator ZT e $p=0,034$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0221$ para o grupo CTL e $p = 0,1520$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Tph*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com ** $p = 0,0083$ vs CTL 10 dias; ## $p = 0,0063$ vs CTL 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Apenas a curva de expressão de *Tph* dos animais controles no protocolo de 12 semanas foi submetida à análise Cosinor, no qual foi constatada a presença de ritmicidade circadiana (Figura 31).

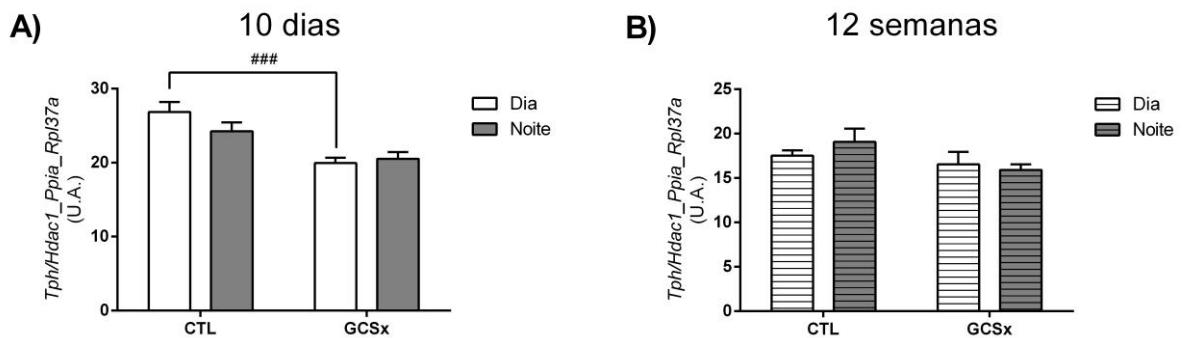
Figura 31 – Perfil diário de RNAm do gene *Tph* na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.



Perfil diário de expressão de *Tph* na glândula pineal de animais controles sob o protocolo de 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Apesar da ritmicidade observada nos animais controles após 12 semanas de protocolo, não houve diferenças entre a expressão total do gene *Tph* durante a noite e durante o dia em nenhum dos grupos analisados independentemente do tempo de protocolo. A ganglionectomia por 10 dias foi capaz apenas de reduzir a produção diária de *Tph* (Figura 32).

Figura 32 – Expressão gênica diurna e noturna do *Tph* na glândula pineal



(A) Expressão diurna e noturna do gene *Tph* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados no protocolo de 10 dias. ANOVA bi fatorial, seguida de pós-teste Bonferroni com múltiplas comparações, com $p < 0,0001$ para o fator cirurgia. ### $p < 0,001$ vs CTL 10 dias, $n = 8$. (B) Expressão diurna e noturna do gene *Tph* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados no protocolo de 12 semanas. ANOVA bi fatorial, seguida de pós-teste Bonferroni com múltiplas comparações, com $p > 0,05$ para os fatores cirurgia, fase e interação. $n = 4$.

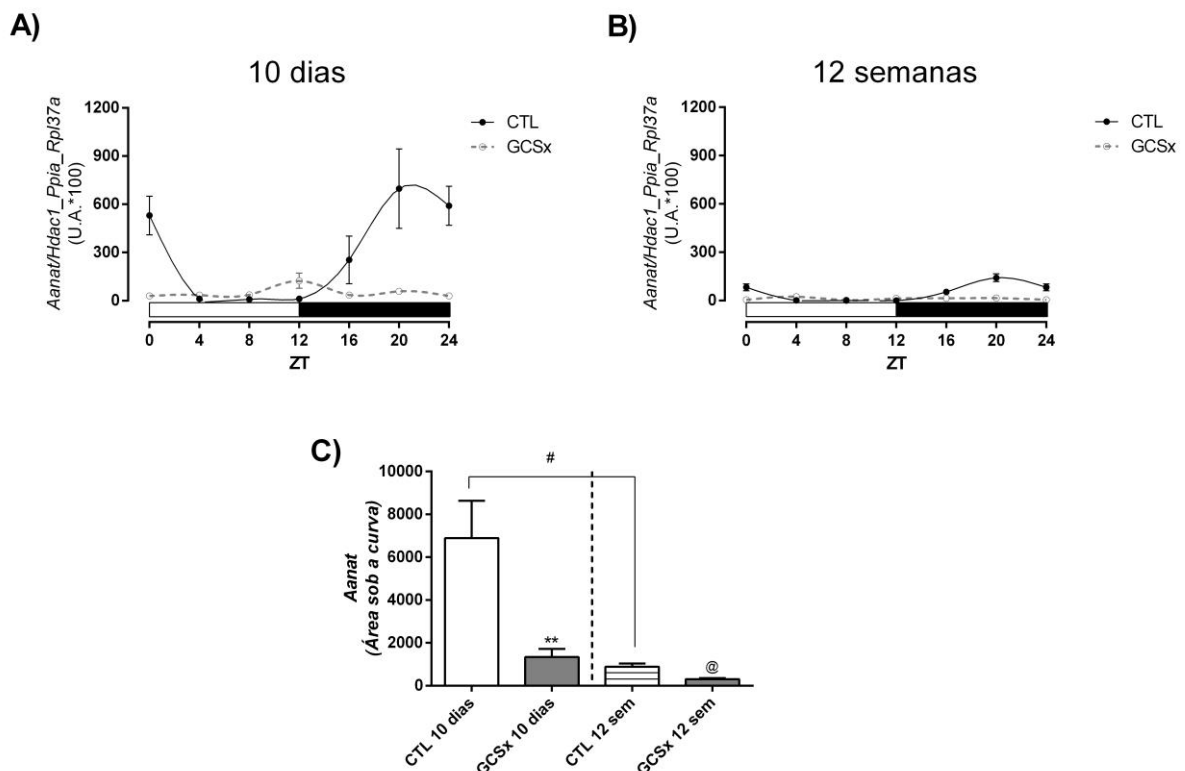
5.4.3 Arilalquilamina-*N*-acetiltransferase (*Aanat*)

Para a expressão gênica da *Aanat*, a ganglionectomia de curto prazo alterou radicalmente essa expressão que, apesar de uma aparente ritmicidade diária mantida, teve sua magnitude e amplitude muito reduzida. Essa redução dos níveis de *Aanat*, permaneceram

reduzidos mesmo após as 12 semanas (Figura 33A e B). Além do efeito da cirurgia sob a expressão de *Aanat*, a idade aparentemente também exerceu efeito reduzindo a expressão da *Aanat* como observado através da redução da área sob a curva no grupo controle após 12 semanas de protocolo (Figura 33C).

Para avaliar se tais variações exibiam ritmicidade circadiana, todos os grupos foram submetidos à análise do método Cosinor (Figuras 34A e B).

Figura 33 – Perfil diário de RNAm do gene *Aanat* (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.

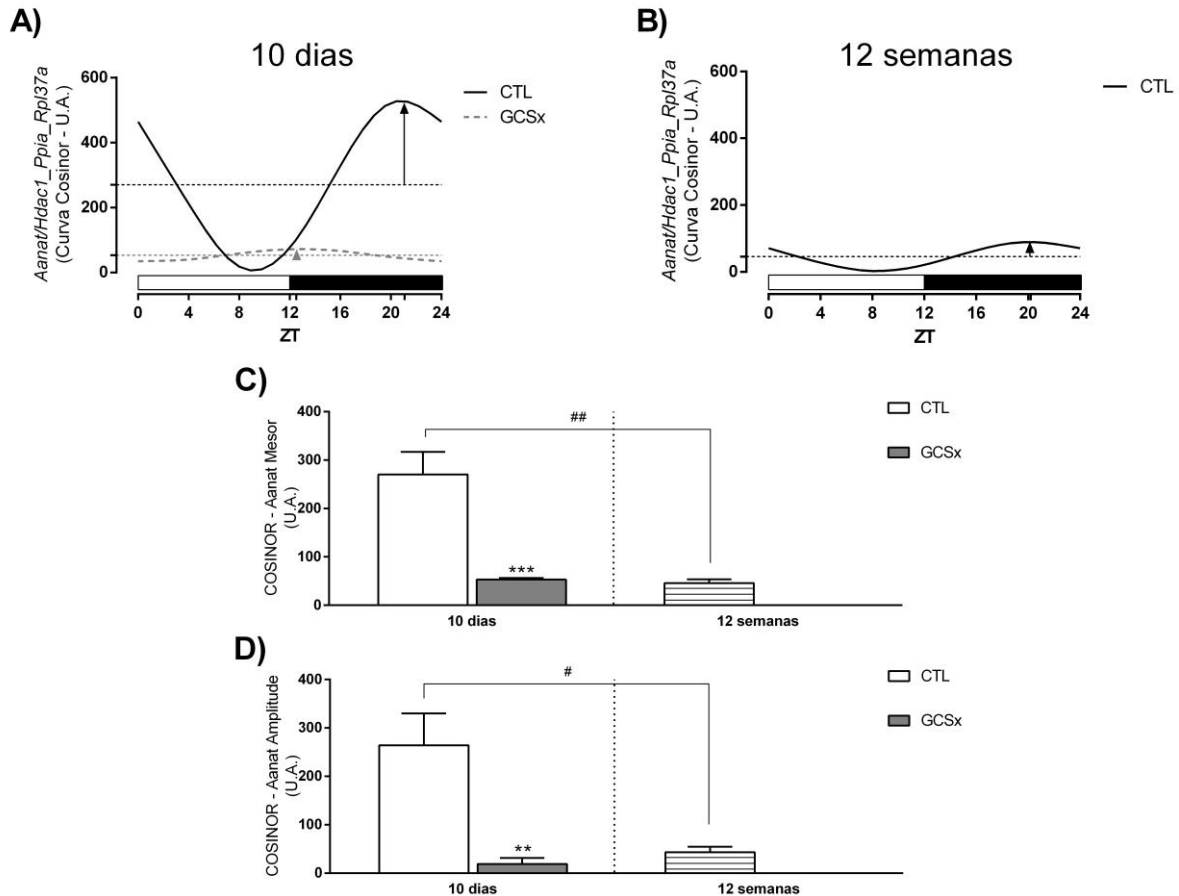


(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Aanat* na glândula pineal de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os fatores ZT, cirurgia e interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL e $p = 0,0317$ para o grupo GCSx. $n = 8$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Aanat* na glândula pineal de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os fatores ZT, cirurgia e interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL e $p = 0,0020$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Aanat*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com ** $p = 0,0057$ vs CTL 10 dias; @ $p = 0,0109$ vs CTL 12 semanas e # $p = 0,0324$ vs CTL 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Após ajuste à curva cosseno, viu-se que a variação observada nos animais controles, após 10 e 12 semanas de cirurgia, foi considerada circadiana (Figura 34 A e B). Após 10 dias, a remoção do gânglio cervical superior, alterou o perfil de expressão da *Aanat*, que apesar de

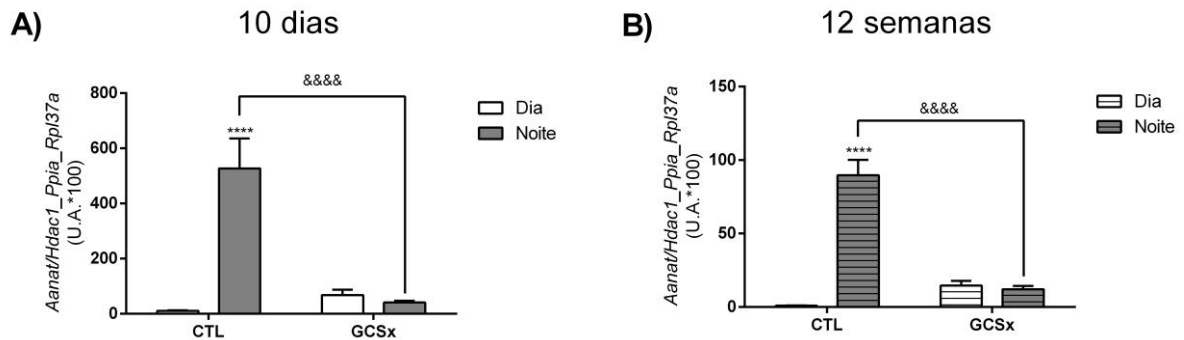
ainda exibir ritmicidade, teve redução de seu mesor e amplitude (Figuras 34 C e D) e adiantamento da acrofase (Figura 39). A duração do protocolo também levou à redução do mesor e amplitude da expressão da *Aanat* nos animais controles (Figuras 34 C e D), mas não teve efeito sobre a acrofase.

Figura 34 – Perfil diário de RNAm do gene *Aanat* na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.



(A) Perfis diários de expressão de *Aanat* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Aanat* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 dias e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com *** $p = 0,0004$ vs GCSx 10 dias; ## $p = 0,0082$ vs CTL 10 dias. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 dias e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com ** $p = 0,0026$ vs GCSx 10 dias; # $p = 0,0440$ vs CTL 10 dias. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Após a ganglionectomia, a variação entre a expressão de *Aanat* durante o dia e a noite não foi mais encontrada, levando à valores semelhantes durante a noite e o dia devido à redução dos valores noturnos e uma tendência ao aumento dos valores diurnos (Figura 35).

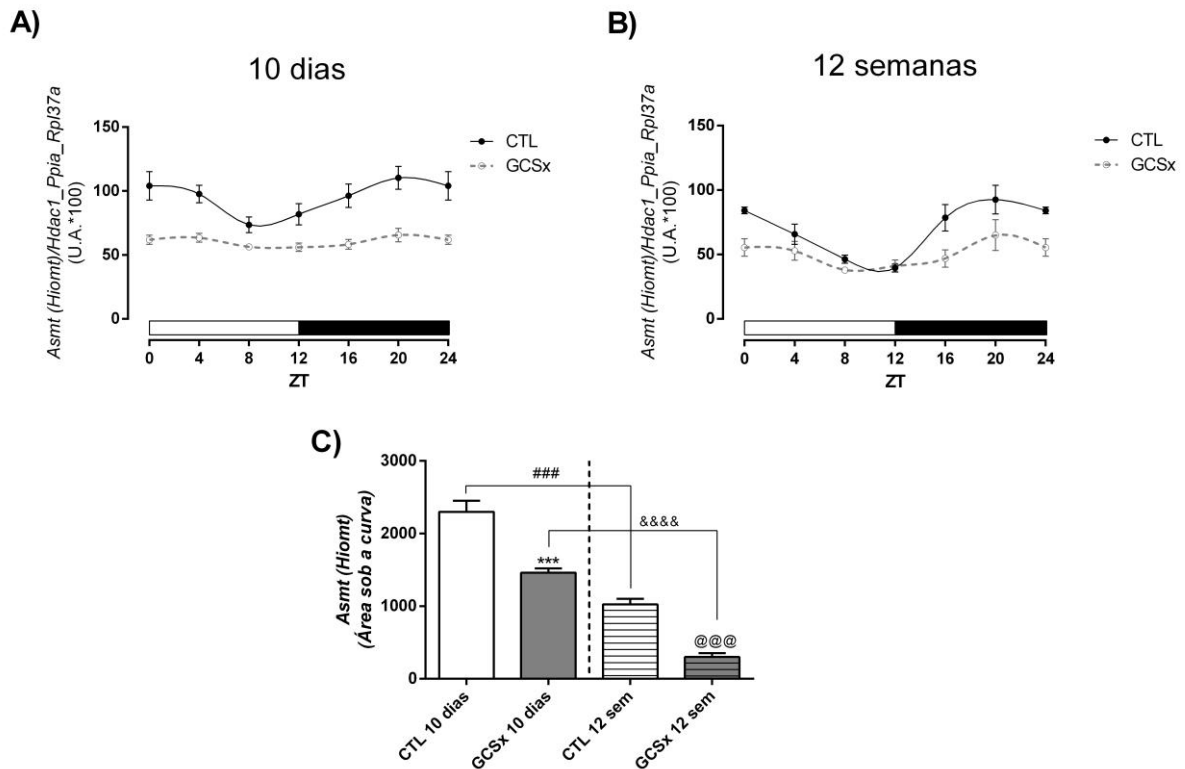
Figura 35 – Expressão gênica diurna e noturna a *Aanat* na glândula pineal

Expressão diurna e noturna do gene *Aanat* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados no protocolo de 10 dias. ANOVA bi fatorial, seguida de pós-teste Bonferroni com múltiplas comparações, com $p < 0,0001$ para os fatores interação, cirurgia e fase. **** $p < 0,0001$ vs CTL dia; &&&& $p < 0,0001$ vs CTL noite, $n = 8$. (B) Expressão diurna e noturna do gene *Aanat* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados no protocolo de 12 semanas. ANOVA bi fatorial, seguida de pós-teste Bonferroni com múltiplas comparações, com $p < 0,0001$ para os fatores interação, cirurgia e fase, **** $p < 0,0001$ vs CTL dia; &&&& $p < 0,0001$ vs CTL noite, $n = 4$.

5.4.4 Acetil-serotonina *O*-metiltransferase / Hidroxindol-*O*-metil-transferase (*Asmt*/*Hiomt*)

Por fim, a análise da última enzima da via de síntese da melatonina, a *Asmt* (*Hiomt*), mostrou variação da expressão gênica ao longo das 24 h apenas no grupo controle submetido ao protocolo de 12 semanas (Figura 36 A e B). A ausência da noradrenalina na glândula pineal fez com que a expressão de *Asmt* (*Hiomt*) no grupo ganglionectomizado fosse menor quando comparado ao grupo controle (Figura 36 C), tanto no protocolo de 10 dias, quanto no de 12 semanas. A duração do protocolo também é um fator que influencia a expressão gênica da *Asmt* (*Hiomt*) já que houve redução da área sob a curva em ambos os grupos após 12 semanas (Figura 36 C).

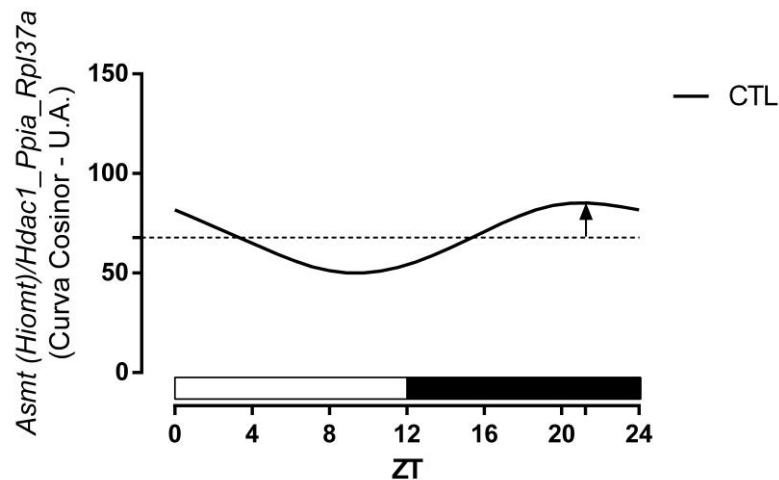
Figura 36 – Perfil diário de RNAm do gene *Asmt* (*Hiomt*) (grupos controle e ganglionectomizado) na glândula pineal.



(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Asmt* (*Hiomt*) na glândula pineal de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0108$ para o fator ZT, $p < 0,0001$ para o fator cirurgia e $p = 0,3695$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0639$ para o grupo CTL e $p = 0,4458$ para o grupo GCSx. $n = 8$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Asmt* (*Hiomt*) na glândula pineal de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os fatores ZT e cirurgia e $p = 0,2878$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0008$ para o grupo CTL e $p = 0,2488$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Asmt* (*Hiomt*), avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com $***p = 0,0002$ vs CTL 10 dias; $@@@p = 0,0004$ vs CTL 12 semanas e $###p = 0,0008$ vs CTL 10 dias; $&&&p < 0,0001$. Dados plotados como média \pm EPM. Valores x 100 para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Apenas a curva de expressão gênica de *Asmt* (*Hiomt*) dos animais controles no protocolo de 12 semanas foi submetida à análise Cosinor, no qual foi constatada a presença de ritmicidade circadiana (Figura 37).

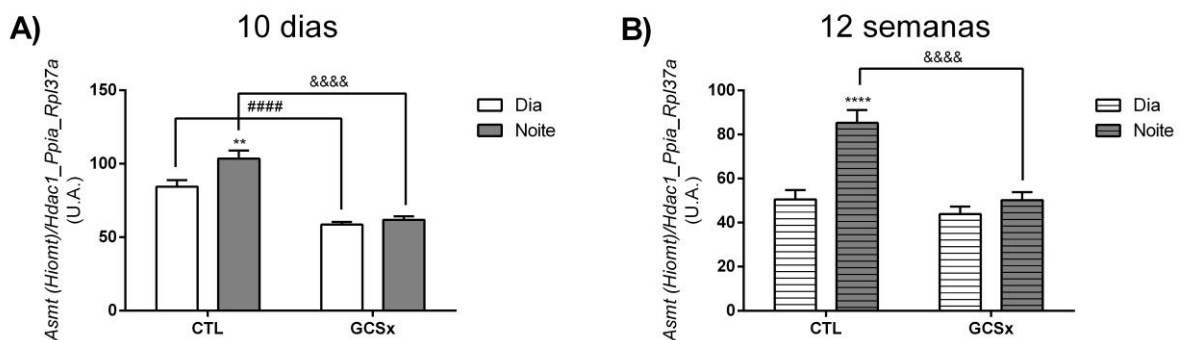
Figura 37 – Perfil diário de RNAm do gene *Hiomt/Asmt* na glândula pineal analisado pelo método Cosinor.



Perfil diário de expressão de *Asmt (Hiomt)* na glândula pineal de animais controles sob o protocolo de 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

A ablação bilateral do gânglio cervical aboliu a variação entre a produção diurna e noturna da *Asmt (Hiomt)*, tanto por 10 dias, quanto por 12 semanas (Figura 38), principalmente pela redução dos valores noturnos.

Figura 38 – Expressão gênica diurna e noturna da *Asmt (Hiomt)* na glândula pineal



Expressão diurna e noturna do gene *Asmt (Hiomt)* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados no protocolo de 10 dias. ANOVA bi fatorial, seguida de pós-teste Bonferroni com múltiplas comparações, com $p < 0,05$ para os fatores interação, cirurgia e fase. ** $p < 0,01$ vs CTL dia; ##### $p < 0,0001$ vs CTL dia; &&&& $p < 0,0001$ vs CTL noite, $n = 8$. (B) Expressão diurna e noturna do gene *Asmt (Hiomt)* na glândula pineal de animais controles e ganglionectomizados no protocolo de 12 semanas. ANOVA bi fatorial, seguida de pós-teste Bonferroni com múltiplas comparações, com $p < 0,05$ para os fatores interação, cirurgia e fase, **** $p < 0,0001$ vs CTL dia; &&&& $p < 0,0001$ vs CTL noite, $n = 4$.

Portanto, além de alterar a expressão gênica dos receptores adrenérgicos, a ausência da inervação simpática na glândula pineal também resultou em alterações rítmicas e/ou nos níveis de expressão de todos os genes que codificam as enzimas envolvidas na via de síntese da melatonina, alterando assim, o seu perfil de secreção, principalmente a longo prazo.

5.5 Mapa de acrofases

A Figura 39 mostra o mapa das acrofases dos genes que exibiram variação circadiana rítmica após análise pelo Cosinor. Os que não apresentaram variação ao longo das 24 h não puderam ter suas acrofases determinadas, como o *Clock*.

A curto prazo, a ablação do gânglio cervical superior e consequente ausência de estimulação noradrenérgica na glândula pineal, alterou drasticamente a expressão de alguns genes a ponto de abolir seus ritmos, como o visto na análise do *Adra_{1b}*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erba* e *Dbp*. Após as 12 semanas, *Adra_{1b}* e *Dbp* voltaram a apresentar ritmicidade em sua expressão gênica, apesar de ainda apresentarem alterações em seus parâmetros rítmicos.

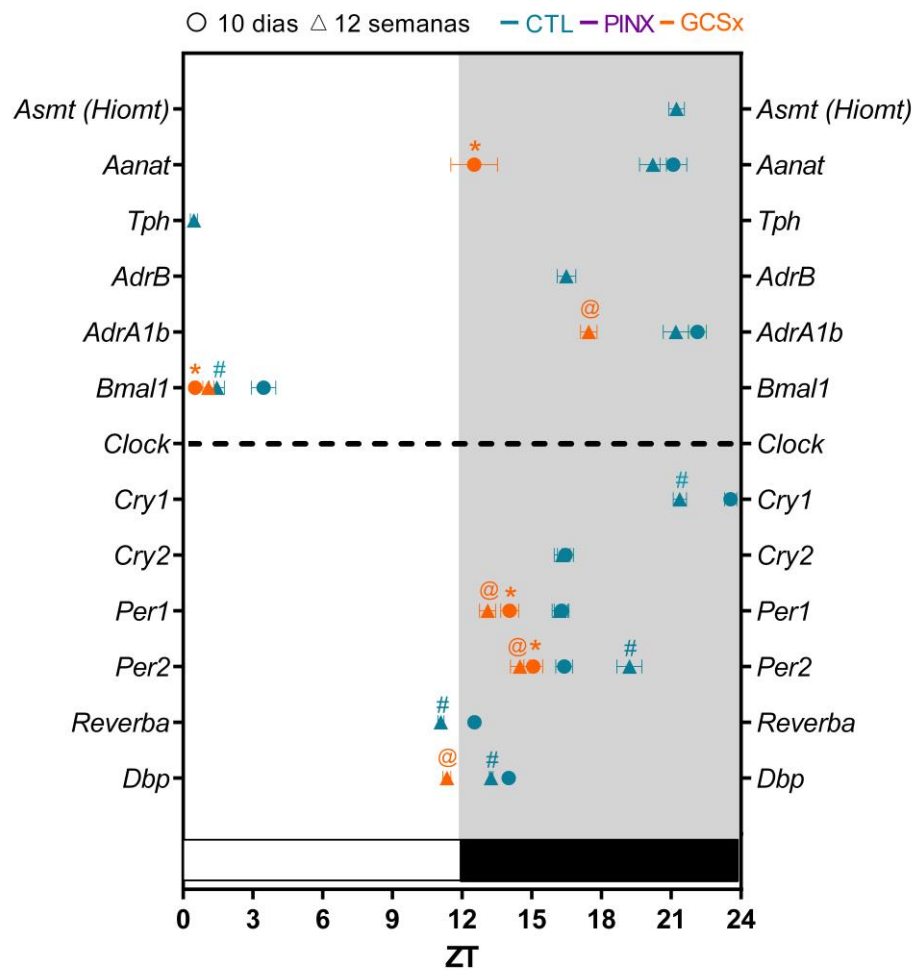
Dentre os genes relógio que mantiveram a sua oscilação rítmica mesmo após a cirurgia, a ganglionectomia de curto prazo foi capaz de adiantar a acrofase de *Bmal1*, *Per1* e *Per2*. Mesmo após 12 semanas, os genes *Per1* e *Per2* mantiveram esse padrão. Apesar de alterar a acrofase de alguns genes, a remoção do gânglio cervical não alterou, de maneira geral, a relação de fase existente entre os genes da alça primária do oscilador da glândula pineal, já que o pico de expressão de *Bmal1* continua em oposição de fase aos picos dos genes *Per1* e *Per2*.

Para a *Aanat*, a alteração da expressão rítmica já pode ser vista a curto prazo, onde o nível médio de expressão nas 24h e a amplitude rítmica foram radicalmente reduzidos, além de adiantar a acrofase em aproximadamente 9 horas, mostrando uma tendência à oposição de fase quando comparada ao grupo controle. A abolição do ritmo nos animais ganglionectomizados demorou mais para acontecer, aparecendo após 12 semanas de ausência da inervação simpática na glândula pineal.

De maneira geral, a ganglionectomia promoveu o adiantamento da acrofase da maioria dos genes que mantiveram a ritmicidade, seja no protocolo de 10 ou no de 12 semanas.

Em conjunto, todos esses dados demonstram que a influência da ausência da noradrenalina na glândula pineal foi tanta, que mesmo os genes cuja ritmicidade não foi abolida, tiveram seus perfis rítmicos de expressão alterados, através de modificações no mesor, amplitude e/ou acrofase.

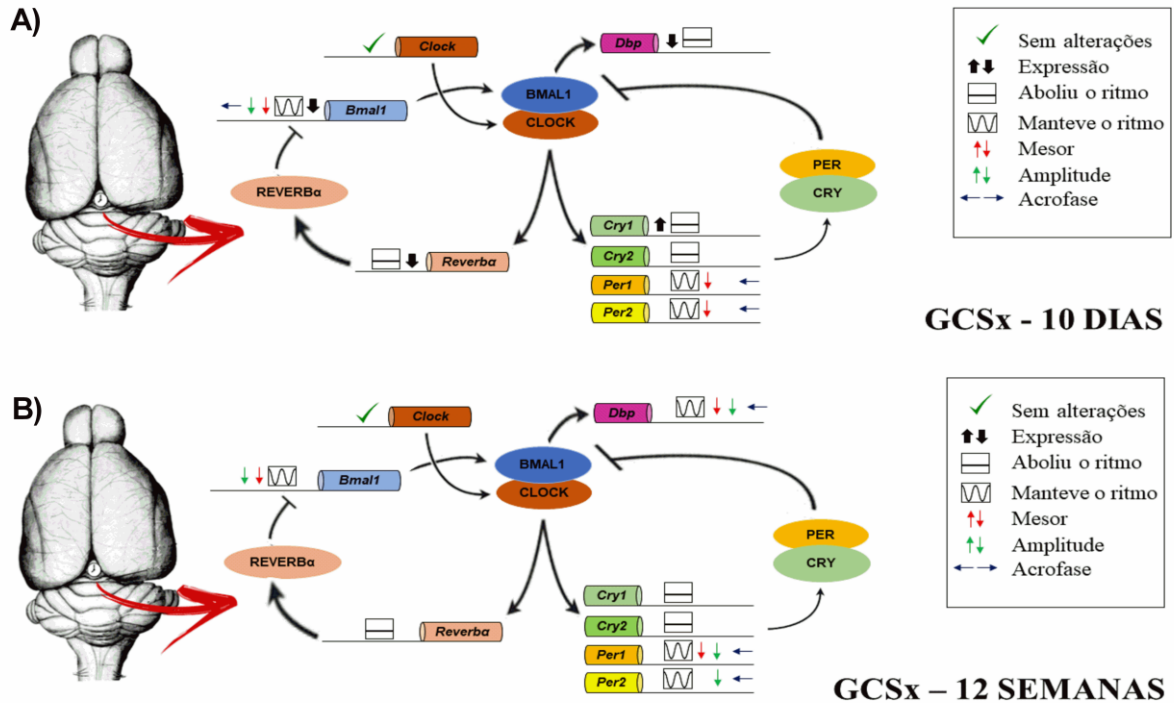
Figura 39 – Mapa de acrofases dos genes analisados nos grupos controle e ganglionectomizados na glândula pineal



Mapa de acrofase dos genes analisados na glândula pineal de animais controles (CTL) e ganglionectomizados (GCSx) sob os protocolos de 10 e 12 semanas. Teste T de Student, bicaudal não pareado com * $p < 0,05$ para GCSx 10 dias vs CTL 10 dias; @ $p < 0,05$ para GCSx 12 semanas vs CTL 12 semanas; # $p < 0,05$ para CTL 12 semanas vs CTL 10 dias; & $p < 0,05$ para GCSx 12 semanas vs GCSx 10 dias. Linha tracejada = ausência de ritmo em ambos os grupos (controle e ganglionectomizados). Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Em resumo, a remoção do gânglio cervical superior em ratos é capaz de alterar o oscilador molecular existente na glândula pineal, não apenas abolindo o ritmo de alguns genes, mas também reduzindo a expressão da maioria dos componentes do oscilador intracelular e alterando suas acrofases (Figura 40). Além de interferir com o oscilador molecular, também podemos notar um importante efeito na fisiologia da glândula pineal, com redução de parâmetros fundamentais na síntese de melatonina como a redução da expressão gênica dos receptores noradrenérgicos e redução da expressão gênica das enzimas responsáveis pela síntese desse hormônio, principalmente com relação à enzima passo limitante, *Aanat* que foi a que mais sofreu com a intervenção cirúrgica, a curto e longo prazo.

Figura 40 – Resumo esquemático das alterações vistas na expressão do oscilador molecular da glândula pineal após a ganglionectomia.



(A) Alterações no oscilador molecular da glândula pineal após 10 dias de ganglionectomia. (B) Alterações no oscilador molecular da glândula pineal após 12 semanas de ganglionectomia.

5.6 Perfil circadiano dos genes da alça primária do oscilador no fígado: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia

Até então viu-se que a ausência de inervação simpática devido à remoção bilateral do gânglio cervical superior, a longo e curto prazo, foi capaz de alterar o mecanismo circadiano de da glândula pineal. E, que não apenas o oscilador molecular deste órgão estava comprometido, como também a sua função, o que reflete em uma produção de melatonina alterada.

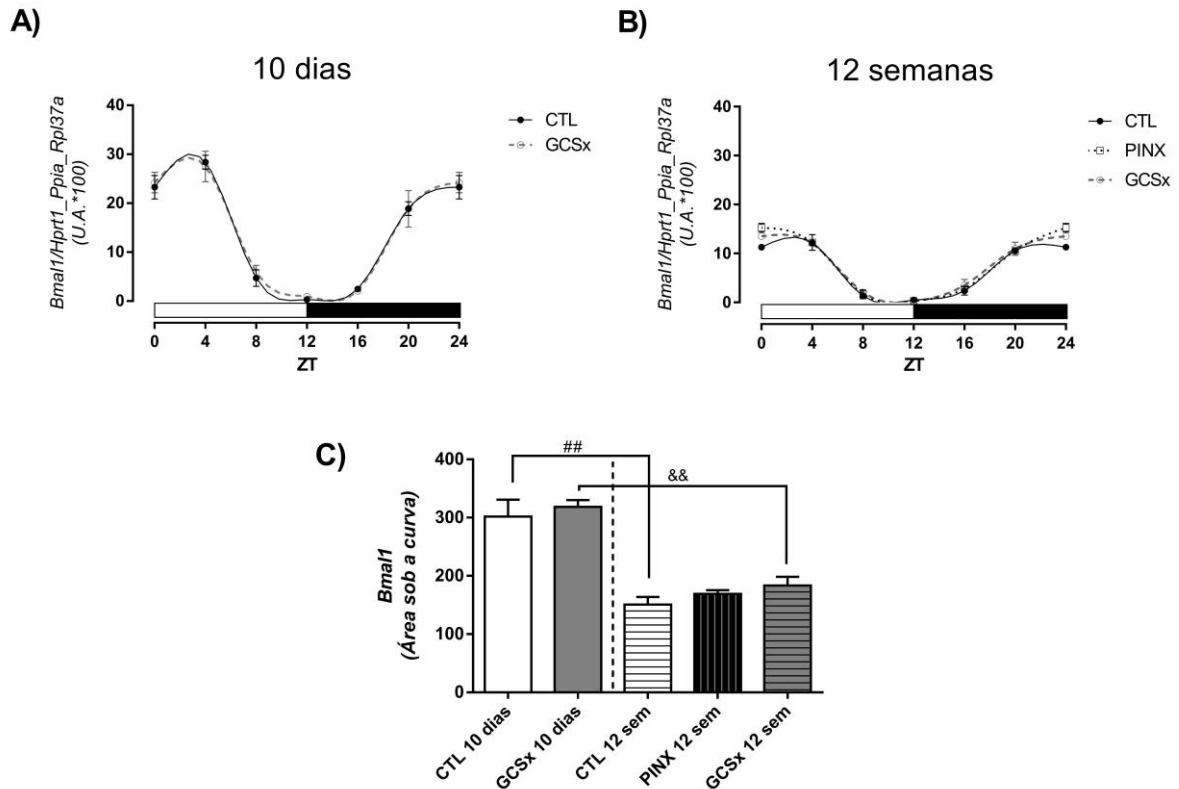
Sabendo-se que a melatonina é um importante marcador temporal interno, surgiu a dúvida se tal alteração hormonal durante esses períodos seria capaz de promover alterações em um oscilador periférico localizado fora do sistema nervoso central. Para isso, resolvemos analisar o oscilador molecular existente no fígado após 10 dias e 12 semanas de ablação do gânglio cervical superior e consequente modificação da síntese de melatonina, além de averiguar se há alguma diferença entre os resultados obtidos através da utilização de diferentes métodos de alteração do conteúdo de melatonina: a pinealectomia e a ganglionectomia.

5.6.1 Alça primária do oscilador – elementos positivos: *Bmal1* e *Clock* no fígado

No fígado, a expressão do elemento positivo *Bmal1* apresentou variação em todos os grupos analisados. Independentemente do método cirúrgico empregado, a expressão de *Bmal1* não foi afetada (Figuras 41A e B), demonstrando ser bastante robusta.

Em contrapartida, a duração do protocolo experimental e envelhecimento do animal, levou à redução da expressão de *Bmal1* visto através da diminuição da área sob a curva obtida dos animais controles (Figura 41C) entre os protocolos de 10 e 12 semanas. Tal efeito de redução também apareceu nos animais que foram submetidos às cirurgias.

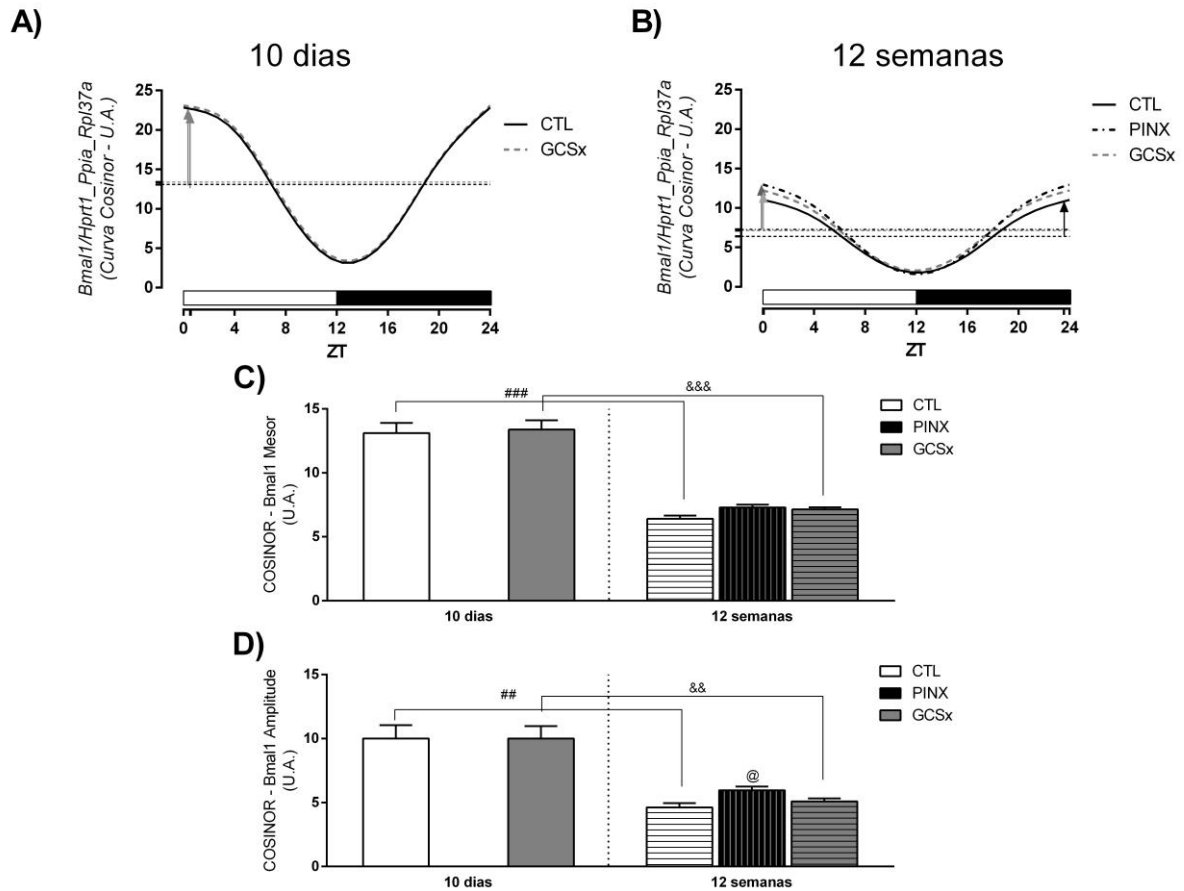
Figura 41 – Perfil diário de RNAm do gene *Bmal1* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.



(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Bmal1* no fígado de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,7303$ para o fator cirurgia e $p = 0,9966$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL e GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Bmal1* no fígado de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia e pinealectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,0156$ para o fator cirurgia e $p = 0,1038$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL, PINX e GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Bmal1*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com $^{##}p = 0,0032$ vs CTL 10 dias; $^{&&}p = 0,0011$ vs GCSx 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Todas as curvas foram submetidas à análise Cosinor, na qual foi observado que as variações encontradas se ajustaram à uma curva cosseno, demonstrando a presença de ritmicidade circadiana (Figura 42 A e B). Nem a ganglionectomia, nem a pinealectomia alteraram mesor e acrofase (Figuras 42 C e 57), porém, viu-se um aumento na amplitude da expressão de *Bmal1* no grupo pinealectomizados por 12 semanas (Figura 42 D). A duração do protocolo também levou à redução de mesor e amplitude em todos os grupos, além de promover um avanço de fase nos animais ganglionectomizados por um longo prazo, quando comparados aos de curto prazo (Figura 56).

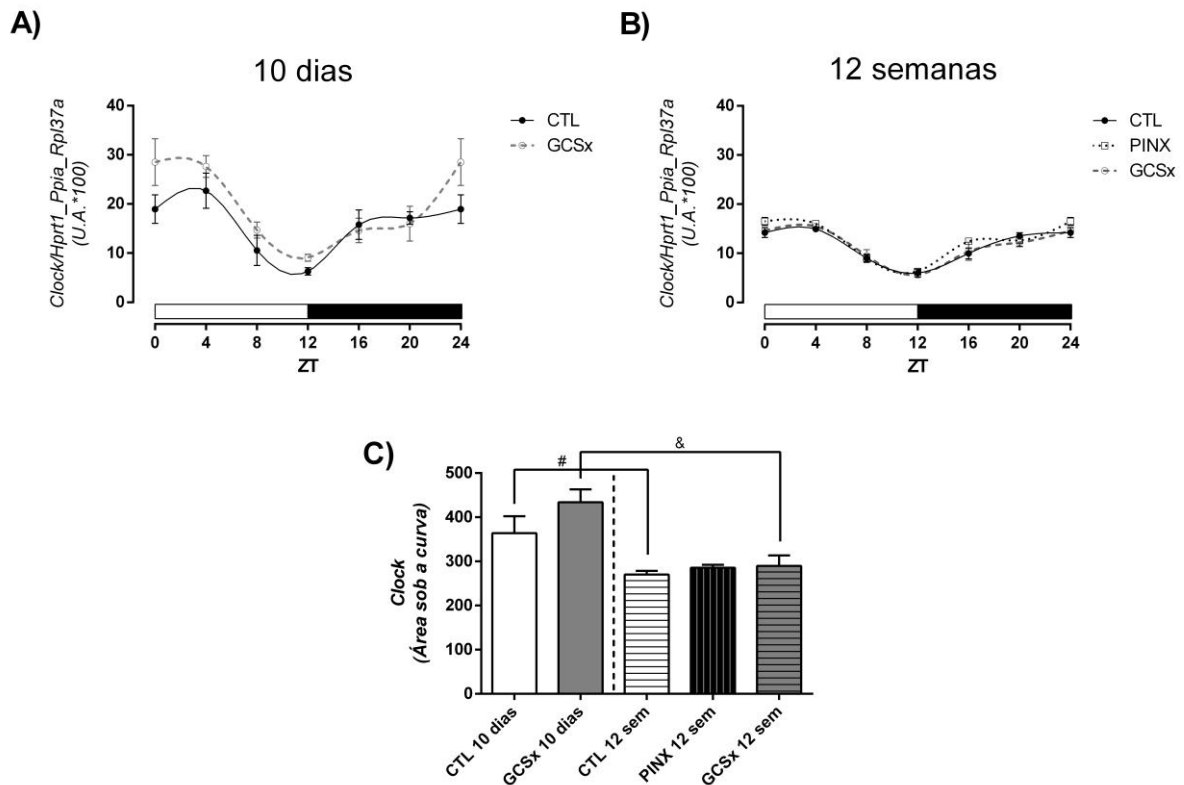
Figura 42 – Perfil diário de RNAm do gene *Bmal1* no fígado analisado pelo método Cosinor.



(A) Perfis diários de expressão de *Bmal1* no fígado de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Bmal1* no fígado de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $###p = 0,0002$ vs CTL 10 dias; $\\\&\&\&p = 0,0002$ vs GCSx 10 dias. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $@p < 0,05$ vs CTL 12 semanas; $##p = 0,0029$ vs CTL 10 dias; $\\\&\&p = 0,028$. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Assim como o visto na expressão do gene *Bmal1*, todos os grupos apresentaram variação ao longo das 24 h na expressão gênica de *Clock*. A realização das cirurgias não levou à eliminação dessas variações e nem alteração do seu nível de expressão (Figuras 43 A, B e C). Em compensação a duração do protocolo experimental levou à redução da expressão do gene tanto em animais controles, como em animais ganglionectomizados (Figura 43 C).

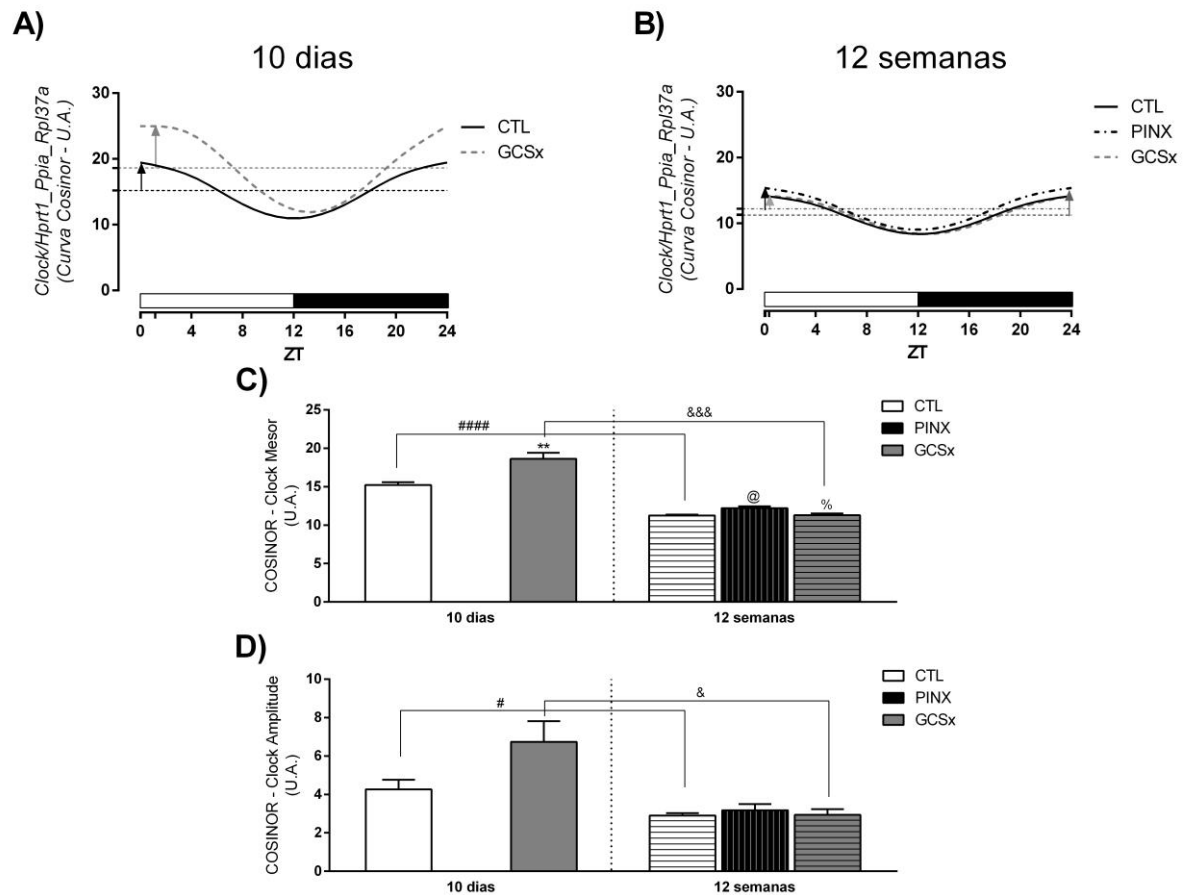
Figura 43 – Perfil diário de RNAm do gene *Clock* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.



(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Clock* no fígado de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,0132$ para o fator cirurgia e $p = 0,3676$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0061$ para o grupo CTL e $p = 0,0006$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Clock* no fígado de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia e pinealectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,0423$ para o fator cirurgia e $p = 0,7435$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL e PINX e $p = 0,0001$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Clock*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com # $p = 0,0377$ vs CTL 10 dias; & $p = 0,0115$ vs GCSx 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Após a análise Cosinor, confirmou-se a ritmicidade circadiana em todos os grupos e que as cirurgias não aboliram a ritmicidade de *Clock* (Figuras 44 A e B). Porém, apesar de haver a manutenção do ritmo, a ganglionectomia por 10 dias levou ao aumento do mesor, enquanto que após 12 semanas apenas a pinealectomia gerou o mesmo efeito (Figura 44 C). As intervenções cirúrgicas não exerceram efeito sobre a amplitude (Figura 44 D) e nem sobre a acrofase (Figura 57). Diferentemente, 12 semanas de protocolo experimental levou à redução dos parâmetros rítmicos mesor e amplitude observados nos grupos controle e ganglionectomizados (Figuras 44 C e D).

Figura 44 – Perfil diário de RNAm do gene *Clock* no fígado analisado pelo método Cosinor.



(A) Perfis diários de expressão de *Clock* no fígado de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Clock* no fígado de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com ### $p < 0,0001$ vs CTL 10 dias; &&& $p = 0,0001$ vs GCSx 10 dias. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com # $p = 0,0389$ vs CTL 10 dias; & $p = 0,0147$. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

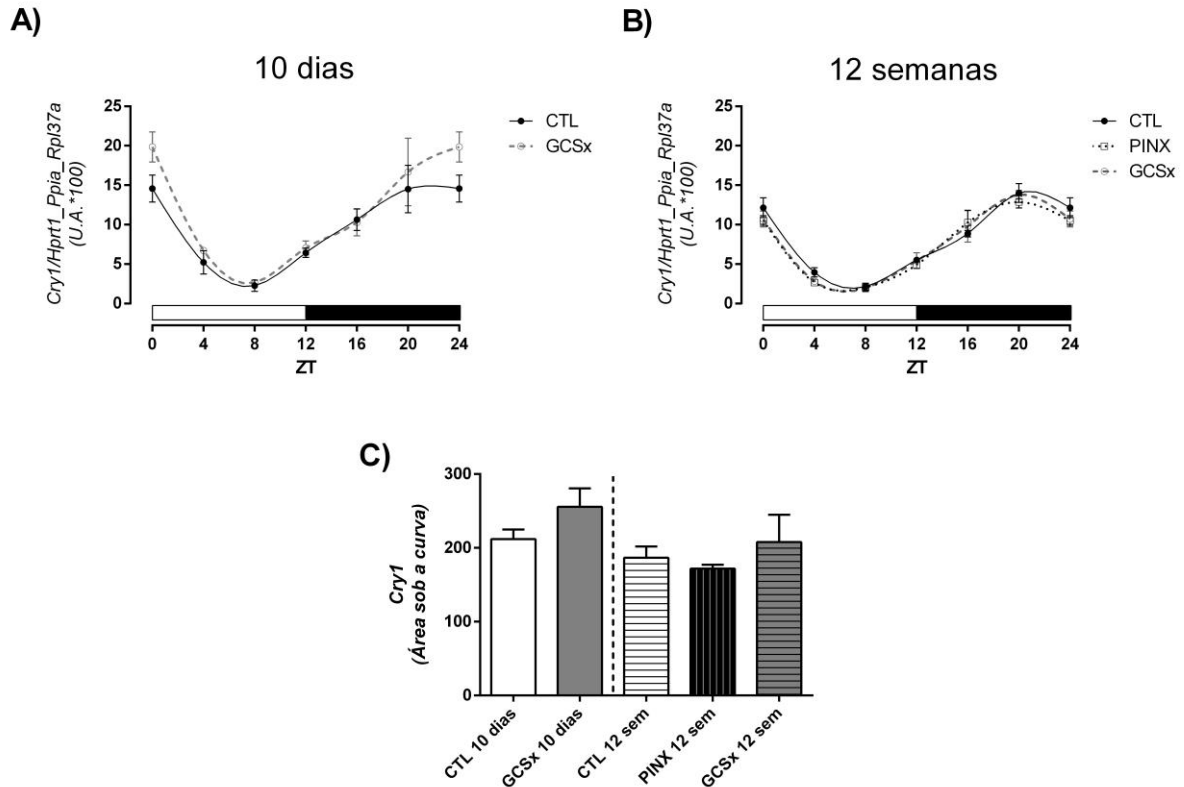
Sendo assim, a redução ou ausência de melatonina, não levou à grandes alterações no perfil de expressão rítmico dos elementos positivos da alça primária do oscilador molecular no fígado, com exceção do mesor do gene *Clock* nos animais ganglionectomizados por 10 dias e da amplitude do gene *Clock* nos animais pinealectomizados.

5.6.2 Alça primária – elementos negativos: *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per2* no fígado

Ao se analisar os elementos negativos da alça primária do oscilador molecular do fígado, viu-se que a expressão de *Cry1* apresentou variação ao longo das 24 h em todos os grupos analisados e que a ganglionectomia e pinealectomia não foram alteraram o perfil e nem o nível

de expressão desse gene (Figuras 45 A, B e C). Também não houve efeito da duração do protocolo para a expressão do gene em questão.

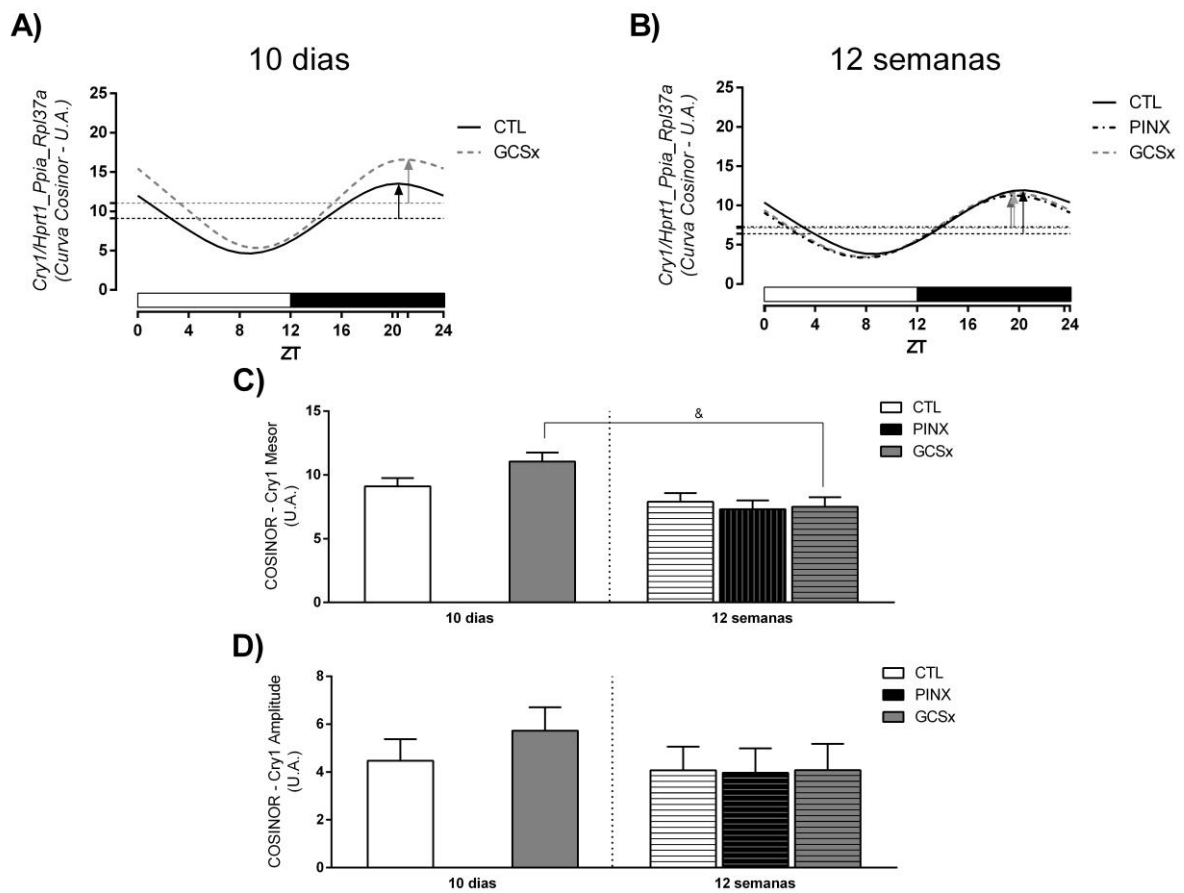
Figura 45 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry1* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.



(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Cry1* no fígado de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,0376$ para o fator cirurgia e $p = 0,5420$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL e $p = 0,0001$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Cry1* no fígado de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,3110$ para o fator cirurgia e $p = 0,9467$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL, PINX e GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Cry1*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com $p > 0,05$ para todos os grupos. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Uma vez que todas as curvas apresentaram variação ao longo das 24 h, as mesmas foram submetidas à análise pelo Cosinor e puderam ser ajustadas a uma curva cosseno, confirmando a presença de variação circadiana rítmica da expressão do gene *Cry1* em todos os grupos (Figura 46 A e B). As intervenções cirúrgicas não alteraram o perfil rítmico de expressão do gene *Cry1*, já que o mesor, amplitude e acrofase permaneceram semelhantes em todos os grupos (Figuras 46 C, D e 56). A duração do protocolo experimental, foi capaz de reduzir o mesor encontrado entre os grupos ganglionectomizados por 10 e 12 semanas (Figura 46 C).

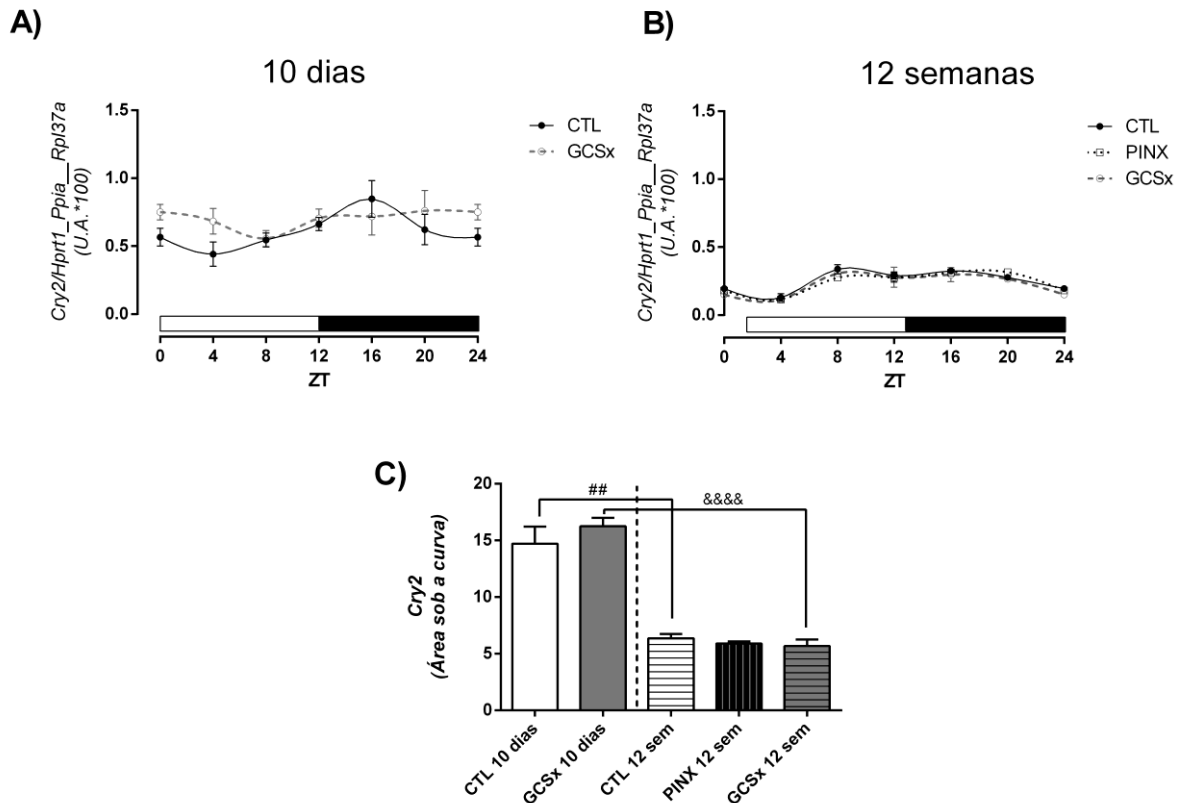
Figura 46 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry1* no fígado analisado pelo método Cosinor.



(A) Perfis diários de expressão de *Cry1* no fígado de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Cry1* no fígado de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $p = 0,0136$ vs GCSx 10 dias. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $p > 0,05$ em todos os grupos. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

A expressão do gene *Cry2* no fígado também foi avaliada, e sob o protocolo de 10 dias, apesar da tendência, não houve variação ao longo das 24 h, enquanto que sob o protocolo de 12 semanas foram encontradas variações em todos os grupos analisados. Como o visto para a expressão gênica de *Cry1*, nem a ganglionectomia e nem a pinealectomia resultaram em alterações no perfil de expressão de *Cry2* (Figuras 47 A, B e C). A única alteração observada foi a redução da expressão desse gene tanto nos animais controles, quando nos ganglionectomizados, após 12 semanas do protocolo experimental.

Figura 47 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry2* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.

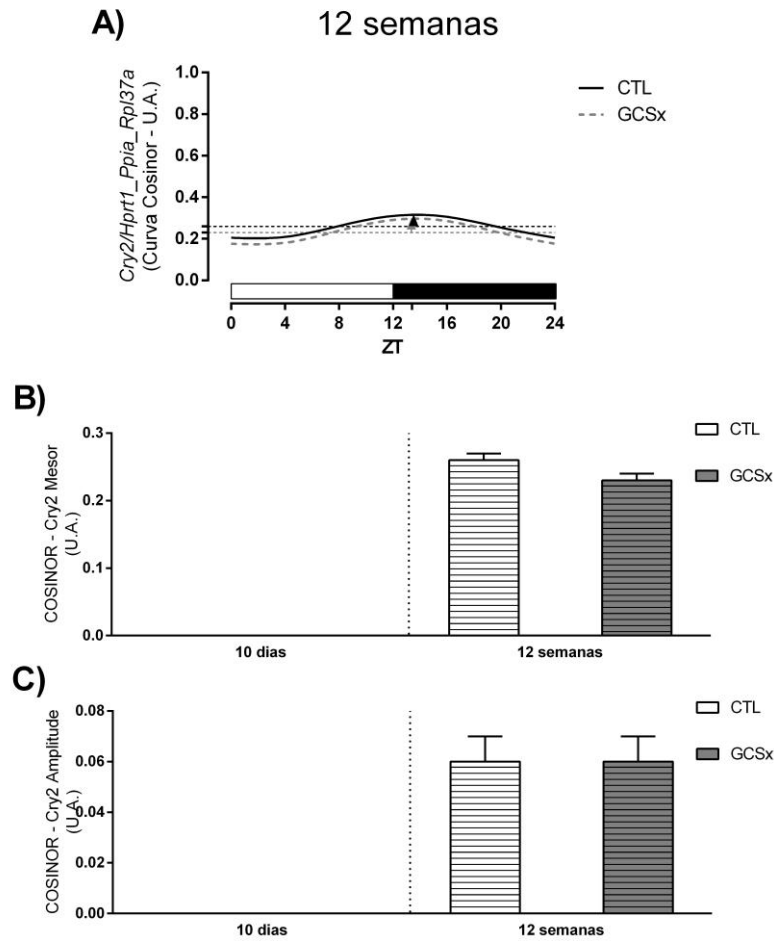


(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Cry2* no fígado de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,2028$ para o fator ZT, $p = 0,0638$ para o fator cirurgia e $p = 0,4359$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0770$ para o grupo CTL e $p = 0,8203$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Cry2* no fígado de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,1457$ para o fator cirurgia e $p = 0,5778$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0012$ para o grupo CTL, $p < 0,0001$ para o grupo PINX e $p = 0,0021$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Cry2*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com $## p = 0,0115$ vs CTL 10 dias; $#### p < 0,0001$ vs GCSx 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

As expressões que apresentaram variações ao longo das 24 h (apenas àquelas sob o protocolo de 12 semanas) foram submetidas à análise rítmica pelo método Cosinor, e as expressões dos grupos controle e ganglionectomizado por 12 semanas foram consideradas rítmicas (Figura 48).

Portanto, diferentemente do visto para a glândula pineal, a ganglionectomia não promoveu alterações na expressão do gene *Cry2*.

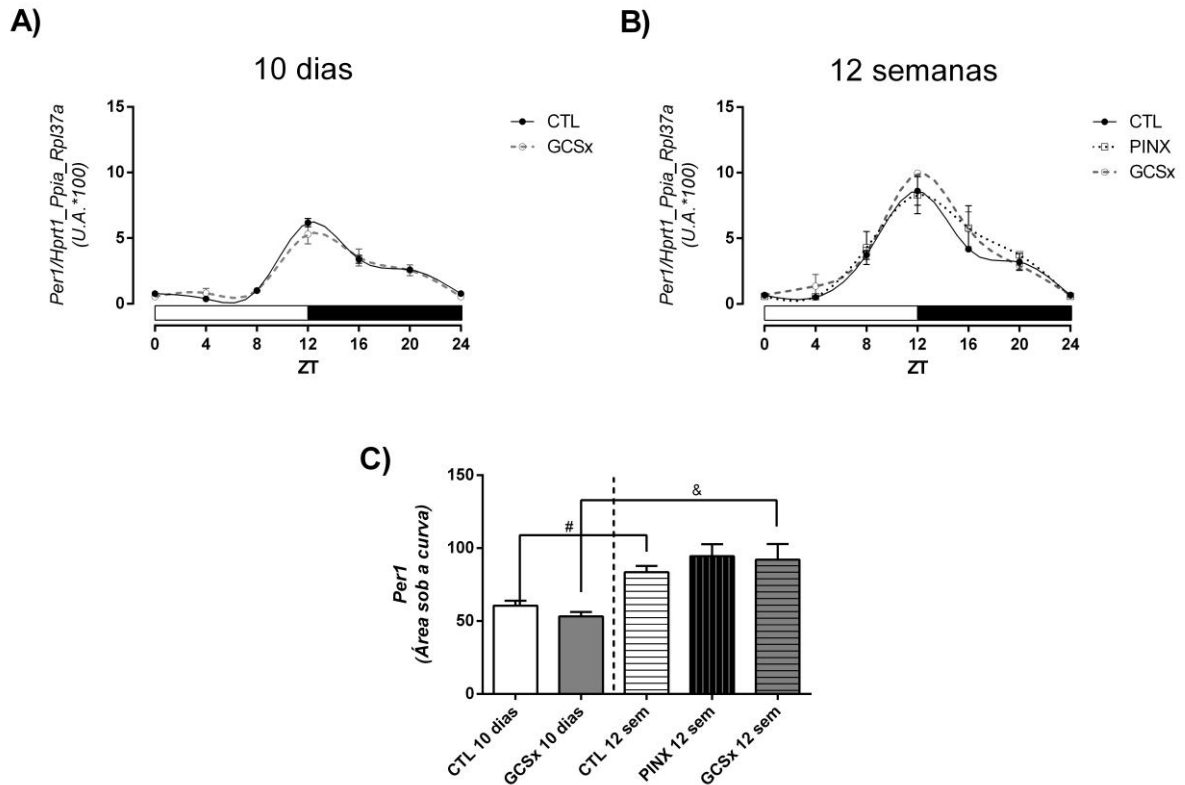
Figura 48 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry2* no fígado analisado pelo método Cosinor.



Perfil diário de expressão de *Cry2* no fígado de animais controles ganglionectomizados sob o protocolo de 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Através da avaliação da expressão gênica de *Per1* no fígado, viu-se que todos os grupos analisados exibiram variação ao longo das 24 h (Figuras 49 A e B). Além disso, a pinealectomia e ganglionectomia não resultaram em alterações da expressão de *Per1*, independentemente do tempo do protocolo experimental adotado. Entretanto, a duração deste protocolo levou à redução da expressão de *Per1* como visto pela redução da área sob a curva da expressão desse gene nos animais controles e ganglionectomizados (Figura 49 C).

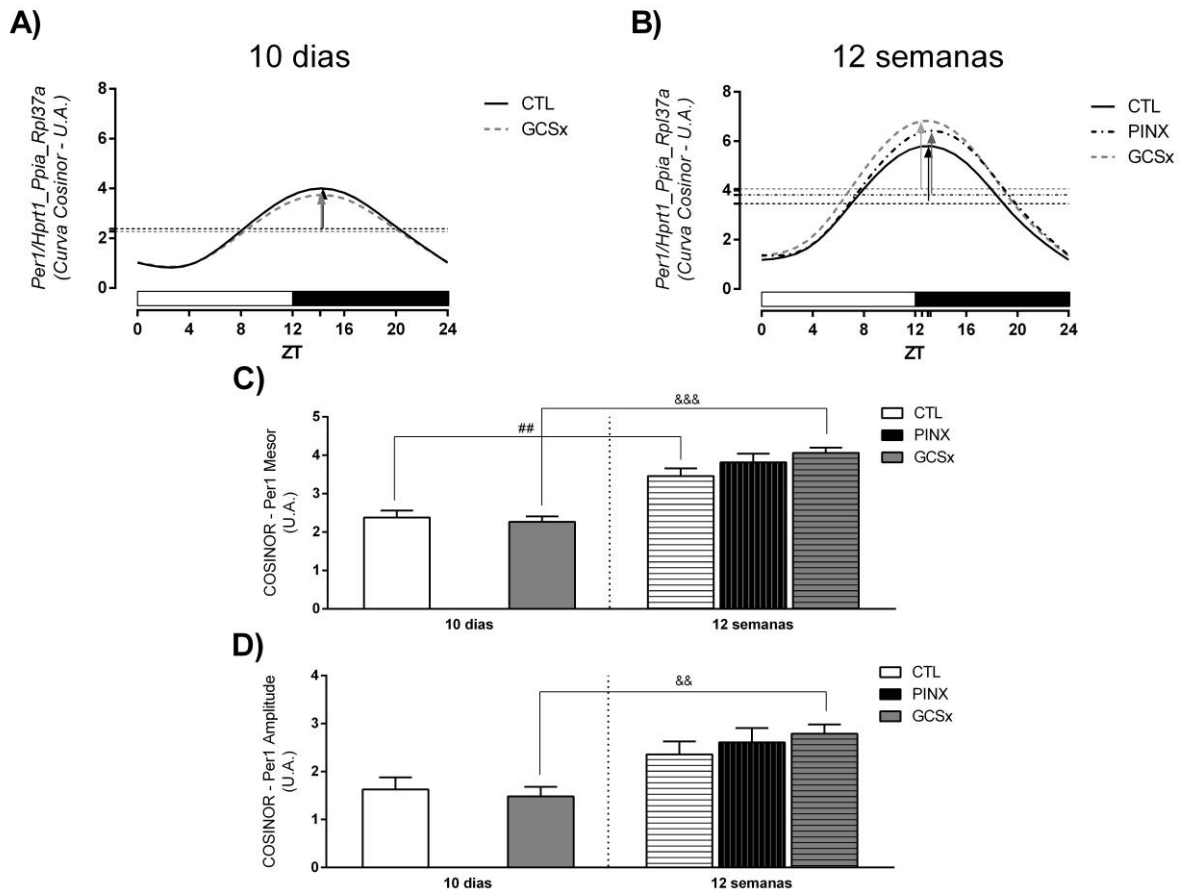
Figura 49 – Perfil diário de RNAm do gene *Per1* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.



A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Per1* no fígado de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,6212$ para o fator cirurgia e $p = 0,7500$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL e GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Per1* no fígado de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,1233$ para o fator cirurgia e $p = 0,9151$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL, PINX e GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Per1*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com $\# p = 0,0116$ vs CTL 10 dias; $\& p = 0,0302$ vs GCSx 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Após serem analisadas individualmente, as curvas que apresentaram variação ao longo das 24 h foram submetidas à análise do Cosinor. Após essa avaliação, viu-se que em todos os grupos a expressão de *Per1* apresentou ritmicidade circadiana (Figuras 50 A e B) e a realização das cirurgias não resultou em alterações para a expressão rítmica de *Per1*, já que nenhum dos parâmetros rítmicos foi afetado (Figura 50 C, D e 57). A duração do protocolo experimental levou ao aumento do mesor de *Per1* nos animais controles e ganglionectomizados, enquanto que a amplitude e acrofase dos ganglionectomizados foram diferentes dos animais operados por 10 dias (Figura 41C, D e 57).

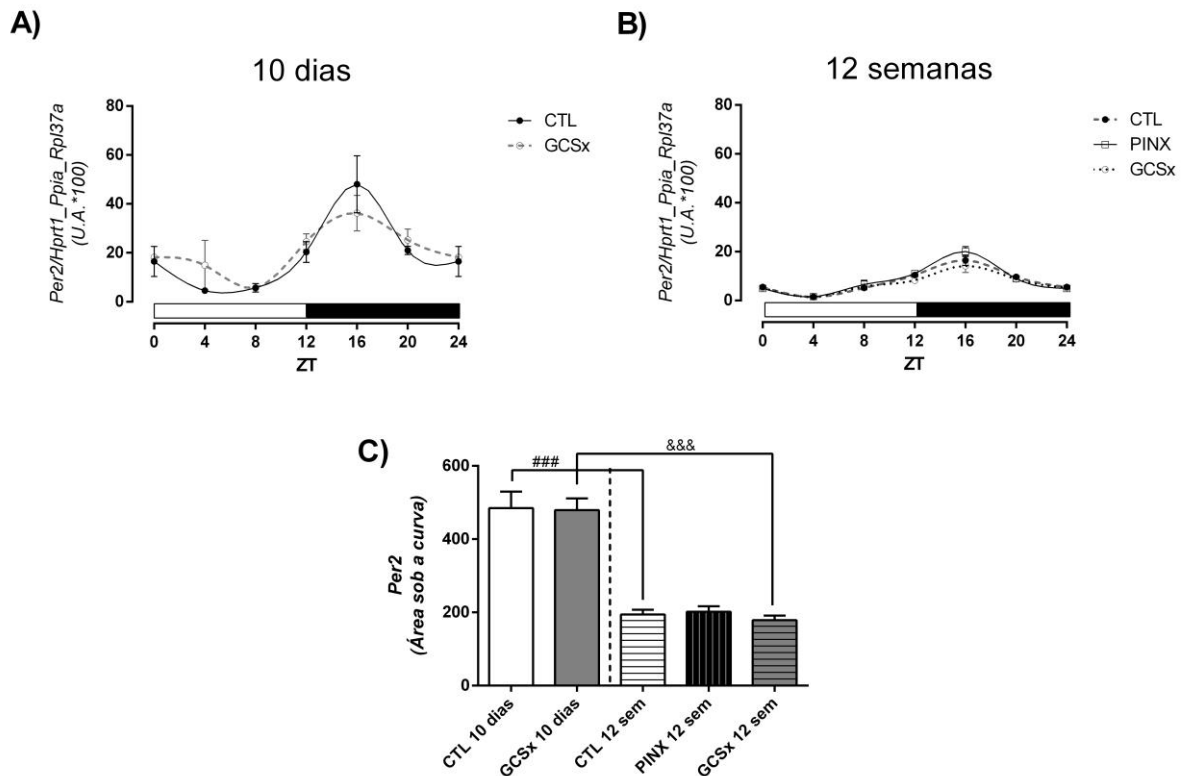
Figura 50 – Perfil diário de RNAm do gene *Per1* no fígado analisado pelo método Corinor.



(A) Perfis diários de expressão de *Per1* no fígado de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Per1* no fígado de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com ^{##} $p = 0,0070$ vs CTL 10 dias e ^{&&&} $p = 0,0001$ vs GCSx 10 dias. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com ^{&&} $p = 0,0032$ vs GCSx 10 dias. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Prosseguindo na análise dos elementos negativos da alça primária do oscilador molecular do fígado, viu-se que a expressão de *Per2* apresentou variação ao longo do dia em todos os grupos estudados (Figuras 51 A e B). As intervenções cirúrgicas não promoveram alterações no perfil e nível de expressão de *Per2* (Figura 51 C). Diferentemente, após 12 semanas a expressão de *Per2* reduziu nos grupos controle e ganglionectomizado demonstrando um efeito da duração do protocolo (Figura 51 C), mas não das cirurgias.

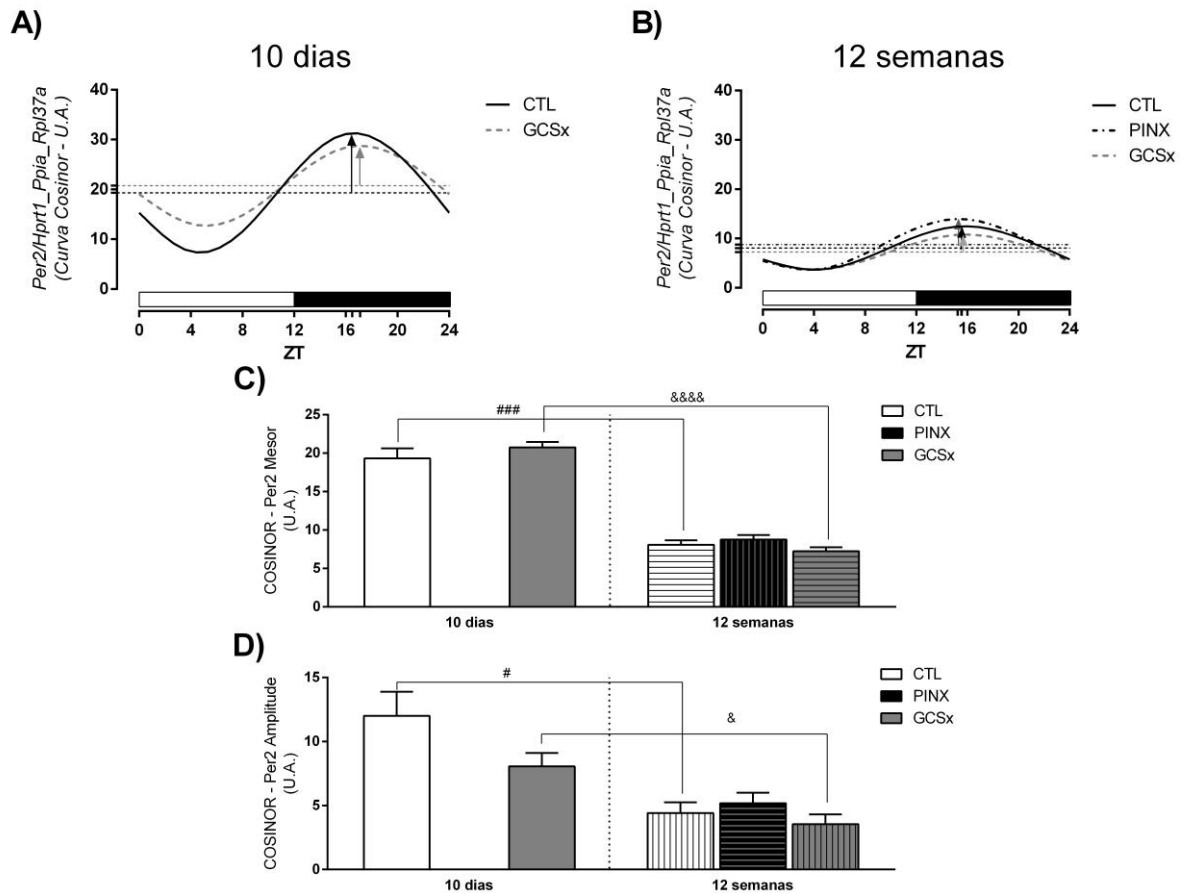
Figura 51 – Perfil diário de RNAm do gene *Per2* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.



(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Per2* no fígado de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,6319$ para o fator cirurgia e $p = 0,6248$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0033$ para o grupo CTL e $p = 0,0254$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Per2* no fígado de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,1233$ para o fator cirurgia e $p = 0,4669$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL e PINX e $p = 0,0006$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Per2*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com ### $p = 0,0008$ vs CTL 10 dias; &&& $p = 0,0002$ vs GCSx 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

De acordo com a análise do Cosinor, todas as curvas que apresentaram variação ao longo das 24 h se ajustaram à curva cosseno e os parâmetros rítmicos puderam ser definidos (Figura 52 A e B). Os parâmetros mesor, amplitude e acrofase não foram alterados após a realização das cirurgias (Figuras 52 C, D e 57). Em contraponto, a duração do protocolo resultou em redução no mesor e amplitude dos grupos controle e ganglionectomizado, e promoveu um adiantamento de fase.

Figura 52 – Perfil diário de RNAm do gene *Per2* no fígado analisado pelo método Cosinor.



(A) Perfis diários de expressão de *Per2* no fígado de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Per2* no fígado de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com ### $p = 0,0002$ vs CTL 10 dias e &&&& $p < 0,0001$ vs GCSx 10 dias. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com # $p = 0,0105$ vs CTL 10 dias; & $p = 0,0138$ vs GCSx 10 dias. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Mais uma vez, contrariando o visto na glândula pineal, os elementos negativos da alça primária do oscilador molecular do fígado não responderam muito às alterações causadas após 10 ou 12 semanas de cirurgia.

Sendo assim, de uma maneira geral, a alça primária do oscilador molecular do fígado de ratos não sofre importantes alterações mediante ganglionectomia ou pinealectomia.

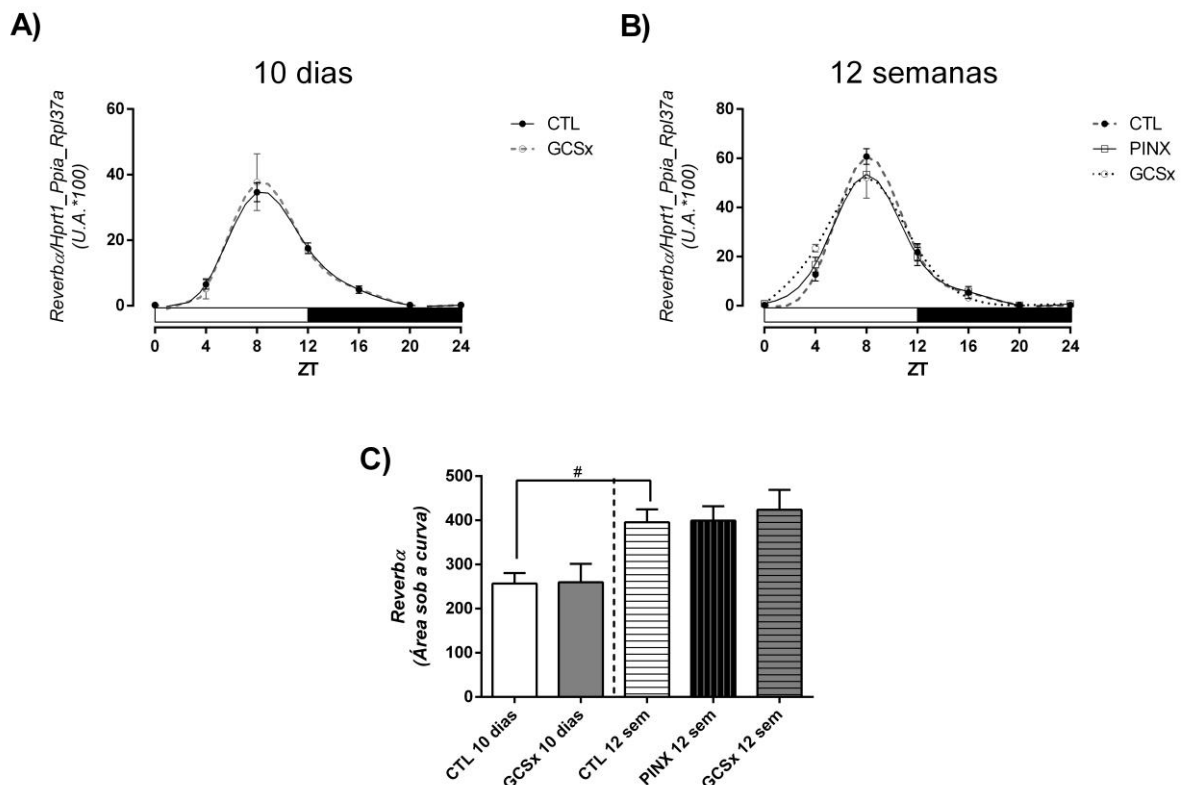
5.7 Perfil circadiano do gene da alça secundária do oscilador no fígado: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia

Com relação à alça secundária do oscilador, o gene analisado por PCR em tempo real foi o *Rev-erba*.

5.7.1 *Rev-erba* no fígado

A expressão de *Rev-erba* no fígado apresentou variação ao longo do dia em todos os grupos analisados. E assim como o visto em outros genes nesse tecido, sua expressão também parece não ser alterada pela ganglionectomia ou pinealectomia (Figuras 53 A e B). A duração do protocolo promoveu um aumento na expressão desse gene (Figura 53 C), visto através do aumento da área sob a curva de expressão de *Rev-erba* nos animais controles.

Figura 53 – Perfil diário de RNAm do gene *Rev-erba* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.

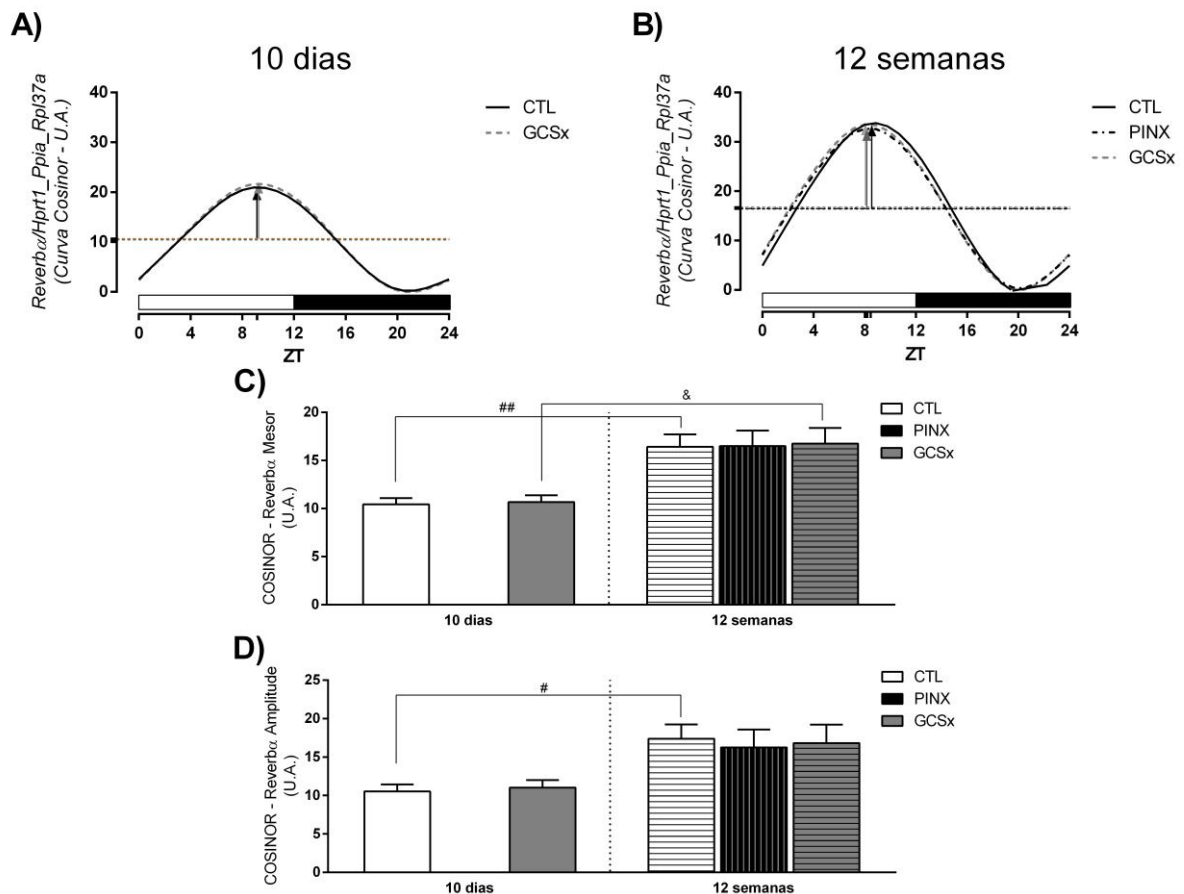


(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Rev-erba* no fígado de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,8896$ para o fator cirurgia e $p = 0,9901$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL e GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Rev-erba* no fígado de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,7792$ para o fator cirurgia e $p = 0,1251$ para o fator interação. Para a

avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL, PINX e GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Reverba*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com $^{\#}p = 0,0177$ vs CTL 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

As curvas que exibiram variação ao longo das 24 h foram submetidas ao Cosinor e ao serem ajustadas à uma curva cosseno, indicaram a existência de ritmicidade circadiana para a expressão de *Reverba* em todos os grupos, independentemente das intervenções cirúrgicas (Figuras 54 A e B). Os parâmetros rítmicos, mesor, amplitude e acrofase também não foram alterados pela ganglionectomia e nem pela pinealectomia (Figuras 54 C e D). A duração do protocolo levou ao aumento do mesor e amplitude nos animais controles, enquanto que nos animais ganglionectomizados o mesor aumentou e houve um adiantamento de fase (Figura 57).

Figura 54 – Perfil diário de RNAm do gene *Rev-erba* analisado pelo método Cosinor no fígado



(A) Perfis diários de expressão de *Reverba* no fígado de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Reverba* no fígado de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $^{\#\#}p = 0,0063$ vs CTL 10 dias e $^{\&}p = 0,0147$ vs GCSx 10 dias. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de

Student, bicaudal não pareado com # $p = 0,0159$ vs CTL 10 dias. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

5.8 Perfil circadiano de gene dependente do relógio no fígado: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia

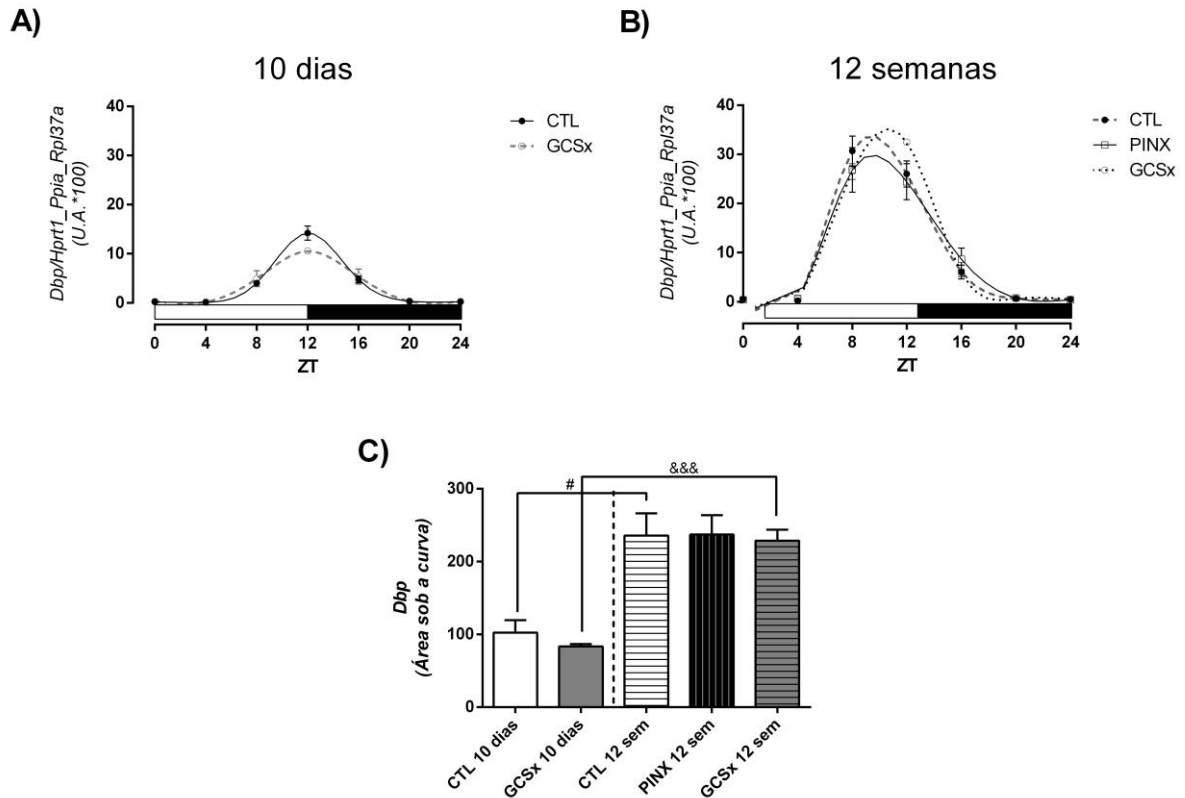
Para analisar se a influência da ganglionectomia e pinealectomia durante os períodos de experimentação afetaria a saída do oscilador, avaliou-se a expressão do gene *Dbp*.

5.8.1 Dbp no fígado

Assim como o esperado, viu-se variação ao longo do dia na expressão de *Dbp* em todos os grupos, de forma que as cirurgias não aboliram tal variação e nem alteraram o perfil de expressão desse gene (Figura 55 A e B). Inclusive a área sob a curva não foi alterada pelos tratamentos cirúrgicos (Figura 55 C). Entretanto, a duração do protocolo experimental (12 semanas) levou ao aumento da expressão de *Dbp* tanto nos animais controles, quanto nos animais ganglionectomizados.

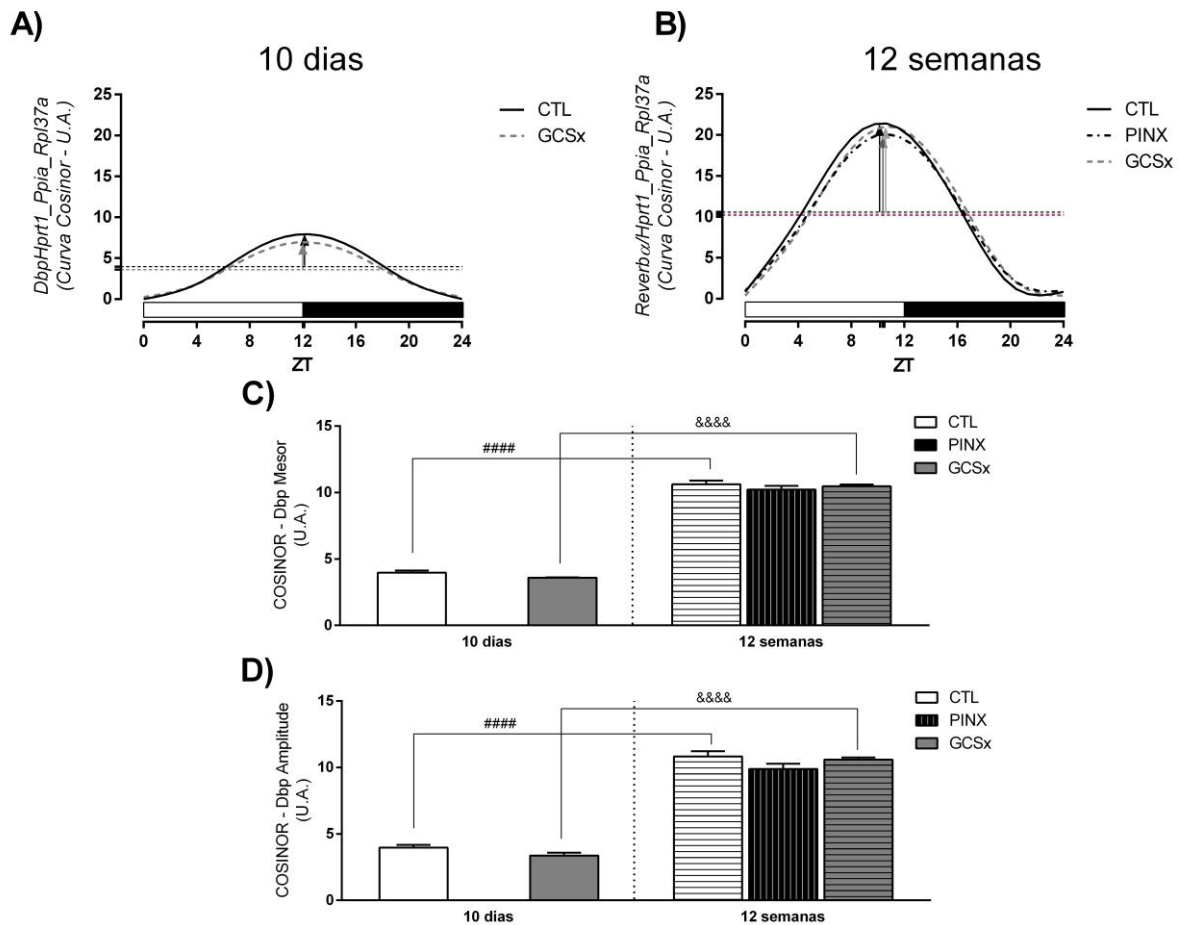
Após a análise rítmica pelo Cosinor, observou-se a ritmicidade circadiana em todos os grupos observados (Figura 56 A e B). A ganglionectomia e pinealectomia, não alteraram o perfil rítmico de expressão do *Dbp* e nem seus parâmetros rítmicos como mesor, amplitude e acrofase (Figuras 56 C, D e 57). Mais uma vez a duração do protocolo levou ao aumento da expressão de *Dbp*, tanto nos animais controles, quanto nos animais ganglionectomizados, visto através do aumento de mesor e amplitude, além de promover um adiantamento de fase para os animais controles, e um atraso para os ganglionectomizados (Figura 56).

Figura 55 – Perfil diário de RNAm do gene *Dbp* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no fígado.



(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Dbp* no fígado de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,5756$ para o fator cirurgia e $p = 0,1632$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL e GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Dbp* no fígado de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,7150$ para o fator cirurgia e $p = 0,2477$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL, PINX e GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Dbp*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com $\# p = 0,0188$ vs CTL 10 dias; $\&\&\& p = 0,0007$ vs GCSx 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Figura 56 – Perfil diário de RNAm do gene *Dbp* analisado pelo método Cosinor no fígado.



(A) Perfis diários de expressão de *Dbp* no fígado de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Dbp* no fígado de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com ##### $p < 0,0001$ vs CTL 10 dias e &&&& $p < 0,0001$ vs GCSx 10 dias. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com ##### $p < 0,0001$ vs CTL 10 dias; &&&& $p < 0,0001$ vs GCSx 10 dias. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Apesar das pequenas modificações observadas em alguns dos genes relógio no fígado (um parâmetro em *Bmal1* e um parâmetro em *Clock*), as alterações observadas não foram suficientes para alterar a expressão de *Dbp*, o gene de saída do oscilador.

Mediante esses resultados, fica evidenciado que a remoção do gânglio cervical superior ou a retirada da glândula pineal, não resultou em severas modificações no oscilador molecular do fígado.

5.9 Mapa de acrofases no fígado: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia

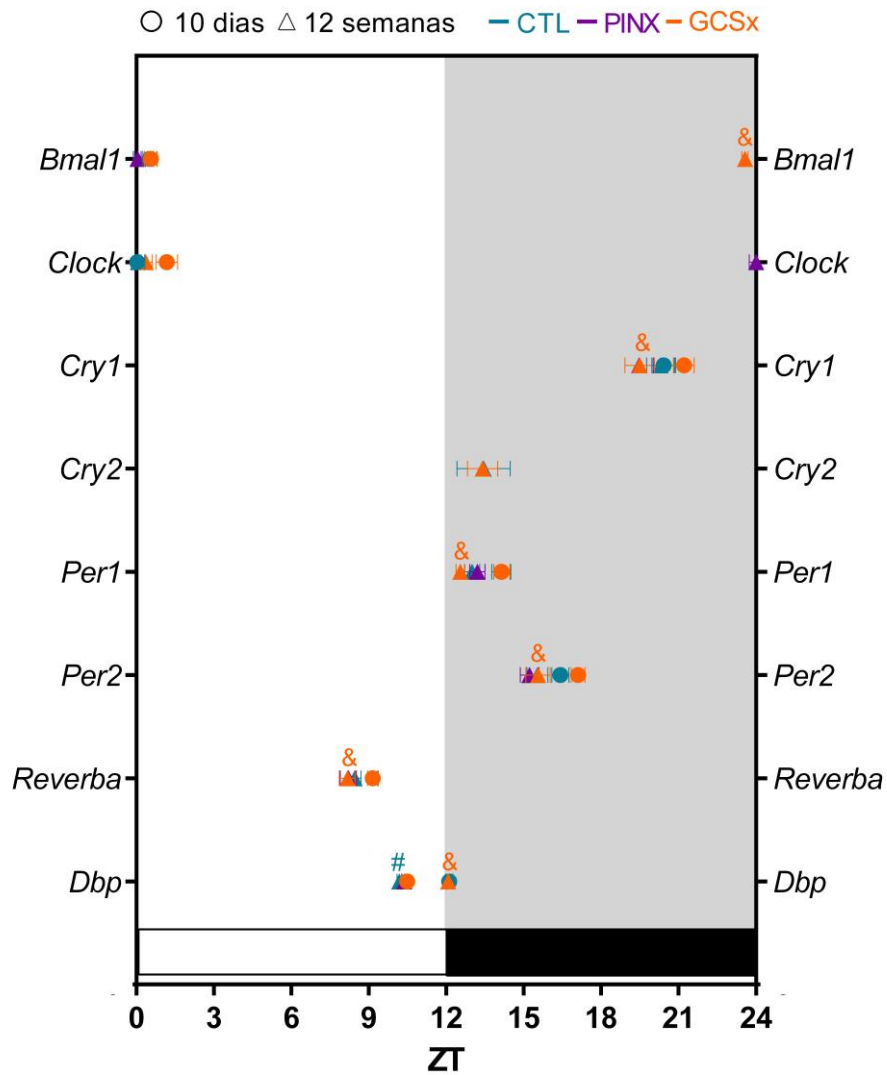
A Figura 57 mostra o mapa das acrofases dos genes analisados no fígado após ajuste pelo método Cosinor. Com exceção de *Cry2* no protocolo de 10 dias, todos os genes apresentaram ritmicidade circadiana no grupo controle. A possível alteração da sinalização melatoninérgica, após remoção da inervação simpática da glândula pineal, não foi capaz de abolir a ritmicidade da expressão de nenhum gene relógio no fígado e nem de alterar suas acrofases.

A ausência de melatonina pineal também não foi capaz de promover grandes alterações no oscilador hepático, sendo a única exceção a abolição de ritmo de *Cry2* na pinealectomia por 12 semanas. Portanto, com exceção da expressão de *Cry2* a ritmicidade e as acrofases dos outros genes foram mantidos.

A ausência da melatonina em si não afetou a acrofase dos genes estudados, porém a idade do animal promoveu alterações nas acrofases dos animais ganglionectomizados, levando a um adiantamento de fase nos elementos negativos da alça primária do oscilador, no *Reverba* e no *Dbp*.

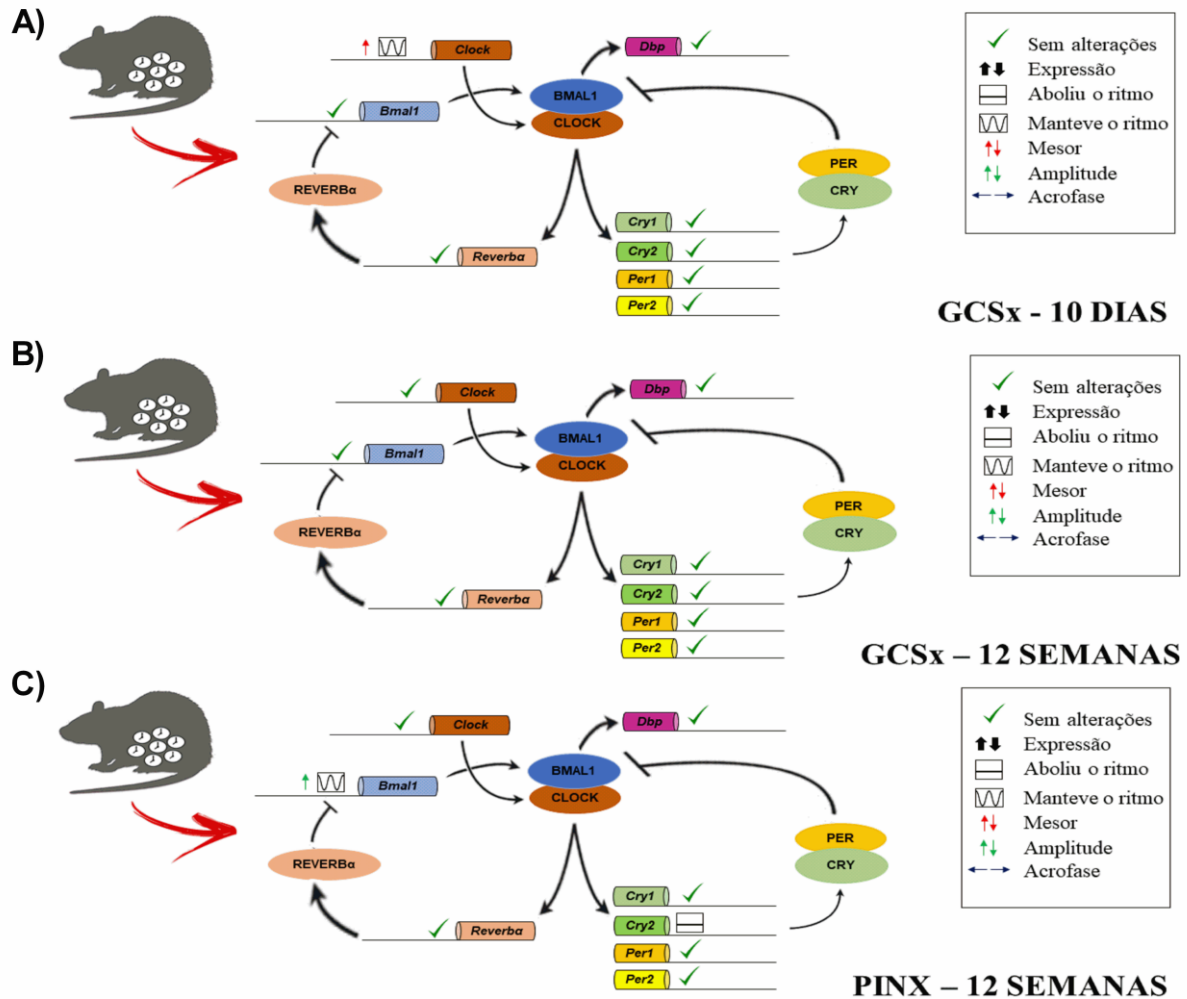
Sendo assim, como mostra o quadro da Figura 58, o oscilador molecular do fígado parece ser bastante robusto mediante as alterações promovidas pelas intervenções cirúrgicas, já que comparada ao oscilador da glândula pineal, praticamente não sofreu alterações.

Figura 57 – Análise do momento do ponto de máxima (acrofase) dos genes analisados nos grupos controle e ganglionectomizados no fígado.



Mapa de acrofase dos genes analisados no fígado de animais controles (CTL), ganglionectomizados (GCSx) e pinealectomizados (PINX) sob os protocolos de 10 e 12 semanas. Teste T de Student, bicaudal não pareado com * $p < 0,05$ para GCSx 10 dias vs CTL 10 dias; @ $p < 0,05$ para GCSx 12 semanas ou PINX 12 semanas (de acordo com a coloração) vs CTL 12 semanas; # $p < 0,05$ para CTL 12 semanas vs CTL 10 dias; & $p < 0,05$ para GCSx 12 semanas vs GCSx 10 dias; % $p < 0,05$ para GCSx 12 semanas vs PINX 12 semanas. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Figura 58 – Resumo esquemático das alterações vistas na expressão do oscilador molecular do fígado após a ganglionectomia e pinealectomia.



(A) Alterações no oscilador molecular do fígado após 10 dias de ganglionectomia. (B) Alterações no oscilador molecular do fígado após 12 semanas de ganglionectomia. (C) Alterações no oscilador molecular do fígado após 12 semanas de pinealectomia.

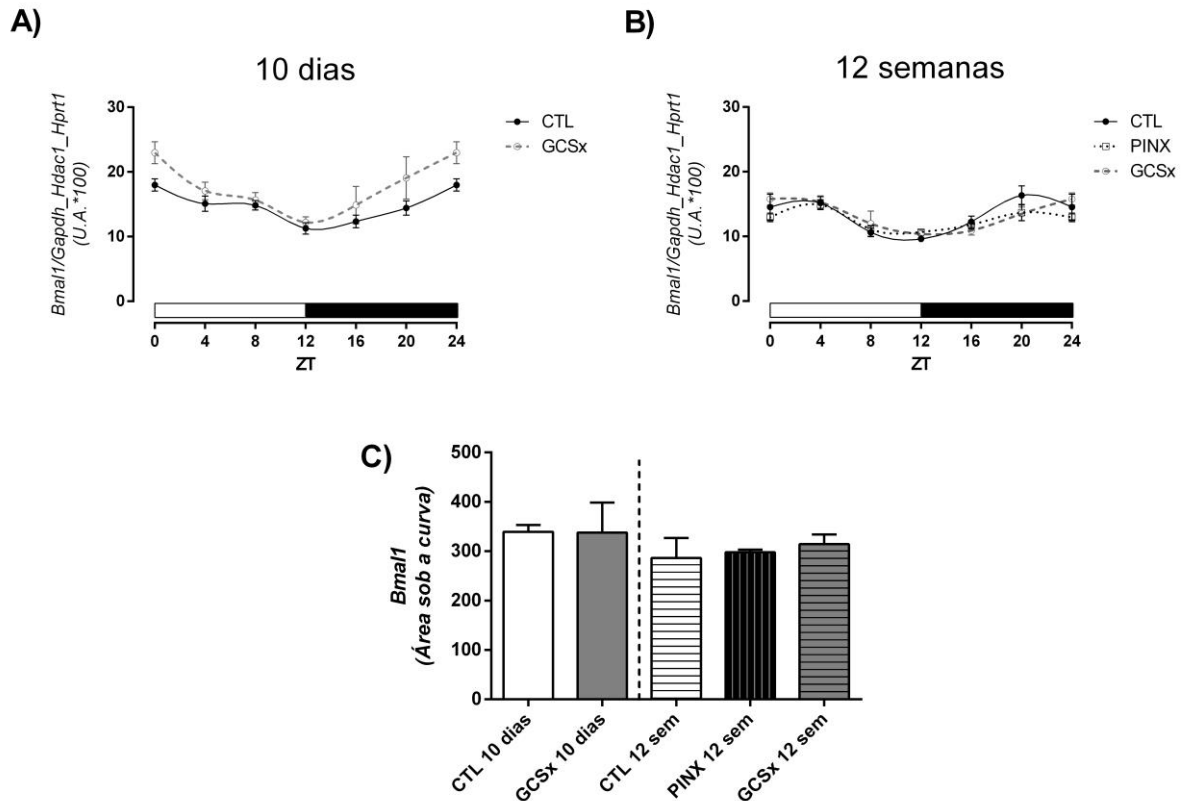
5.10 Perfil circadiano dos genes da alça primária do oscilador no núcleo supraquiasmático: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia

A fim de se avaliar no oscilador central os efeitos da ganglionectomia e pinealectomia, verificou-se a expressão dos genes relógio no núcleo supraquiasmático.

5.10.1 Alça primária do oscilador – elementos positivos: *Bmal1* e *Clock* no núcleo supraquiasmático

Como já observado nos outros tecidos, a expressão gênica de *Bmal1* no núcleo supraquiasmático de animais controles variou ao longo do dia, e não houve alterações após 10 e 12 semanas após realização das cirurgias (Figura 59 A e B).

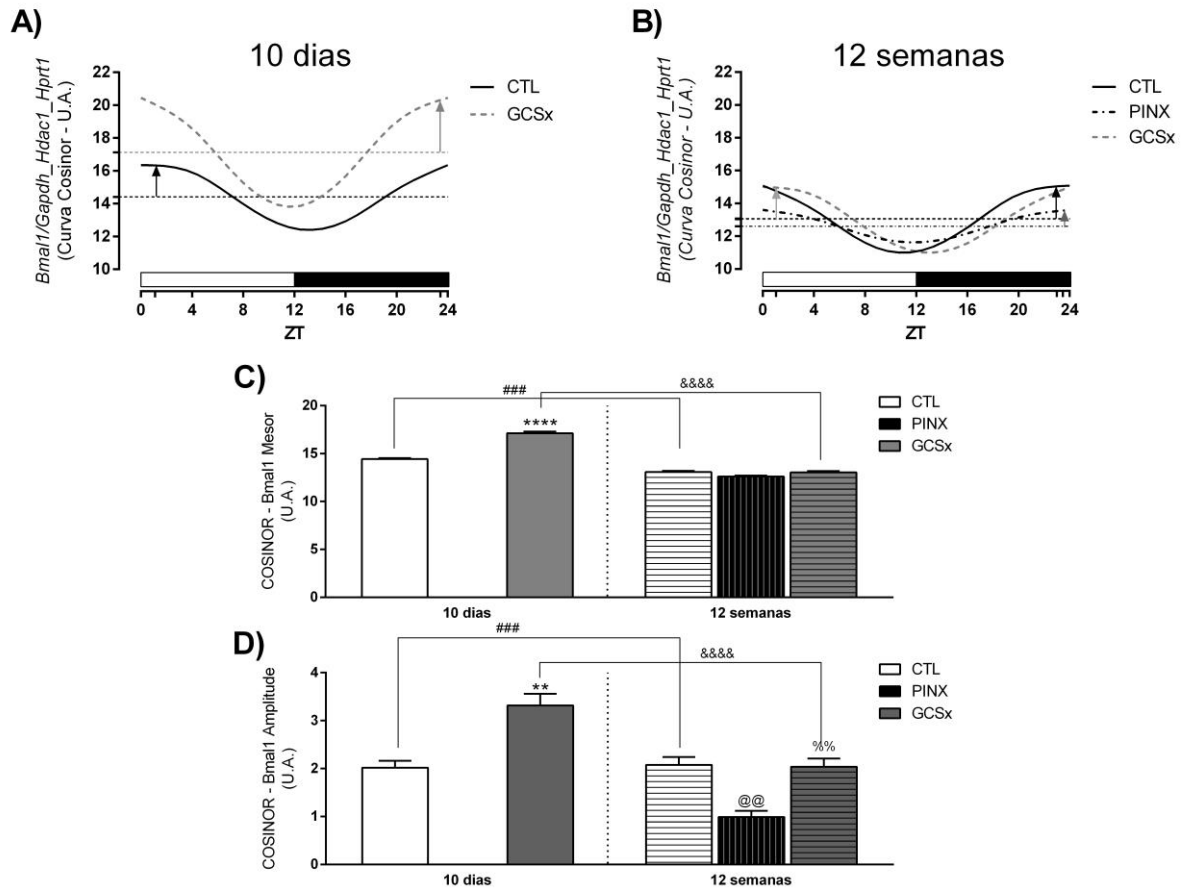
Figura 59 – Perfil diário de RNAm do gene *Bmal1* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.



(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Bmal1* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,0008$ para o fator cirurgia e $p = 0,6000$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0006$ para o grupo CTL e $p = 0,0042$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Bmal1* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia ou pinealectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,2822$ para o fator cirurgia e $p = 0,3445$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0053$ para o grupo CTL; $p = 0,0275$ para o grupo PINX e $p = 0,0017$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Bmal1*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com $p > 0,05$ em todos os grupos. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Após a análise pelo Cosinor, viu-se que a variação da expressão de *Bmal1* foi rítmica nos animais controles e que o ritmo não foi abolido após as cirurgias (Figuras 60 A e B). Após 10 dias, a remoção do gânglio cervical superior promoveu um aumento no mesor e amplitude (Figura 60 C e D) e um adiantamento da acrofase (Figura 74). Após 12 semanas esse efeito sobre o mesor e a amplitude foram perdidos e a acrofase passou a demonstrar um atraso de fase. A remoção da glândula pineal, não foi capaz de alterar mesor e acrofase, mas promoveu uma redução na amplitude de expressão do *Bmal1* (Figura 60 D).

Figura 60 – Perfil diário de RNAm do gene *Bmal1* analisado pelo método Cosinor no núcleo supraquiasmático.

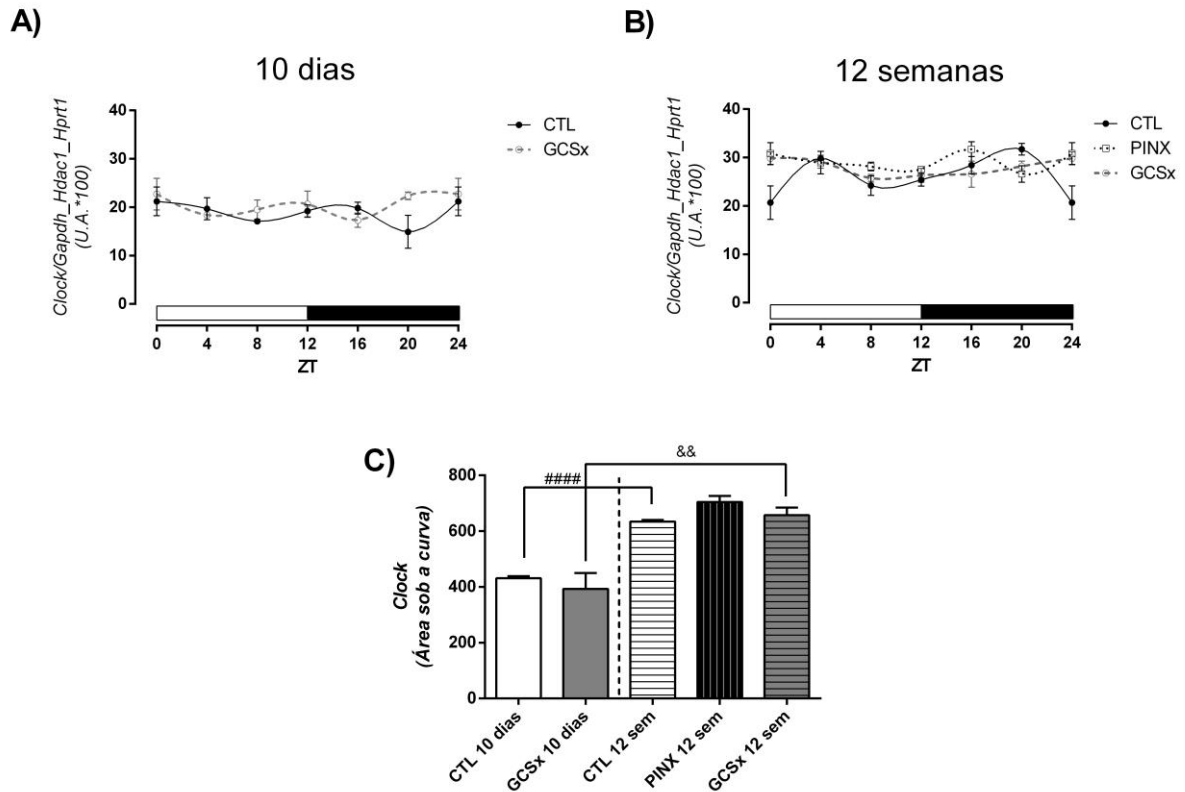


(A) Perfis diários de expressão de *Bmal1* no núcleo supraquiasmático de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Bmal1* no núcleo supraquiasmático de animais controles e ganglionectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com **** $p < 0,0001$ vs CTL 10 dias; ### $p = 0,0001$ vs CTL 10 dias; &&&& $p < 0,0001$. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com ** $p = 0,034$; ### $p = 0,0011$ vs CTL 10 dias; &&&& $p < 0,0001$ vs GCSx 10 dias. ANOVA de uma via com pós teste Bonferroni, com @@@ $p < 0,001$ vs CTL 12 semanas; %% $p < 0,001$ vs PINX 12 semanas. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

De acordo com a avaliação da expressão do outro elemento positivo, o *Clock*, houve variação ao longo das 24 h apenas no grupo controle após 12 semanas de protocolo (Figuras 61 A e B). Em contrapartida, viu-se o efeito do tempo promovendo o aumento a expressão de *Clock* (Figura 61 C).

Ao ser submetida à análise do Cosinor, a variação circadiana observada na expressão de *Clock* dos animais controles sob o protocolo experimental de 12 semanas não foi rítmica, demonstrando que não houve oscilação rítmica da expressão de *Clock* em nenhum dos grupos estudados.

Figura 61 – Perfil diário de RNAm do gene *Clock* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.



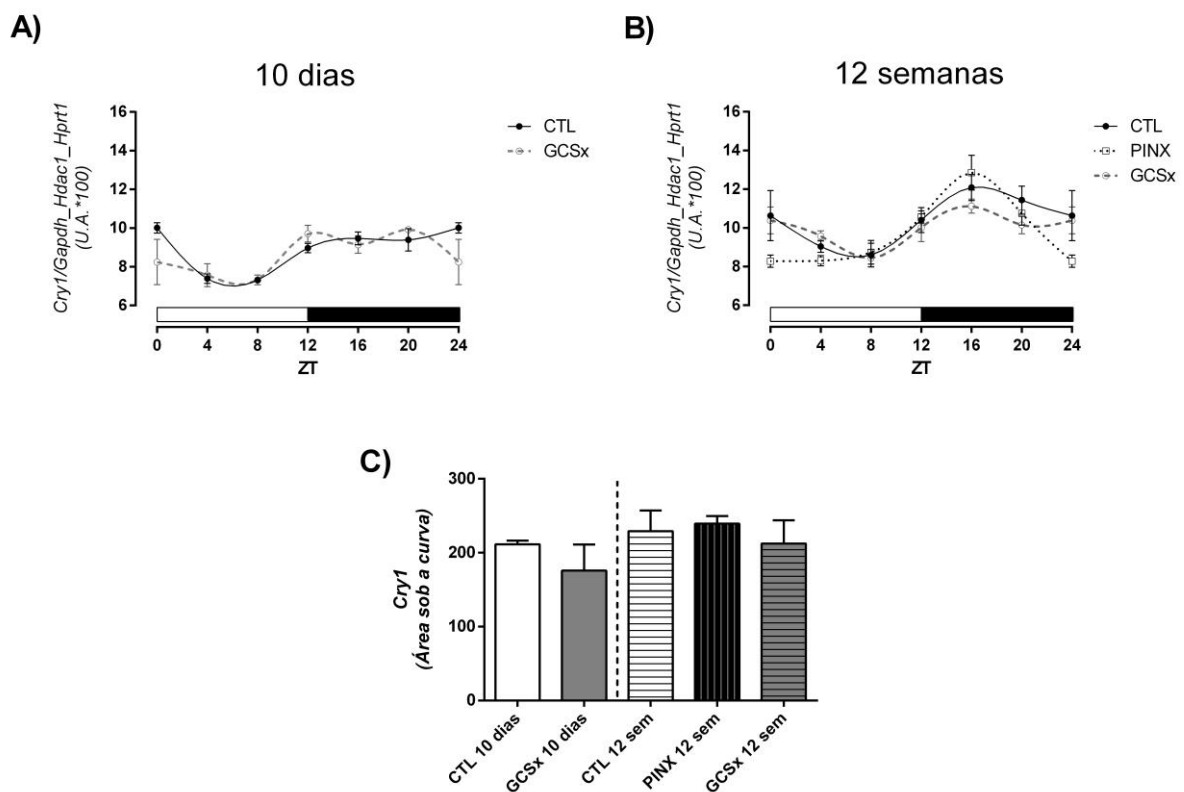
(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Clock* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,5623$ para o fator ZT, $p = 0,2888$ para o fator cirurgia e $p = 0,6834$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,5271$ para o grupo CTL e $p = 0,6767$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Clock* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia ou pinealectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,2077$ para o fator ZT, $p = 0,0056$ para o fator cirurgia e $p = 0,0077$ para o fator interação para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0077$ para o grupo CTL; $p = 0,5171$ para o grupo PINX e $p = 0,3837$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Clock*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com #### $p < 0,0001$ vs CTL 12 semanas; && $p = 0,0058$ vs GCSx 12 semanas. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Portanto, a remoção do gânglio cervical superior ou da pineal foi capaz de alterar apenas a expressão de um elemento positivo da alça primária, o *Bmal1*, com maior efeito na ganglionectomia após 10 dias.

5.10.2 Alça primária – elementos negativos: *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per2* no núcleo supraquiasmático

Para a avaliação do efeito das cirurgias sobre os elementos negativos da alça primária do oscilador molecular do núcleo supraquiasmático, foram avaliadas as expressões dos genes *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per2*.

Figura 62 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry1* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.



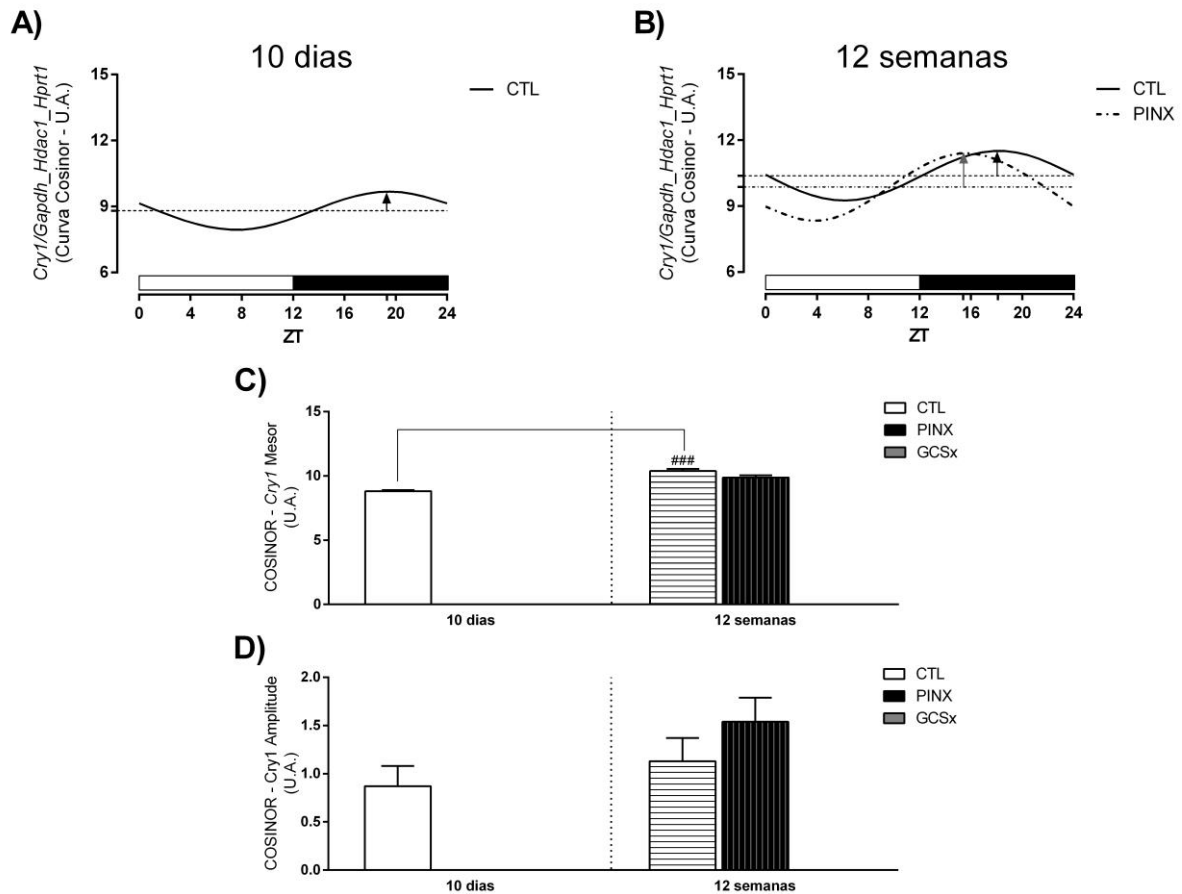
(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Cry1* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0033$ para o fator ZT e $p > 0,05$ para os fatores cirurgia e interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL e $p = 0,2526$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Cry1* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia ou pinealectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,1129$ para o fator cirurgia e $p = 0,0816$ para o fator interação para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0457$ para o grupo CTL; $p < 0,0001$ para o grupo PINX e $p = 0,1061$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Cry1*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com $p > 0,05$. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Com relação à expressão do gene *Cry1* no núcleo supraquiasmático, viu-se que houve variação ao longo das 24 h nos grupos controles e que a ganglionectomia, eliminou a variação observada previamente (Figuras 62 A e B). A pinealectomia não exerceu efeito sobre a

expressão de *Cry1* que continuou apresentando variação. Não foram vistas alterações no nível de expressão após as cirurgias (Figura 62 C).

Os grupos que apresentaram variação diária na expressão de *Cry1* foram submetidos à análise rítmica. Sob o protocolo de 10 dias, os animais controles apresentaram variação circadiana rítmica (Figura 63 A). Esses resultados corroboram o fato de que a ganglionectomia aboliu o ritmo de expressão de *Cry1* no núcleo supraquiasmático. Em contrapartida, os animais pinealectomizados apresentaram variação circadiana rítmica (Figura 63 B), permitindo a determinação de seus parâmetros rítmicos. A pinealectomia não alterou o mesor e nem a amplitude, mas levou ao adiantamento de fase (Figuras 63 C, D e 74, respectivamente).

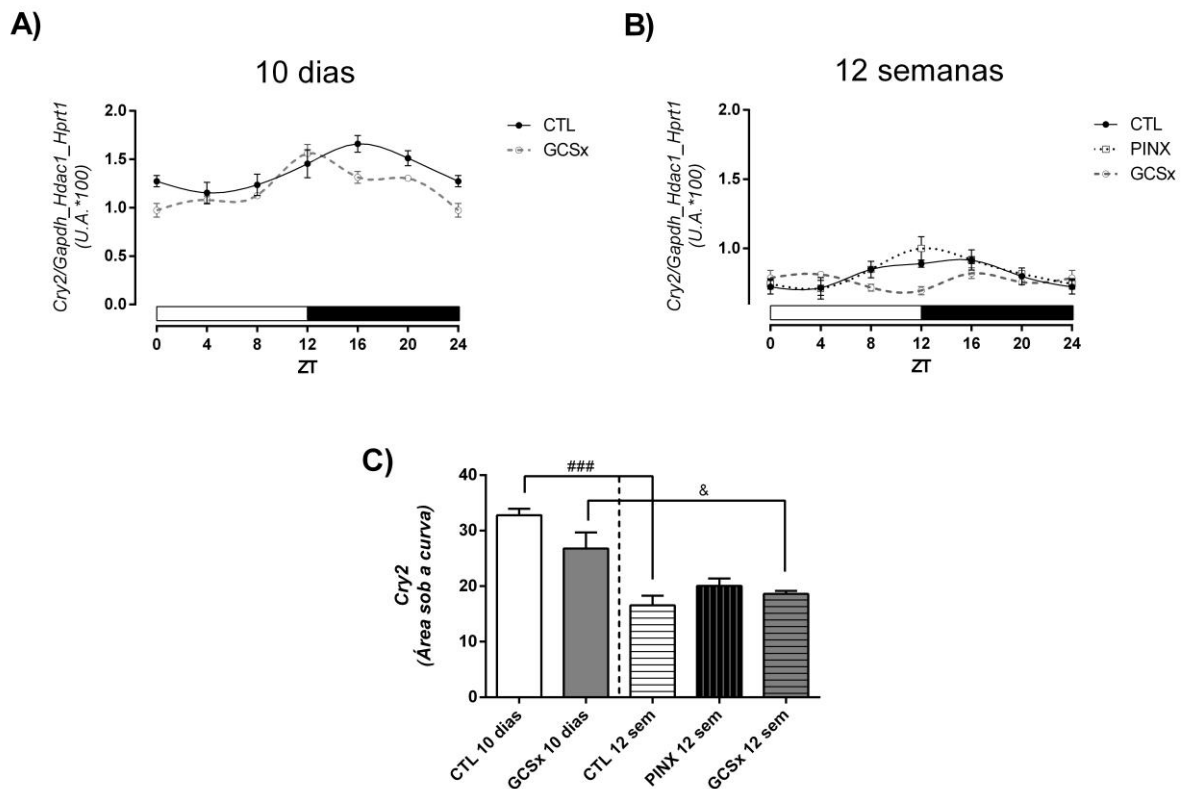
Figura 63 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry1* analisado pelo método Cosinor no núcleo supraquiasmático.



(A) Perfil diário de expressão de *Cry1* no núcleo supraquiasmático de animais controles sob o protocolo de 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Cry1* no núcleo supraquiasmático de animais controles e pinealectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles e pinealectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $### p = 0,0001$ vs CTL 10 dias; (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles e pinealectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $p > 0,05$ entre os grupos. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

De acordo com a análise de expressão gênica de *Cry2*, foi constatado que os animais controles apresentaram variação rítmica ao longo das 24 h. A ganglionectomia por 10 dias não aboliu tal característica (Figura 64 A), diferente do que ocorre após 12 semanas da cirurgia, quando se viu a perda da variação diária (Figura 64 B). Após 12 semanas de pinealectomia não houve alteração da expressão de *Cry2* quando comparado ao grupo controle (Figura 64 B).

Figura 64 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry2* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.



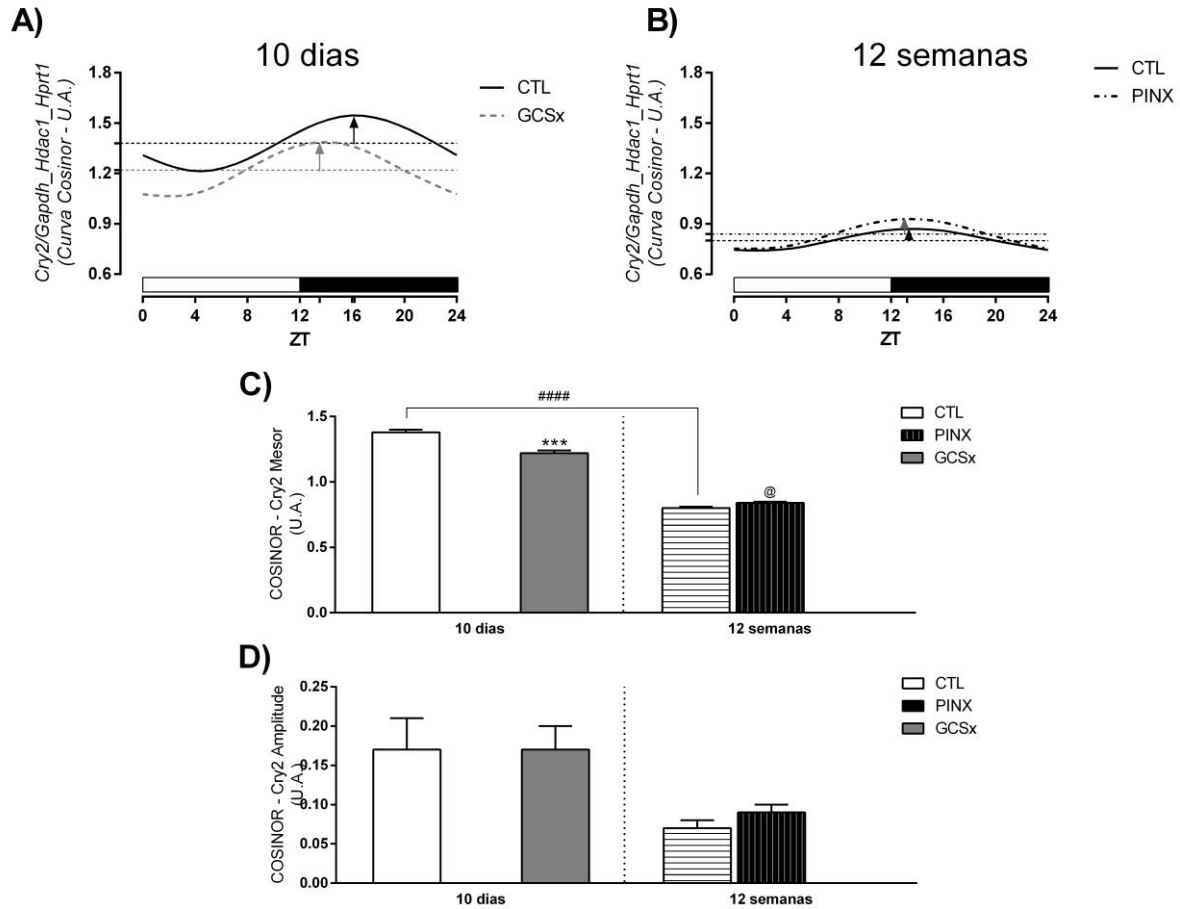
(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Cry2* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,0010$ para o fator cirurgia e $p = 0,1134$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0328$ para o grupo CTL e $p = 0,0001$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Cry2* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia ou pinealectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0038$ para o fator ZT, $p = 0,1129$ para o fator cirurgia e $p = 0,0505$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0459$ para o grupo CTL; $p = 0,0235$ para o grupo PINX e $p = 0,4138$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Cry2*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com ### $p = 0,0009$ vs CTL 10 dias; & $p = 0,0435$ vs GCSx 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

A extensão do protocolo por 12 semanas resultou em redução da expressão de *Cry2* em animais controles e ganglionectomizados, demonstrado através da redução da área sob a curva de sua expressão (Figura 64 C).

Ao serem submetidos à análise rítmica, verificou-se que a variação encontrada nos animais controles, tanto em 10 dias quanto em 12 semanas, foi circadianamente rítmica, assim como a dos animais ganglionectomizados por 10 dias e a dos animais pinealectomizados por 12 semanas (Figuras 65 A e B).

Apesar de não resultar em abolição de ritmo de *Cry2*, a ganglionectomia por 10 dias promoveu uma redução do mesor e adiantamento da acrofase, enquanto que o parâmetro amplitude permaneceu inalterado. A pinealectomia promoveu um aumento do mesor, porém não alterou significativamente a amplitude, e nem modificou a acrofase. As 12 semanas de protocolo promoveram redução do mesor e adiantamento de fase na expressão de *Cry2* de animais controles (Figuras 65 C, D e 74).

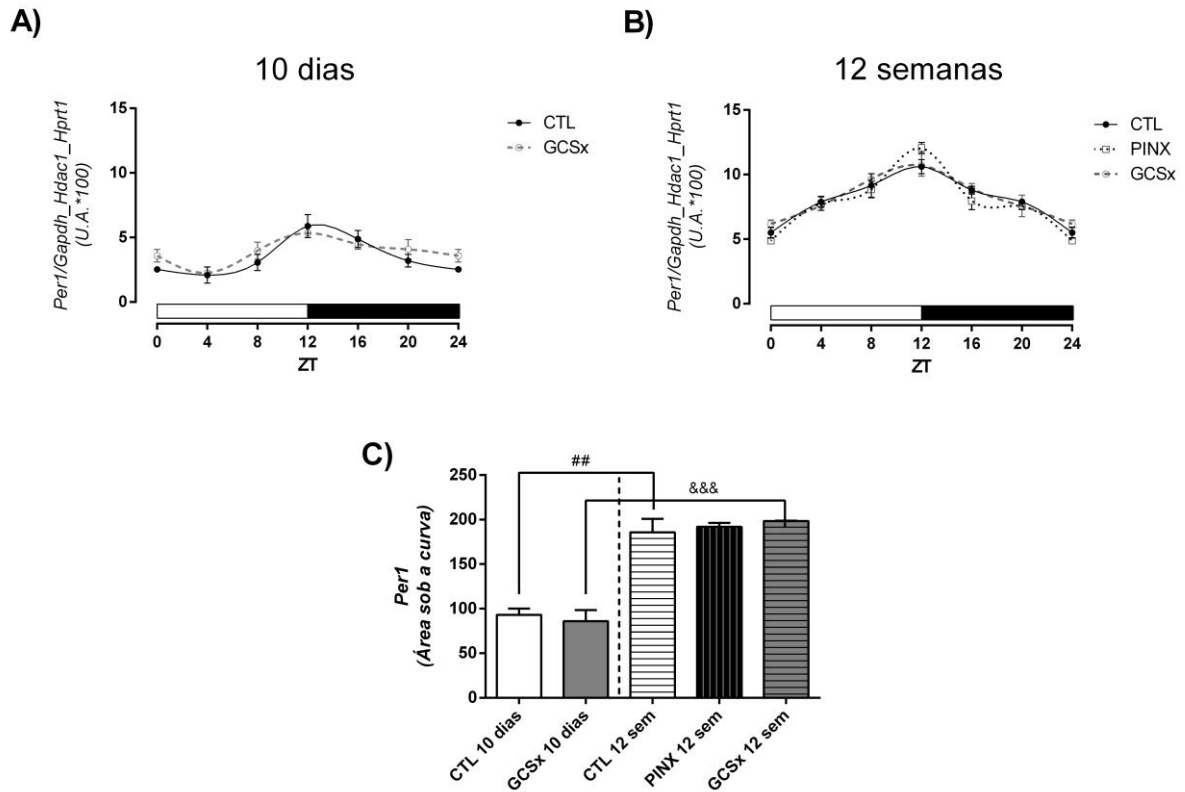
Figura 65 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry2* analisado pelo método Cosinor no núcleo supraquiasmático.



(A) Perfis diários de expressão de *Cry2* no núcleo supraquiasmático de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Cry2* no núcleo supraquiasmático de animais controles e pinealectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles, ganglionectomizados e pinealectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com *** $p = 0,0013$; #### $p < 0,0001$ vs CTL 10 dias; @ $p = 0,030$. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles, ganglionectomizados e pinealectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $p > 0,05$ entre os grupos. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

A análise da expressão gênica de *Per1*, mostrou a existência de variação ao longo das 24 h nos animais controles e a ganglionectomia por 10 dias não alterou tal característica (Figura 66 A). Esse mesmo padrão foi visto na realização do protocolo de 12 semanas, já que a variação observada nos animais controles não foi abolida pela ganglionectomia e nem pela pinealectomia (Figura 66 B). As cirurgias em si, também não resultaram em alteração no nível de expressão desse gene, enquanto que o fator duração de protocolo foi capaz de reduzir os valores encontrados para os animais controles e ganglionectomizados (Figura 66 C).

Figura 66 – Perfil diário de RNAm do gene *Per1* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.

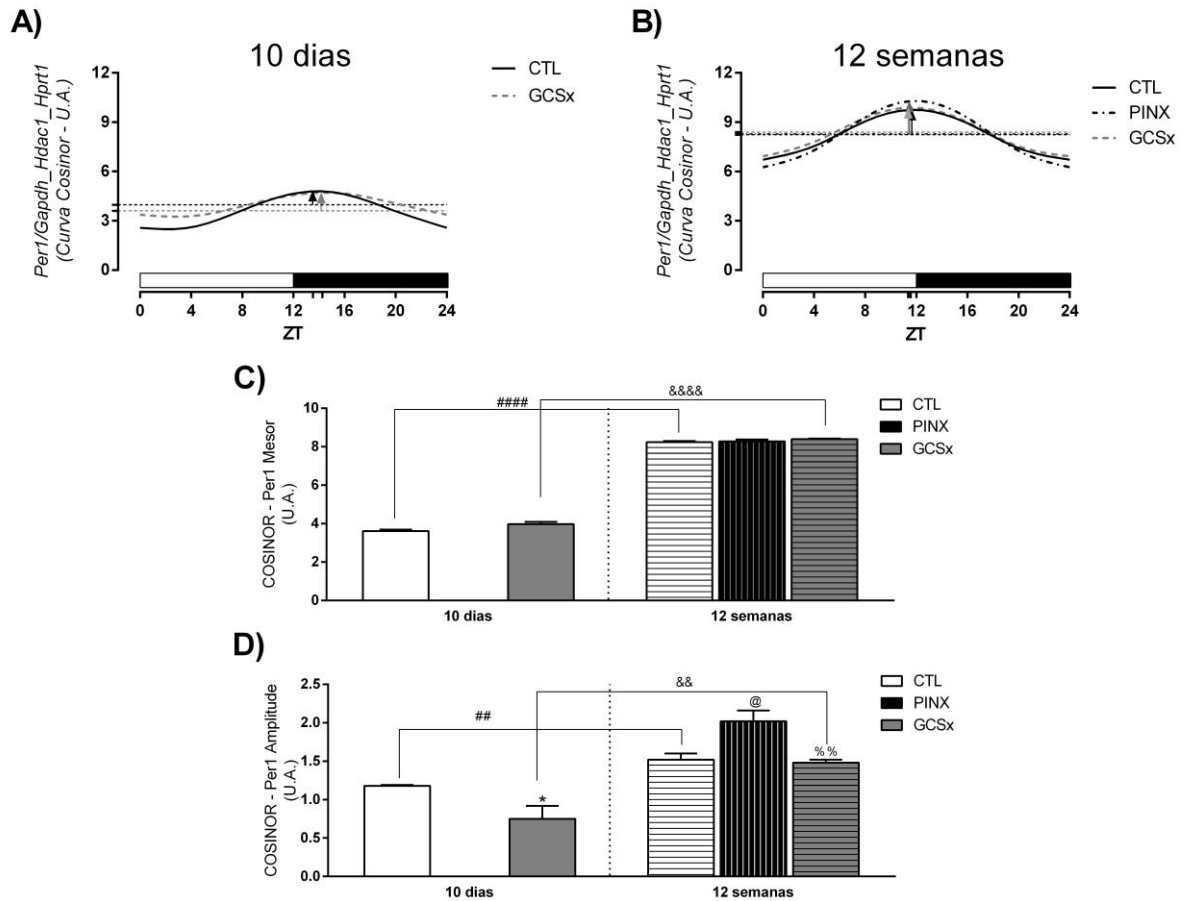


(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Per1* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,1201$ para o fator cirurgia e $p = 0,4237$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0017$ para o grupo CTL e $p = 0,0026$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Per1* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia ou pinealectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0038$ para o fator ZT, $p = 0,1129$ para o fator cirurgia e $p = 0,0816$ para o fator interação para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0459$ para o grupo CTL; $p = 0,0235$ para o grupo PINX e $p = 0,4138$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Per1*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com ### $p = 0,0009$ vs CTL 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Ao serem submetidas à análise Cosinor verificou-se que as curvas de expressão de *Per1* foram consideradas rítmicas em todos os grupos estudados, tanto em 10 dias, quanto em 12 semanas (Figura 67 A e B). Além de não abolir a ritmicidade, a ganglionectomia e pinealectomia não alteraram o mesor (Figura 67 C). Em contrapartida, a remoção por um curto prazo do gânglio cervical superior levou à uma redução da amplitude, enquanto que a longo prazo viu-se aumento da amplitude apenas no grupo pinealectomizado (Figura 67 D). As acrofases não foram alteradas após a realização das cirurgias (Figura 74).

A duração do protocolo experimental teve efeito sobre a expressão de *Per1*, promovendo o aumento do mesor e amplitude, nos animais ganglionectomizados e controles (Figuras 67 C e D) e promovendo um adiantamento de fase em ambos os grupos (Figura 74).

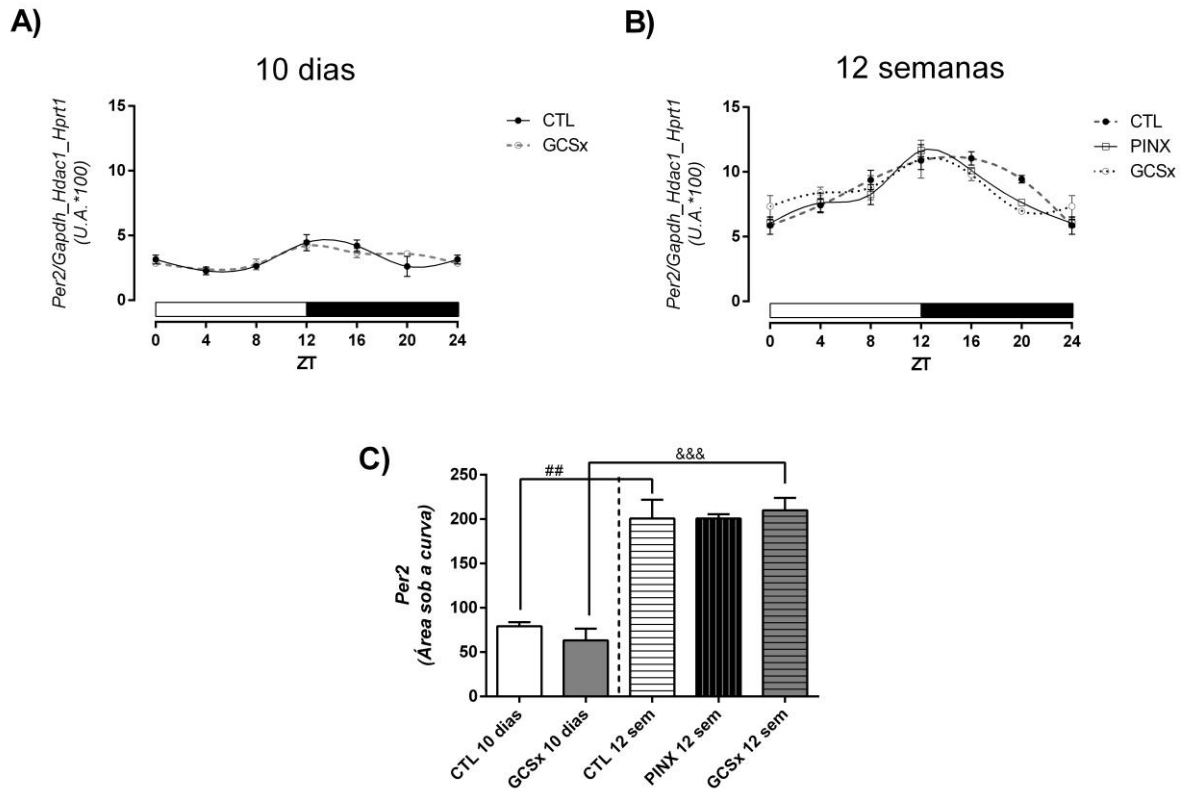
Figura 67 – Perfil diário de RNAm do gene *Per1* analisado pelo método Cosinor no núcleo supraquiasmático.



(A) Perfis diários de expressão de *Per1* no núcleo supraquiasmático de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Per1* no núcleo supraquiasmático de animais controles e pinealectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles, ganglionectomizados e pinealectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com ##### $p < 0,0001$ vs CTL 10 dias; &&&& $p < 0,0001$. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles, pinealectomizados e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com * $p = 0,0450$ vs CTL 10 dias; ## $p = 0,0056$; && $p = 0,0058$; ANOVA de uma via com pós teste Bonferroni, com @ $p = p < 0,05$ vs CTL 12 semanas; %% $p < 0,001$ vs PINX 12 semanas. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Por fim, a análise das curvas de expressão de *Per2*, indicaram a existência de variação ao longo das 24 h em todos os grupos estudados (Figura 68 A e B). O nível de expressão de *Per2* não foi alterado pelas cirurgias (Figura 68 C).

Figura 68 – Perfil diário de RNAm do gene *Per2* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.

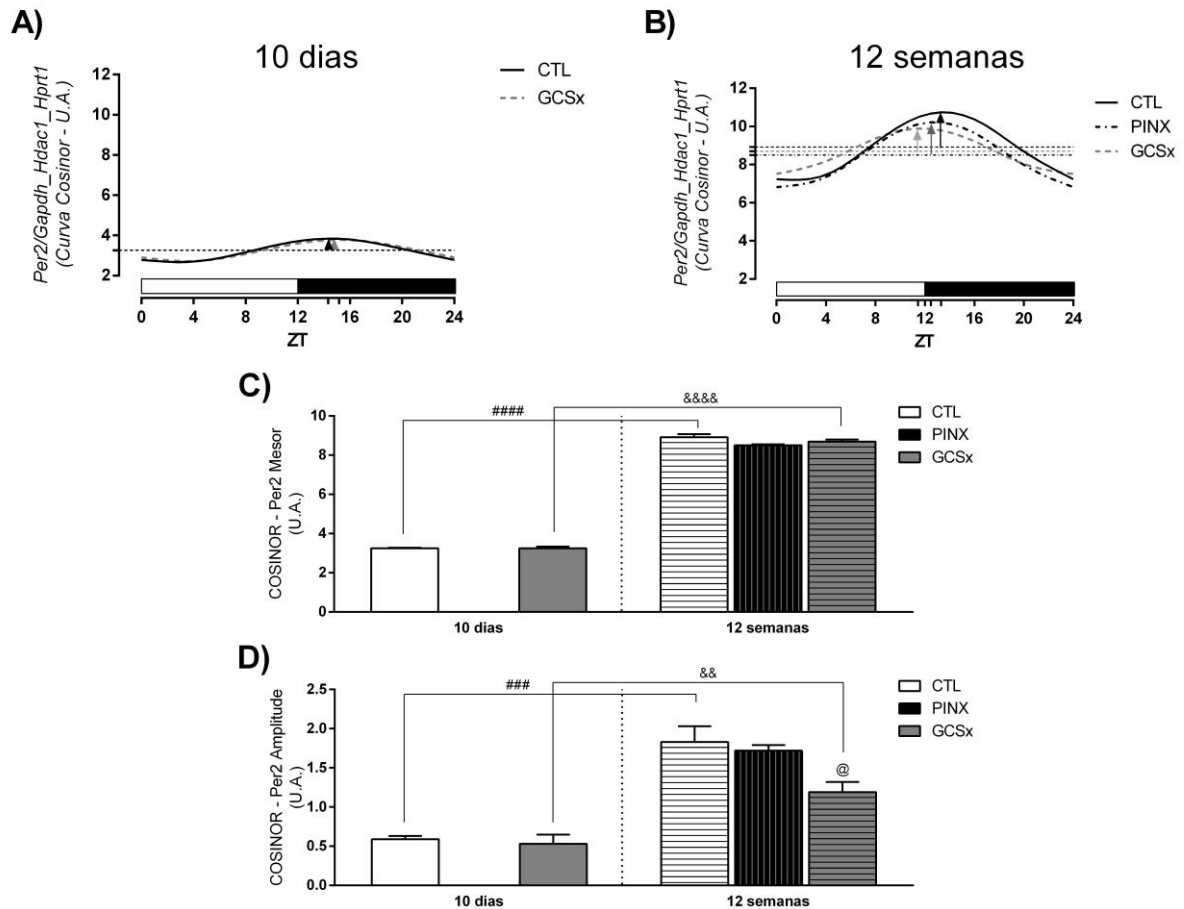


(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Per2* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0008$ para o fator ZT, $p = 0,9301$ para o fator cirurgia e $p = 0,7439$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0415$ para o grupo CTL e $p = 0,0247$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Per2* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia ou pinealectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,6344$ para o fator cirurgia e $p = 0,1305$ para o fator interação para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o grupo CTL; $p < 0,0001$ para o grupo PINX e $p = 0,0146$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Per2*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com ## $p = 0,0015$ vs CTL 10 dias; &&& $p = 0,0007$. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Ao serem submetidas ao Cosinor, constatou-se que todos os grupos apresentaram variação circadiana rítmica (Figura 69 A e B), levando à determinação dos parâmetros rítmicos. A ganglionectomia a longo prazo resultou em redução da amplitude e adiantamento de fase (Figuras 69 C e 74). A pinealectomia não gerou alterações na expressão de *Per2*.

A duração do protocolo experimental levou ao aumento do mesor e amplitude, e a um adiantamento da acrofase nos animais ganglionectomizados (Figura 69 A, B e 74).

Figura 69 – Perfil diário de RNAm do gene *Per2* analisado pelo método Cosinor no núcleo supraquiasmático.



(A) Perfis diários de expressão de *Per2* no núcleo supraquiasmático de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Per2* no núcleo supraquiasmático de animais controles e pinealectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles, ganglionectomizados e pinealectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com #### $p < 0,0001$ vs CTL 10 dias; &&&& $p < 0,0001$. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles, pinealectomizados e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com ### $p = 0,0009$ vs CTL 10 dias; && $p = 0,0097$; ANOVA de uma via com pós teste Bonferroni, com @ $p < 0,05$ vs CTL 12 semanas. Comprimento da seta = amplitude; Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Mediante os resultados obtidos pela análise rítmica da expressão dos elementos negativos da alça primária do oscilador molecular do núcleo supraquiasmático, viu-se respostas diferentes geradas por ganglionectomia e pinealectomia, sendo que a remoção do gânglio cervical superior foi capaz de abolir ritmicidade em dois, dos quatro genes analisados (*Cry1* e *Cry2*), exercendo um importante papel na regulação desses elementos negativadores.

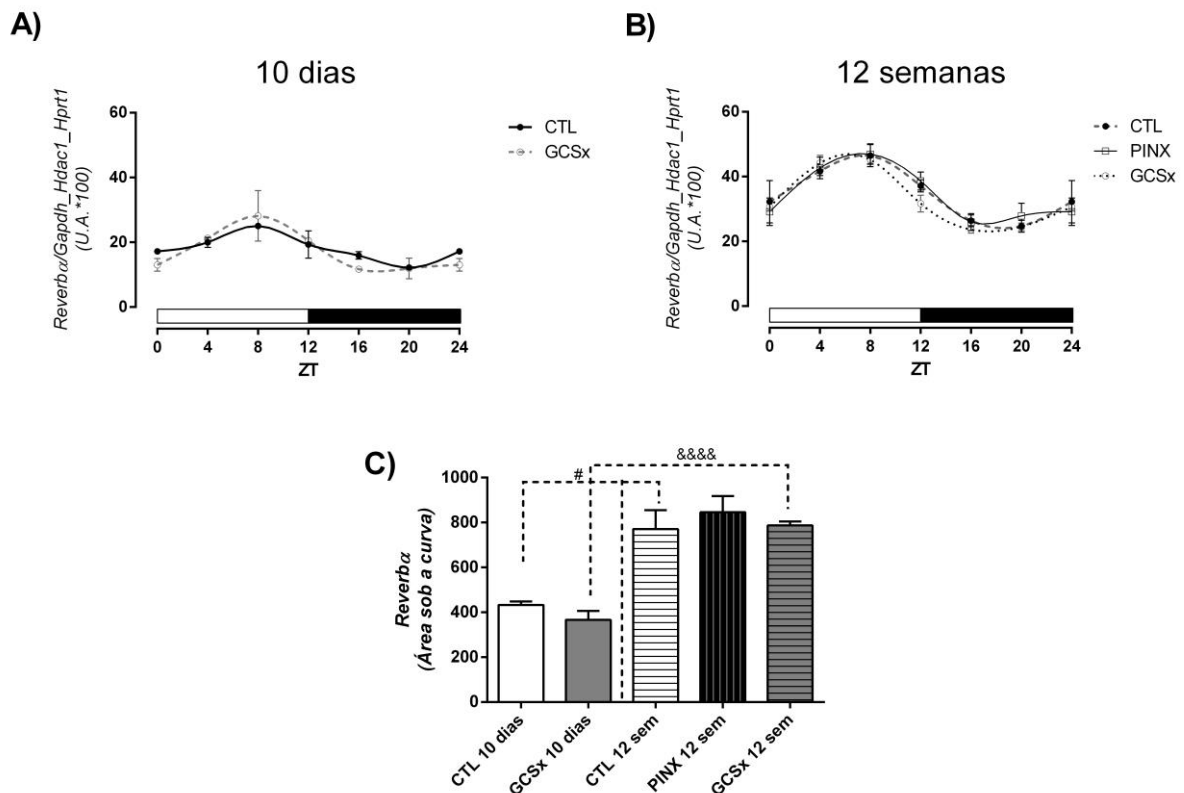
5.11 Perfil circadiano do gene da alça secundária do oscilador no núcleo supraquiasmático: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia

Com relação à alça secundária do oscilador, o gene analisado por PCR em tempo real foi o *Rev-erba*.

5.11.1 *Rev-erba* no núcleo supraquiasmático

A expressão de *Rev-erba* apresentou variação ao longo das 24 h em todos os grupos estudados (Figura 70 A e B) e seus níveis de expressão permaneceram os mesmos (Figura 70 C).

Figura 70 – Perfil diário de RNAm do gene *Rev-erba* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.



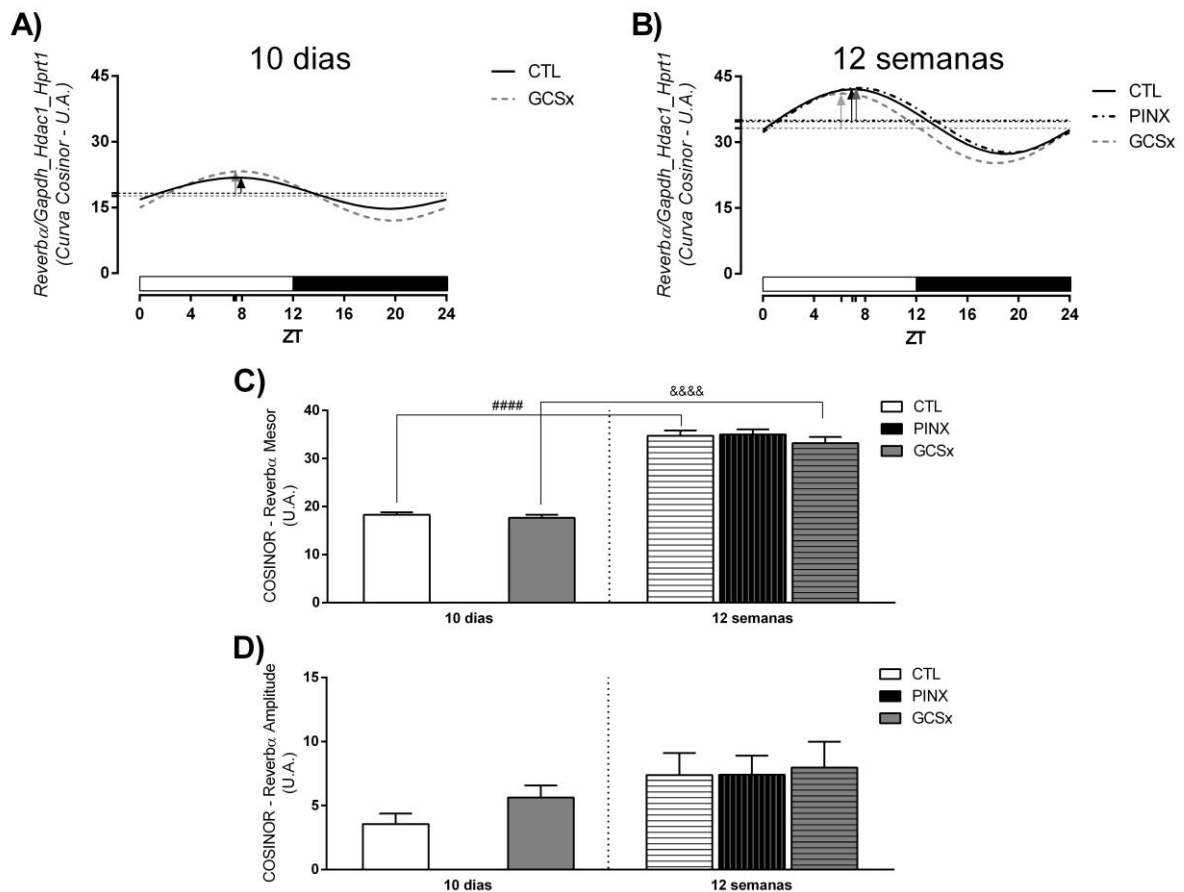
(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Rev-erba* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 10 dias de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0008$ para o fator ZT, $p = 0,4164$ para o fator cirurgia e $p = 0,4854$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0035$ para o grupo CTL e $p = 0,0044$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Rev-erba* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia ou pinealectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,6344$ para o fator cirurgia e $p = 0,9639$ para o fator interação para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0012$ para o grupo CTL; $p = 0,0023$ para o grupo PINX e $p < 0,0001$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada

grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Reverba*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com $^{\#}p = 0,0198$ vs CTL 10 dias; $^{\&\&\&}p < 0,0001$. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Após análise individual das curvas, os perfis de expressão que exibiram variação foram submetidos à análise Cosinor. A realização das cirurgias não foi capaz de abolir a ritmicidade observada nos grupos controles (Figura 71 A e B) e nem de alterar os parâmetros rítmicos observados (Figura 71 C, D e 74).

Por fim, a duração do protocolo experimental levou ao aumento do mesor, tanto em animais controles, quanto em animais ganglionectomizados (Figura 71), mas não promoveu alterações em amplitude e acrofase (Figuras 71 D e 74).

Figura 71 – Perfil diário de RNAm do gene *Reverba* analisado pelo método Cosinor no núcleo supraquiasmático.



(A) Perfis diários de expressão de *Reverba* no núcleo supraquiasmático de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Reverba* no núcleo supraquiasmático de animais controles e pinealectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles, ganglionectomizados e pinealectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $^{\#\#\#}p < 0,0001$ vs CTL 10 dias; $^{\&\&\&}p < 0,0001$. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles, pinealectomizados e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com p

$> 0,05$ em todos os grupos analisados; ANOVA de uma via com pós teste Bonferroni, com $p > 0,05$. Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Portanto, nota-se que a realização da pinealectomia ou da ganglionectomia, afetou alguns elementos da alça primária do oscilador no núcleo supraquiasmático, mas não foi capaz de alterar a alça secundária.

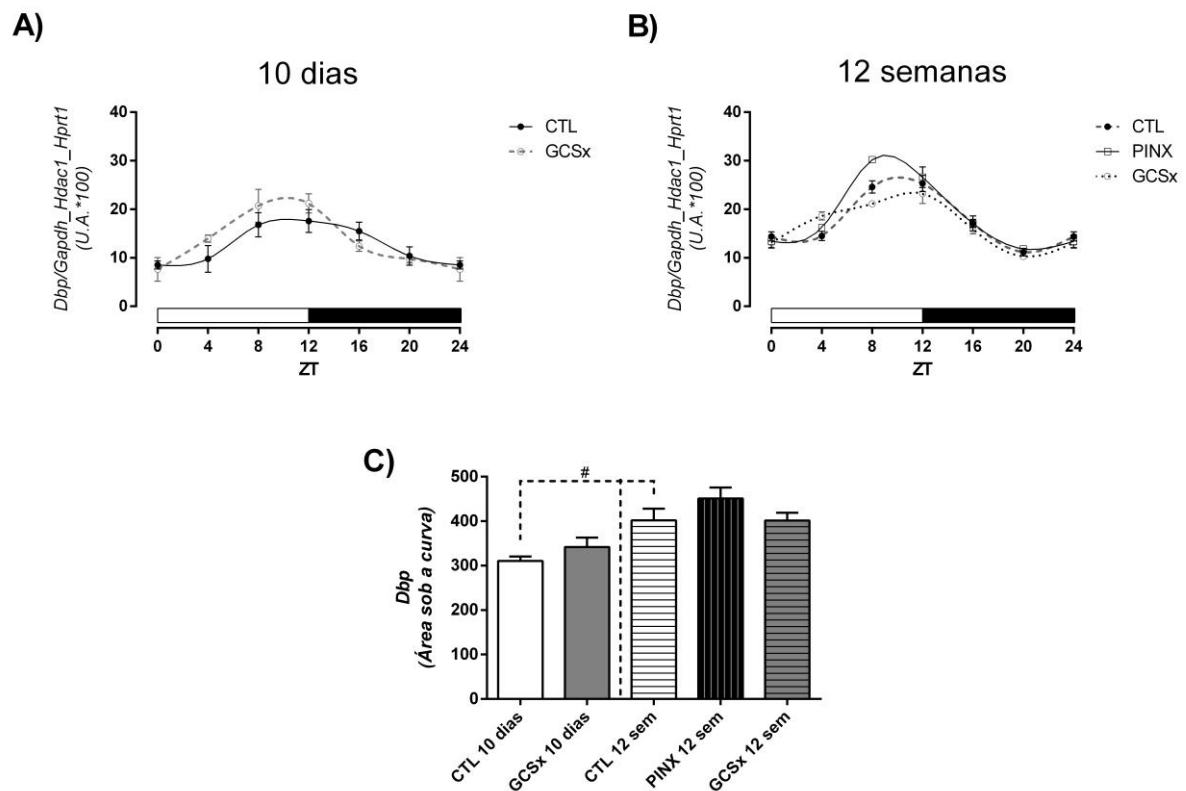
5.12 Perfil circadiano de gene dependente do relógio no núcleo supraquiasmático: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia

Para analisar se as alterações vistas no oscilador central até então comprometeriam a saída do oscilador no núcleo supraquiasmático, o gene *Dbp* foi analisado.

5.12.1 *Dbp* no núcleo supraquiasmático

Assim como o esperado, viu-se variação ao longo do dia na expressão de *Dbp* nos grupos controles e a sua variação e níveis de expressão não foram abolidos pelas cirurgias (Figura 72 A, B e C).

Figura 72 – Perfil diário de RNAm do gene *Dbp* (grupos controle, ganglionectomizado e pinealectomizado) no núcleo supraquiasmático.

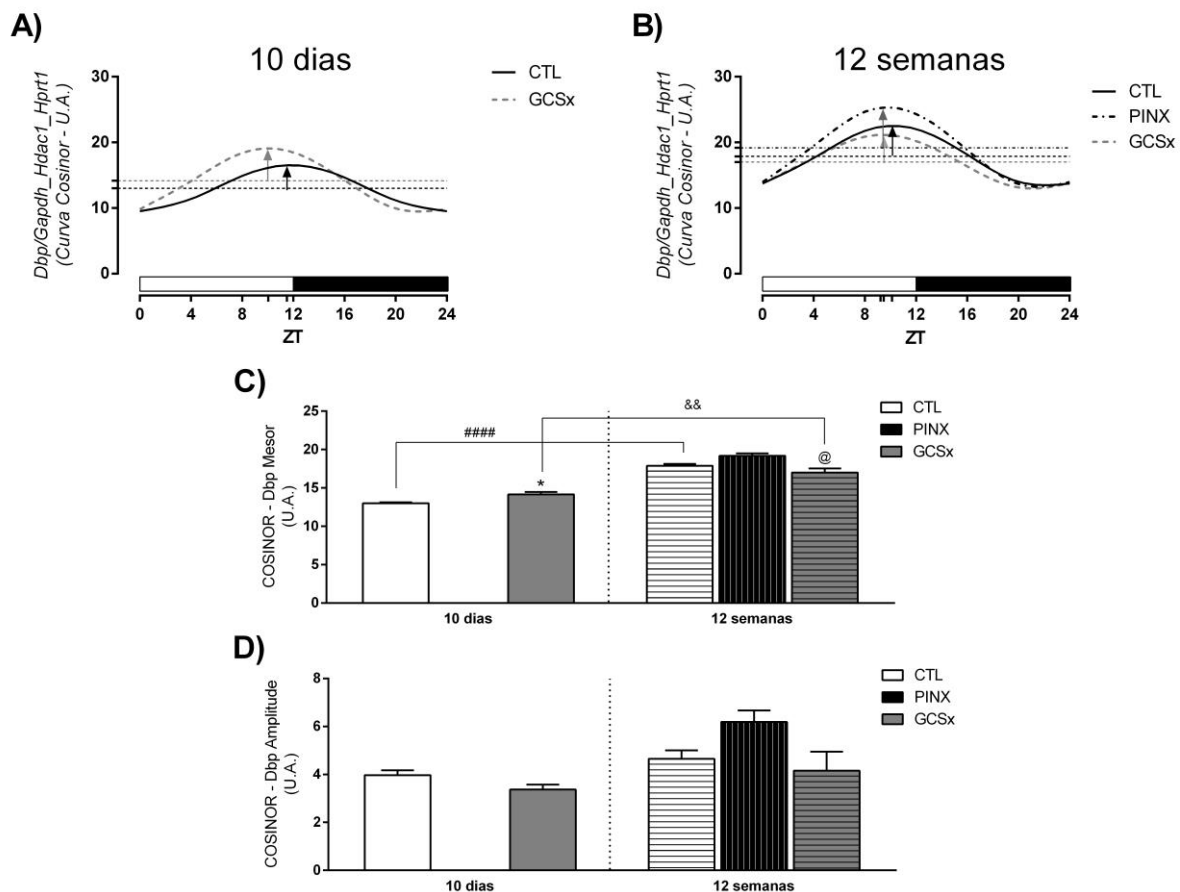


(A) Perfis diários do ritmo de expressão de *Dbp* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 10 dias

de ganglionectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,4486$ para o fator cirurgia e $p = 0,4530$ para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p = 0,0053$ para o grupo CTL e $p = 0,0004$ para o grupo GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (B) Perfis diários do ritmo de expressão de *Dbp* no núcleo supraquiasmático de animais controles e após 12 semanas de ganglionectomia ou pinealectomia. ANOVA bi fatorial, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para o fator ZT, $p = 0,0205$ para o fator cirurgia e $p = 0,0225$ para o fator interação para o fator interação. Para a avaliação individual da presença de variação ao longo do dia, fez-se ANOVA de uma via, seguida por pós teste Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ para os grupos CTL, PINX e GCSx. $n = 4$ para cada grupo, em cada ZT. (C) Áreas sob a curva dos perfis circadianos de expressão de *Dbp*, avaliadas através do Teste T de Student, bicaudal não pareado com $^{\#} p = 0,0188$ vs CTL 10 dias. Dados plotados como média \pm EPM. Valores $\times 100$ para realização da análise estatística pelo Cosinor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

A duração do protocolo experimental levou ao aumento apenas do nível de expressão de *Dbp* dos animais controles, como demonstrado pelo aumento da área sob a curva (Figura 72 C). Todas as curvas foram submetidas à análise Cosinor já que apresentaram variação ao longo das 24 h.

Figura 73 – Perfil diário de RNAm do gene *Dbp* analisado pelo método Cosinor no núcleo supraquiasmático.



(A) Perfis diários de expressão de *Dbp* no núcleo supraquiasmático de animais controles e ganglionectomizados por 10 dias, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (B) Perfis diários de expressão de *Dbp* no núcleo supraquiasmático de animais controles e pinealectomizados por 12 semanas, analisados pelo Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. (C) Parâmetro mesor nos grupos controles, ganglionectomizados e pinealectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $^{\#} p = 0,0124$; $#### p < 0,0001$ vs CTL 10 dias; $\&\& p = 0,0042$. (D) Parâmetro amplitude nos grupos controles,

pinealectomizados e ganglionectomizados por 10 e 12 semanas, Teste T de Student, bicaudal não pareado com $p > 0,05$ em todos os grupos analisados; ANOVA de uma via com pós teste Bonferroni, com $p > 0,05$. Ponta da seta = acrofase; Linha pontilhada = mesor. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

De acordo com a análise pelo método Cosinor, a variação encontrada na expressão de *Dbp* dos animais controles foi considerada rítmica e as cirurgias não aboliram essa ritmicidade (Figura 73 A e B). Com a ganglionectomia por 10 dias, foi observado um aumento no mesor e um adiantamento de fase da acrofase. Após as 12 semanas de protocolo, tais diferenças desapareceram (Figuras 73 C e 74). Não houve diferença entre os parâmetros rítmicos da expressão de *Dbp* dos animais pinealectomizados e controles (Figura 73 C, D e 74)

O fator tempo do protocolo resultou em aumento de mesor e adiantamento de fase nos animais controles (Figuras 73 C e Figura 74).

5.13 Mapa de acrofases no núcleo supraquiasmático: efeitos da ganglionectomia e da pinealectomia

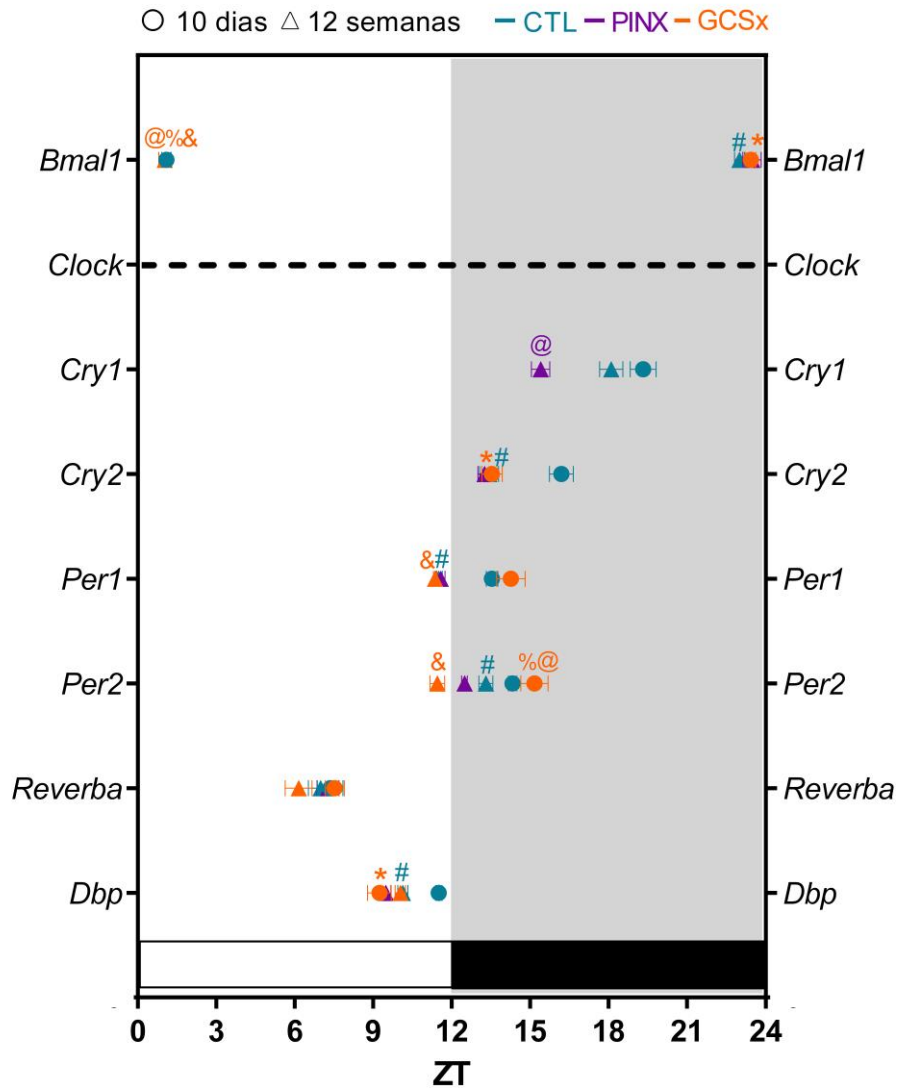
A Figura 74 mostra o mapa das acrofases dos genes analisados no núcleo supraquiasmático após ajuste pelo método Cosinor, e como esperado, todos os genes apresentaram ritmicidade circadiana no grupo controle.

A ganglionectomia e a pinealectomia agem diferentemente sobre a produção e secreção de melatonina, de forma que os efeitos sobre a expressão dos genes relógio no núcleo supraquiasmático foram diferentes entre as duas técnicas.

A ganglionectomia foi responsável por abolir a ritmicidade de *Cry1* (após 10 dias e 12 semanas) e *Cry2* (após 12 semanas). Além disso, no protocolo de 10 dias promoveu um adiantamento de fase nos genes *Bmal1*, *Cry2* e *Dbp*, enquanto que no protocolo de 12 semanas houve atraso de fase de *Bmal1* e adiantamento da fase de *Per2*.

Já a pinealectomia promoveu alterações apenas na acrofase de *Cry1*, no qual houve um adiantamento.

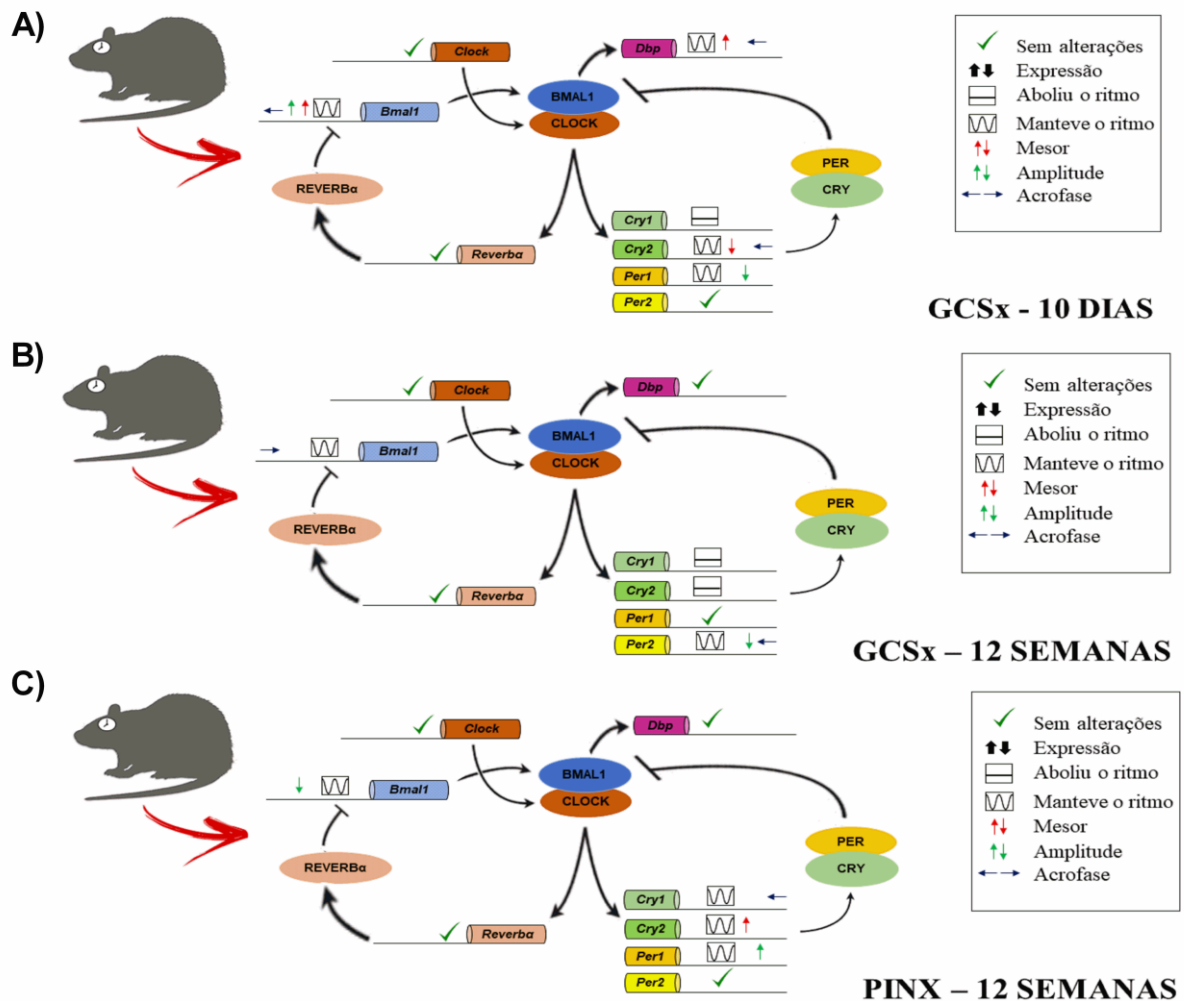
Figura 74 – Análise do momento do ponto de máxima (acrofase) dos genes analisados nos grupos controle e ganglionectomizados no núcleo supraquiasmático.



Mapa de acrofase dos genes analisados no núcleo supraquiasmático de animais controles (CTL), ganglionectomizados (GCSx) e pinealectomizados (PINX) sob os protocolos de 10 e 12 semanas. Teste T de Student, bicaudal não pareado com * $p < 0,05$ para GCSx 10 dias vs CTL 10 dias; @ $p < 0,05$ para GCSx 12 semanas ou PINX 12 semanas (de acordo com a coloração) vs CTL 12 semanas; # $p < 0,05$ para CTL 12 semanas vs CTL 10 dias; & $p < 0,05$ para GCSx 12 semanas vs GCSx 10 dias; % $p < 0,05$ para GCSx 12 semanas vs PINX 12 semanas. Barra branca = fase de claro; Barra preta = fase de escuro.

Apesar de não sofrer tantas alterações quanto a glândula pineal, o núcleo supraquiasmático foi mais afetado pelas cirurgias do que o fígado, principalmente pela ganglionectomia (Figura 75).

Figura 75 – Resumo esquemático das alterações vistas na expressão do oscilador molecular do núcleo supraquiasmático após a ganglionectomia e pinealectomia.



(A) Alterações no oscilador molecular do núcleo supraquiasmático após 10 dias de ganglionectomia. (B) Alterações no oscilador molecular do núcleo supraquiasmático após 12 semanas de ganglionectomia. (C) Alterações no oscilador molecular do núcleo supraquiasmático após 12 semanas de pinealectomia.

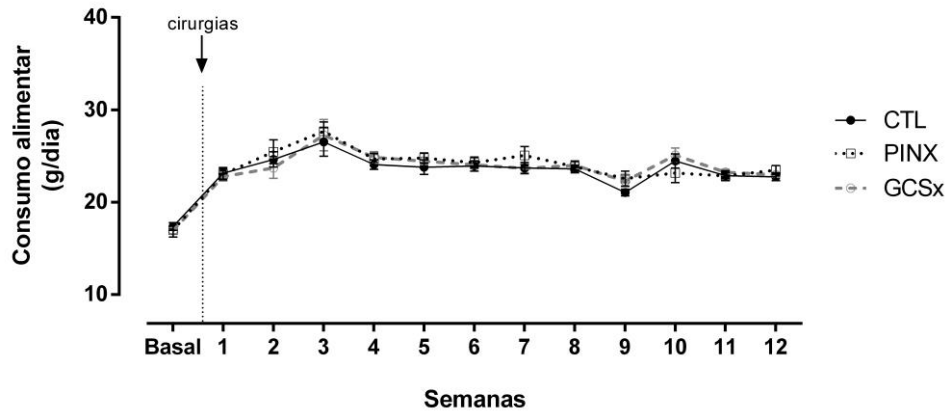
Sabendo-se dessas alterações promovidas no oscilador molecular do núcleo supraquiasmático, e da capacidade dessa estrutura em regular a ritmicidade de uma série de comportamentos e funções fisiológicas, tornou-se interessante avaliar ritmicamente a atividade e temperatura, como veremos adiante.

5.14 Análise de peso e consumo alimentar dos animais

Ao longo das 12 semanas de protocolo experimental, o peso e o consumo alimentar dos animais foram mensurados. De acordo com a análise não houve diferença no consumo alimentar

diário entre os grupos (Figura 76), demonstrando que a ganglionectomia e a pinealectomia não alteraram esse comportamento nos animais.

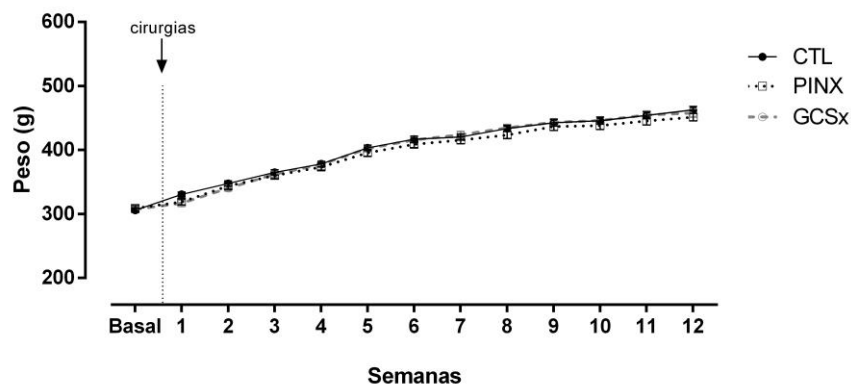
Figura 76 – Consumo alimentar dos animais após 12 semanas de protocolo



Registro do consumo médio diário de ração a cada semana em animais controles, pinealectomizados e ganglionectomizados ao longo do protocolo experimental de 12 semanas. ANOVA bi fatorial, seguido de pós teste Bonferroni, no qual $p > 0,05$ para os fatores cirurgia, tempo e interação. $n = 9$ para o grupo CTL e $n = 11$ para os grupos PINX e GCSx. Basal = média dos valores obtidos nas semanas controle do próprio animal.

De acordo com a análise de peso, as intervenções cirúrgicas promoveram uma tendência à redução do ganho de peso corporal na semana seguinte à cirurgia, mas que logo em seguida foi recuperado (Figura 77). A cirurgia foi um fator na determinação do peso dos animais analisados, porém não houve diferenças entre os grupos após as múltiplas comparações.

Figura 77 – Peso dos animais durante o protocolo de 12 semanas



Registro de peso de animais controles, pinealectomizados e ganglionectomizados a cada semana durante o protocolo experimental. ANOVA bi fatorial, seguido de pós teste Bonferroni com múltiplas comparações, no qual $p > 0,05$ para o fator interação, $p < 0,0001$ para o tempo e $p = 0,0307$ para o fator cirurgia. $n = 27$ para o grupo CTL, $n = 30$ para o grupo PINX e $n = 29$ para o grupo GCSx. Basal = média dos valores obtidos nas semanas controle do próprio animal.

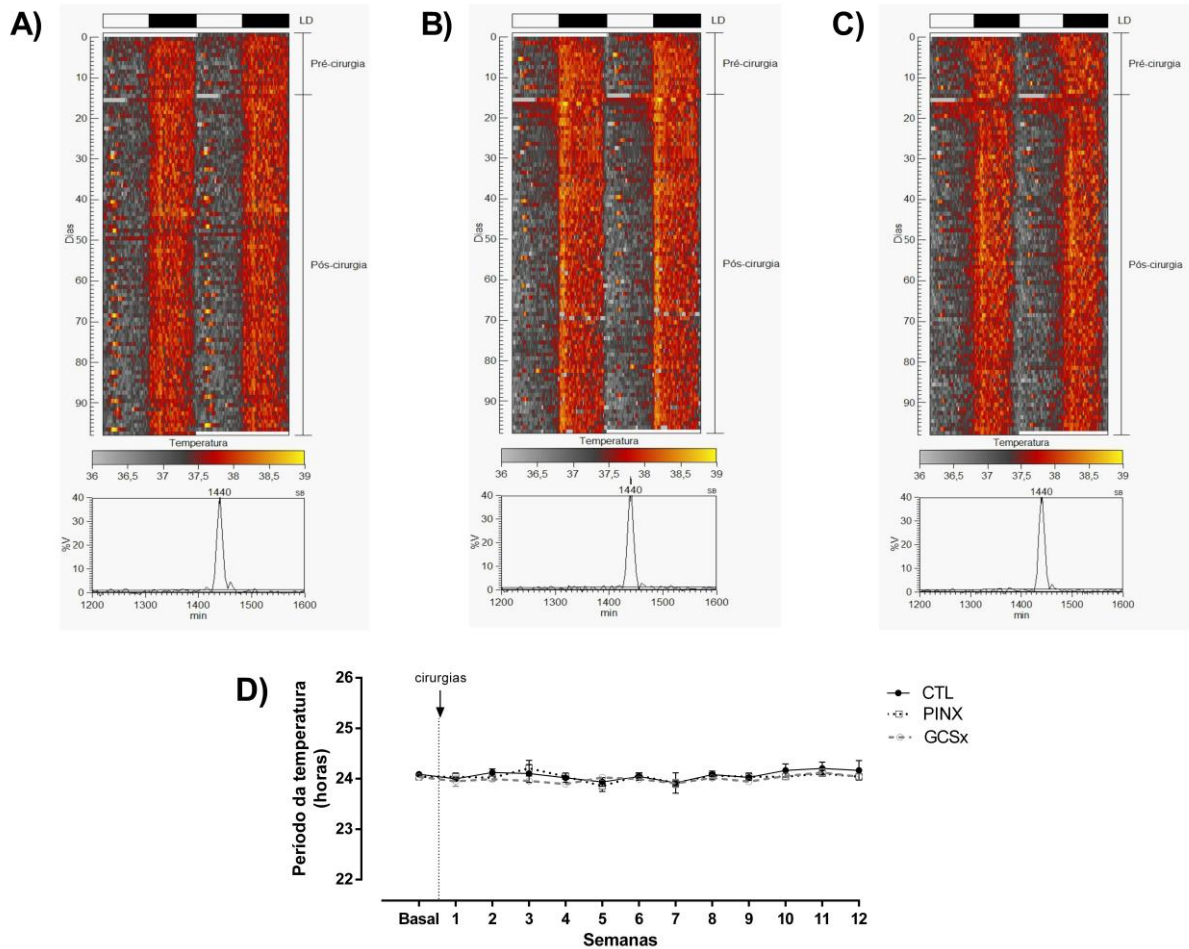
5.15 Avaliação rítmica da temperatura

Além de acompanhar o peso e o consumo alimentar, o ritmo circadiano da temperatura também foi avaliado após a coleta de dados por telemetria.

Para a elaboração dos termogramas e actogramas, cada animal foi analisado individualmente, a fim de se observar o padrão de temperatura e atividade desses animais nas diferentes situações.

A realização da ganglionectomia ou pinealectomia não promoveu alterações no ritmo circadiano de temperatura. Durante todo o período experimental pode-se observar a presença de temperaturas mais altas durante as 12 h da fase de escuro, e de temperaturas mais baixas durante o período de repouso do animal (fase de claro) (Figura 78). Além disso, após a análise utilizando a metodologia do periodograma, realizada no conjunto da série temporal de 98 dias, viu-se que o período desses animais não foi diferente do período circadiano, que é de aproximadamente 24 h (Figuras 78 A, B e C). Portanto nem a ganglionectomia, e nem a pinealectomia acarretaram mudanças no período do ritmo de temperatura desses animais (Figura 78D).

Figura 78 – Termograma e periodograma dos animais ao longo do protocolo



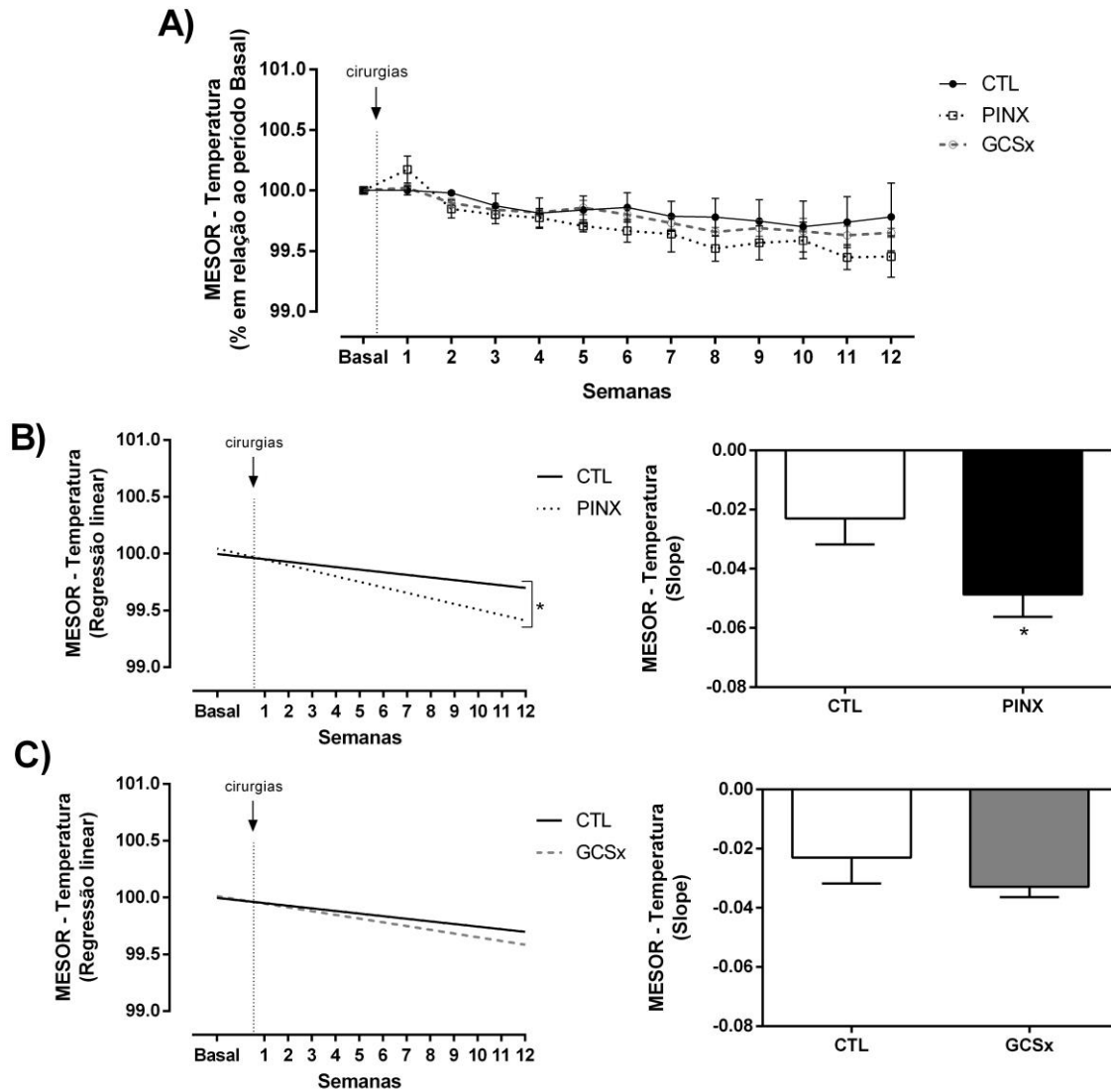
Análise do ritmo circadiano da temperatura durante 14 semanas: 2 semanas chamadas de pré-cirurgia, representando o período basal do próprio animal e 12 semanas do protocolo experimental. (A) Termograma e periodograma total de um animal controle representativo. (B) Termograma e periodograma total de um animal pinealectomizado representativo. (C) Termograma e periodograma total de um animal ganglionectomizado representativo. (D) Média do período do ritmo de temperatura encontrado semanalmente em cada um dos grupos estudados. ANOVA bifatorial, múltiplas comparações com pós teste Bonferroni. $p > 0,05$ para os fatores cirurgia, tempo e interação. $n = 4$ para os grupos CTL e PINX e $n = 10$ para o grupo GCSx. Basal = média dos valores obtidos nas semanas controle do próprio animal.

Sabendo-se que o período de 24 h foi mantido, as curvas diárias semanais foram submetidas ao método Cosinor para avaliação dos parâmetros rítmicos mesor, amplitude e acrofase de temperatura ao longo do protocolo experimental. Para a análise de mesor e amplitude, considerou-se a variação desses parâmetros com relação à média do período controle do próprio animal, sendo mostrado como porcentagem.

De acordo com a análise do parâmetro mesor, viu-se que a cirurgia e a duração do protocolo foram fatores que contribuíram para o resultado visto. Ao serem analisados individualmente, o mesor dos animais ganglionectomizados e pinealectomizados apresentaram variação ao longo do tempo (Figura 79 A), exibindo, portanto, um comportamento diferente

dos animais controles. De acordo com a análise de regressão linear, viu-se que o grupo pinealectomizado foi diferente do grupo controle (Figura 78 B), indicando que nesse grupo houve maior redução da temperatura ao longo do tempo. Diferentemente do visto para os animais controles e ganglionectomizados, cujos *slopes* foram semelhantes (Figura 78 C).

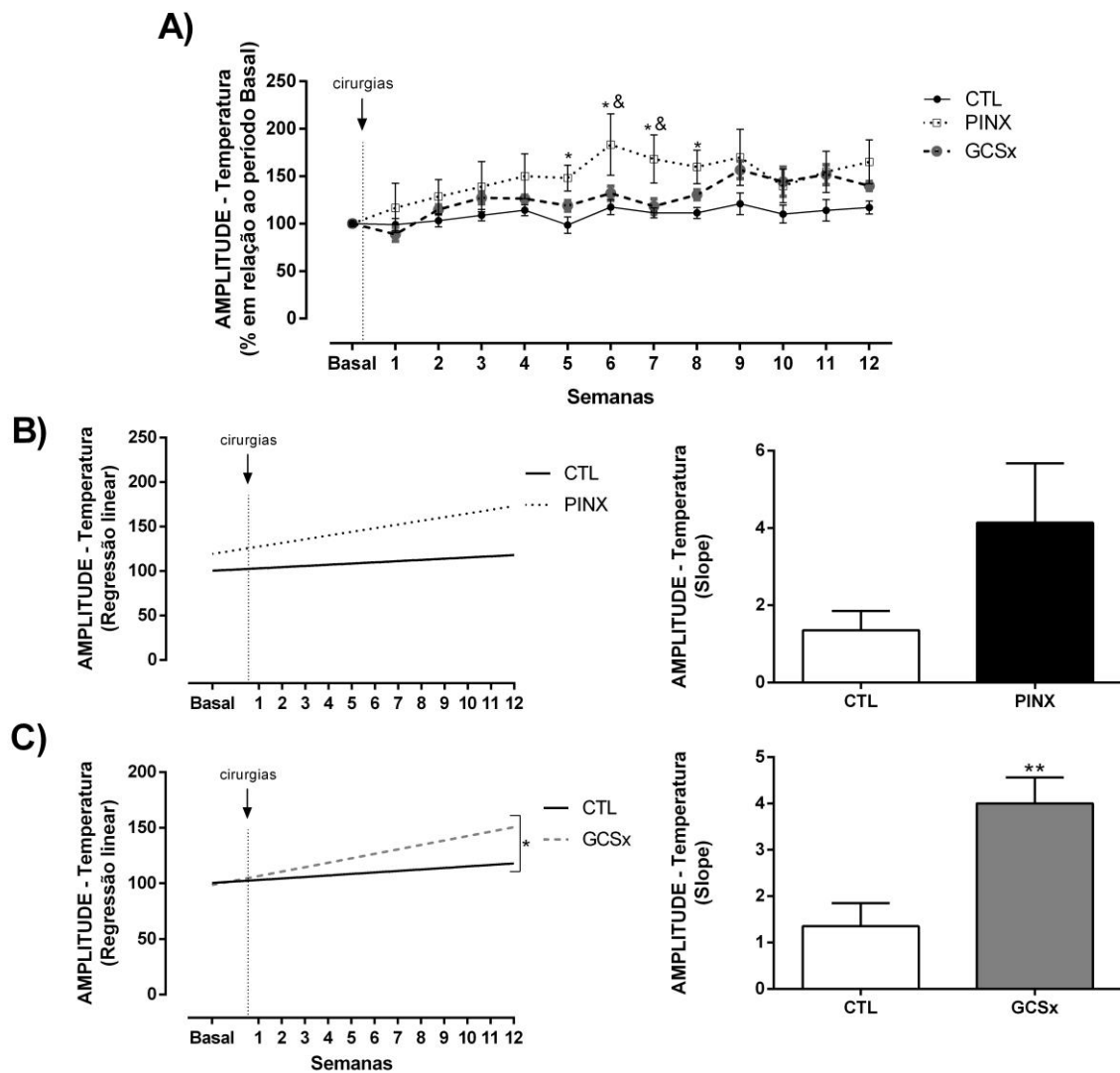
Figura 79 – Mesor do ritmo de temperatura



Mesor das curvas diárias feitas semanalmente ao longo do experimento. O mesor foi plotado como variação em porcentagem com relação à média do mesor das semanas do período controle do animal. (A) Variação do mesor ao longo das 12 semanas de protocolo. ANOVA bifatorial, múltiplas comparações, com pós teste Bonferroni, onde $p > 0,05$ para o fator interação; $p < 0,0001$ para o fator tempo e $p = 0,0018$ para o fator cirurgia. ANOVA de uma via, múltiplas comparações, com pós teste Bonferroni, onde $p > 0,05$ para o CTL, $p = 0,0008$ para PINX e $p < 0,0001$ para GCSx. $n = 4$ para CTL e PINX; $n = 10$ para GCSx. (B) Regressão linear do mesor de animais controles e pinealectomizados, no qual os *slopes* foram considerados diferentes. Teste T de Student, não pareado bi-caudal, com $*p = 0,0271$. (C) Regressão linear do mesor de animais controles e ganglionectomizados, no qual os *slopes* não foram considerados diferentes. Teste T de Student, não pareado, bi-caudal com $p > 0,05$. Basal = média dos valores obtidos nas semanas controle do próprio animal.

Após a análise da amplitude, viu-se que, assim como no mesor, a cirurgia e a duração do protocolo foram importantes na determinação deste parâmetro. Individualmente, apenas nos animais ganglionectomizados, a amplitude aumentou ao longo do tempo, já que de acordo com a análise de regressão linear, viu-se que o grupo ganglionectomizado foi diferente do grupo controle (Figura 80 C), levando ao aumento da amplitude ao longo do tempo, demonstrado pelo *slope* positivo. Esse aumento progressivo da amplitude também foi visto nos animais pinealectomizados, que apesar de haver apenas uma tendência no aumento do *slope*, apresentou uma maior amplitude média durante o período experimental (Figura 81). Portanto, alterar a sinalização de melatonina levou ao aumento da amplitude ao longo do tempo.

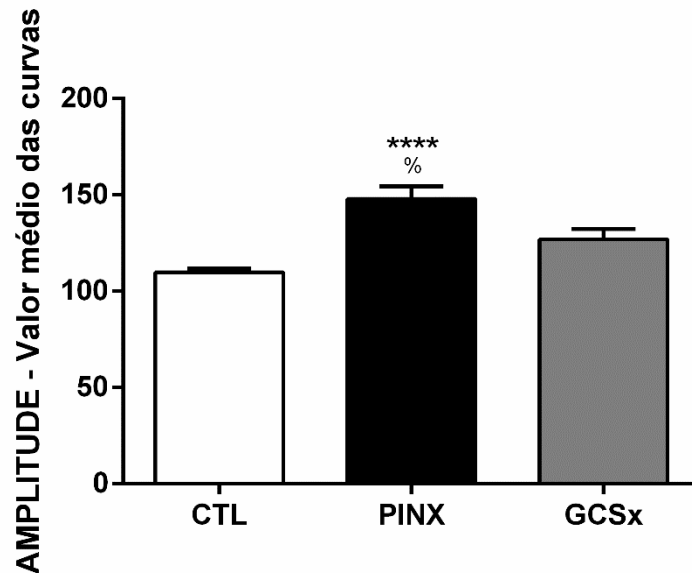
Figura 80 – Amplitude do ritmo de temperatura



Amplitude das curvas diárias feitas semanalmente ao longo do experimento. A amplitude foi plotada como variação em porcentagem com relação à média da amplitude das semanas do período controle do animal. (A) Variação da amplitude ao longo das 12 semanas de protocolo. ANOVA bifatorial, múltiplas comparações, com pós teste Bonferroni, onde $p > 0,05$ para o fator interação; $p < 0,0001$ para o fator tempo e cirurgia, * $p < 0,05$ PINX vs CTL; & $p < 0,05$ PINX vs GCSx. ANOVA de uma via, múltiplas comparações, com pós teste Bonferroni,

onde $p > 0,05$ para o CTL e PINX e $p < 0,0001$ para p GCSx. $n = 4$ para CTL e PINX; $n = 10$ para GCSx. (B) Regressão linear da amplitude de animais controles e pinealectomizados, no qual os slopes não foram considerados diferentes. Teste T de Student, não pareado bi-caudal, com $p > 0,05$. (C) Regressão linear da amplitude de animais controles e ganglionectomizados, no qual os slopes foram considerados diferentes. Teste T de Student, não pareado, bi-caudal com $**p = 0,0039$. Basal = média dos valores obtidos nas semanas controle do próprio animal.

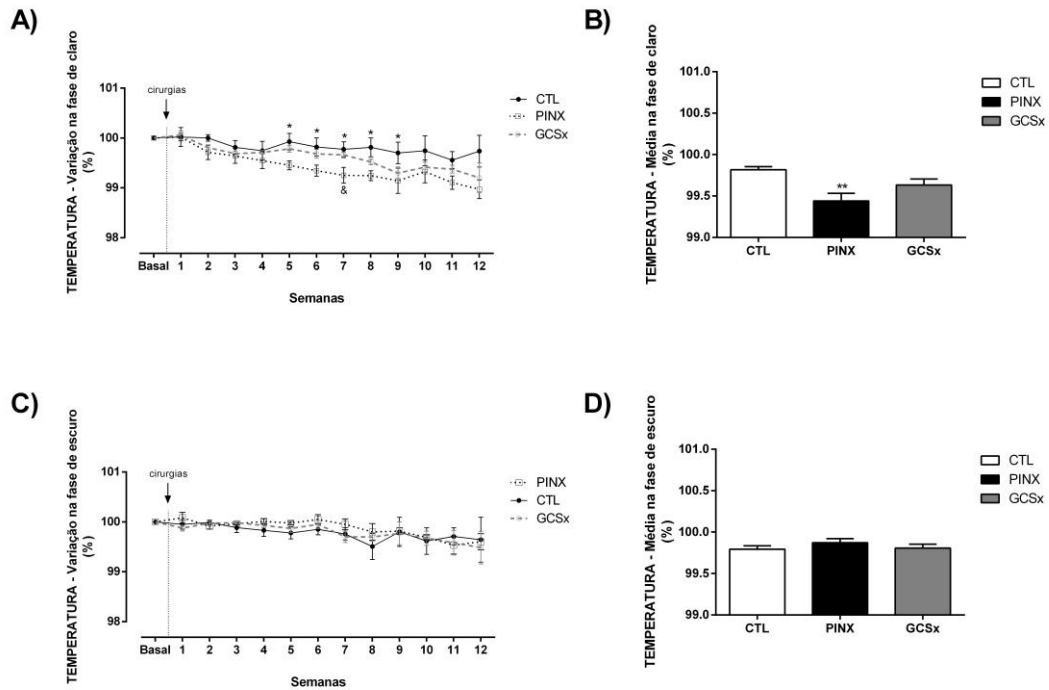
Figura 81 – Valor médio da amplitude do ritmo de temperatura



Valor médio da amplitude da temperatura nos animais controles, pinealectomizados e ganglionectomizados. ANOVA de uma via, pós teste Bonferroni, com $**** p < 0,001$ vs CTL e $\% p < 0,05$ vs GCSx.

O aumento da amplitude e a queda do mesor observados nos animais pinealectomizados, se deveu à diminuição da temperatura durante a fase de claro, principalmente nos animais cuja pineal foi removida, já que exibiram uma maior redução ao longo do protocolo (Figura 82).

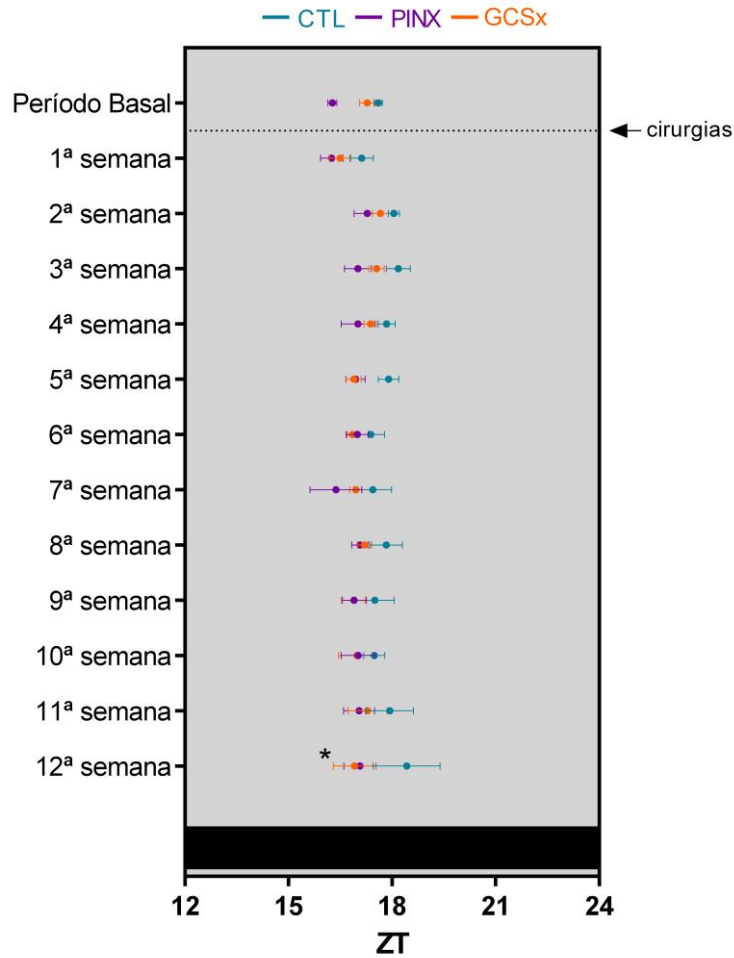
Figura 82 – Variação semanal de temperatura durante a fase de claro e a fase de escuro



Comparação entre a variação de temperatura durante a fase de claro e a fase de escuro. (A) Temperatura apenas durante a fase de CLARO (dia). ANOVA bifatorial, múltiplas comparações, com pós teste Bonferroni, onde $p > 0,05$ para o fator interação e $p < 0,0001$ para o fator tempo e cirurgia, * $p < 0,05$ PINX vs CTL; & $p < 0,05$ PINX vs GCSx. ANOVA de uma via, múltiplas comparações, com pós teste Bonferroni, onde $p > 0,05$ para o CTL; $p = 0,0002$ PINX, e $p < 0,0001$ para p GCSx. $n = 4$ para CTL e PINX; $n = 10$ para GCSx. (B) Temperatura apenas durante a fase de ESCURO (noite). ANOVA bifatorial, múltiplas comparações, com pós teste Bonferroni, onde $p > 0,05$ para o fator interação e cirurgia, $p < 0,0001$ para o fator cirurgia, ANOVA de uma via, múltiplas comparações, com pós teste Bonferroni, onde $p > 0,05$ para o CTL; $p = 0,0062$ PINX e $p < 0,0041$ para p GCSx. $n = 4$ para CTL e PINX; $n = 10$ para GCSx. Basal = média dos valores obtidos nas semanas controle do próprio animal.

A análise das acrofases semanais mostrou que o tempo não afetou o resultado, diferentemente da cirurgia. Após a análise individual das curvas, viu-se que houve variação da acrofase durante o protocolo experimental em todos os grupos. De maneira geral foi possível notar uma tendência ao adiantamento da fase do ritmo de temperatura nos animais operados, porém nas múltiplas comparações apenas os animais ganglionectomizados foram diferentes dos controles na 12^a semana (Figura 82).

Figura 83 – Acrofase do ritmo de temperatura



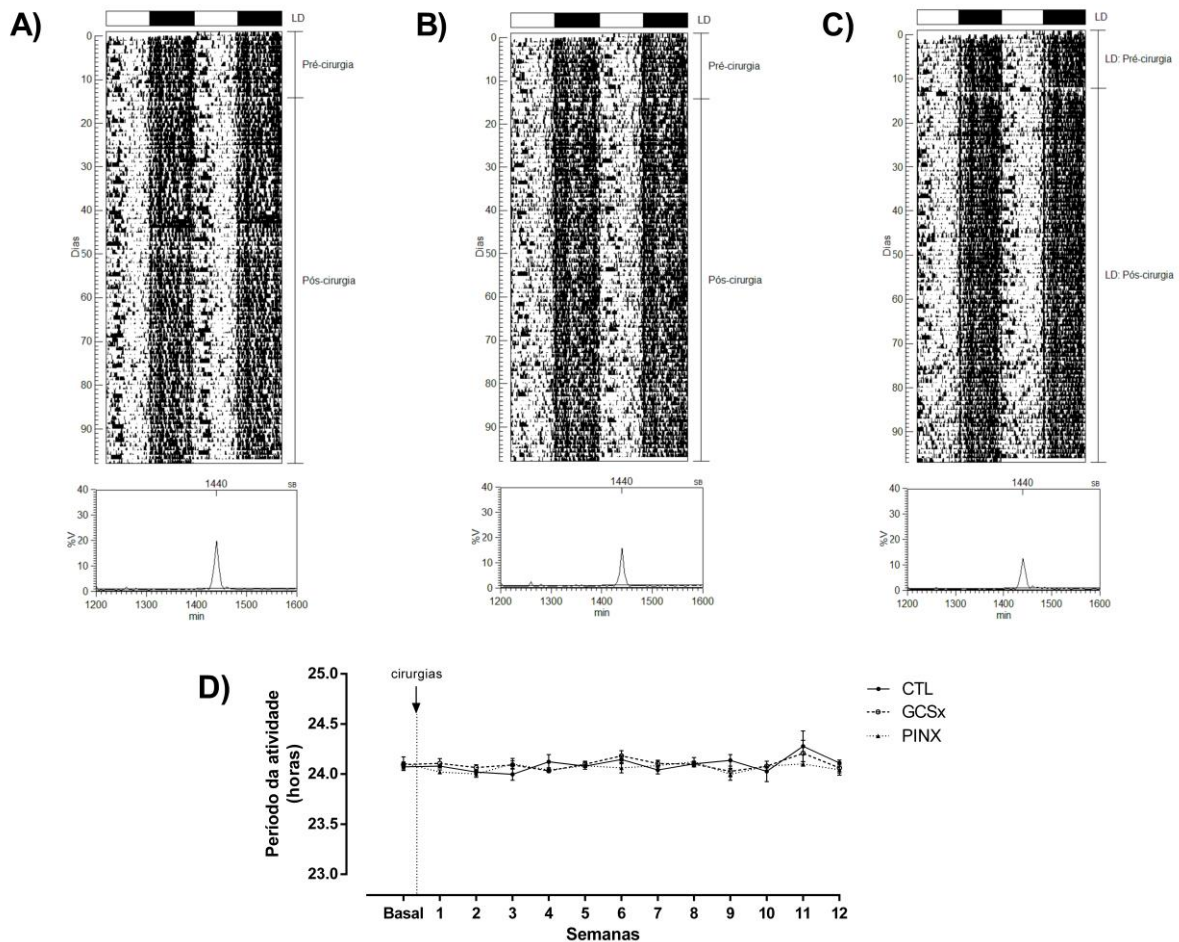
Mapa de acrofases do ritmo de temperatura dos animais controles, pinealectomizados e ganglionectomizados após 12 semanas de protocolo. Análise individual das curvas por ANOVA de uma via, pós teste Bonferroni com múltiplas comparações, onde $p < 0,05$ para todos os grupos. ANOVA bifatorial, pós teste Bonferroni com múltiplas comparações com $p > 0,05$ para os fatores interação e tempo, e $p < 0,0001$ para o fator cirurgia. * $p < 0,05$ GCSx vs CTL na 12ª semana. Período basal = média dos valores obtidos nas semanas controle do próprio animal.

5.16 Avaliação rítmica da atividade motora

Assim como o visto para o ritmo de temperatura, a remoção dos glânglios cervicais superiores ou da glândula pineal não alterou a ritmicidade circadiana do ciclo de atividade dos animais (Figura 84). Durante todo o período experimental pode-se observar a concentração da atividade durante as 12 h da fase de escuro, com a presença de um surto de atividade durante o início da fase de claro em todos os grupos (Figuras 84 A, B e C).

E mais uma vez, após a análise utilizando a metodologia do periodograma, viu-se que o período de atividade desses animais também foi circadiano, já que apresentou período aproximado a 24 h em todos os grupos (Figuras 85), portanto nem a ganglionectomia, e nem a pinealectomia geraram mudanças do período circadiano da atividade desses animais (Figura 85 D).

Figura 84 – Actograma e periodograma dos animais ao longo do protocolo



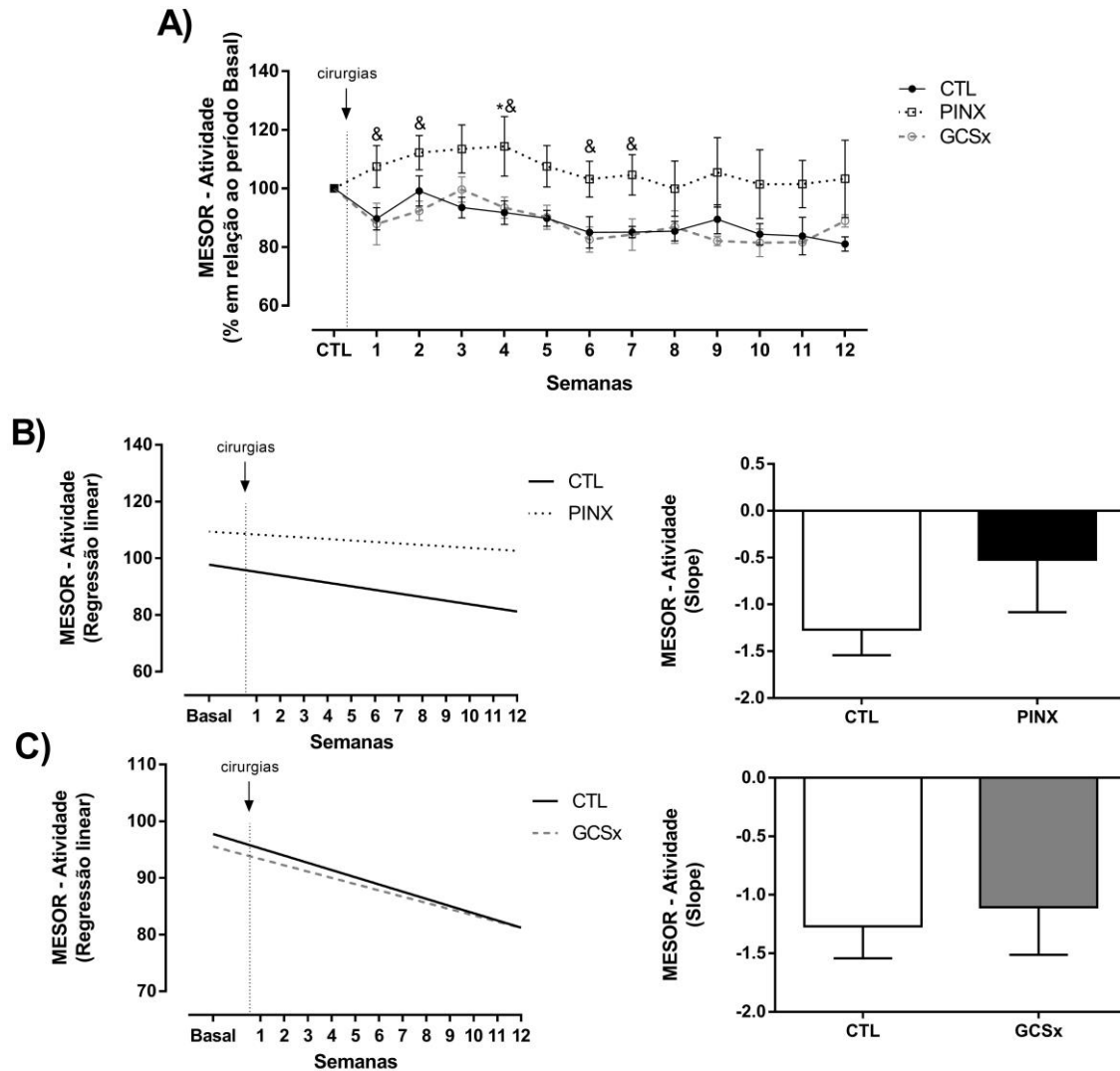
Análise do ritmo circadiano da atividade motora durante 14 semanas: 2 semanas chamadas de pré-cirurgia, representando o período controle do próprio animal e 12 semanas do protocolo experimental. (A) Actograma e periodograma total de um animal controle representativo. (B) Actograma e periodograma total de um animal pinealectomizado representativo. (C) Actograma e periodograma total de um animal ganglionectomizado representativo. (D) Média do período do ritmo de atividade motora encontrado semanalmente em cada um dos grupos estudados. ANOVA bifatorial, múltiplas comparações com pós teste Bonferroni. $p > 0,05$ para os fatores cirurgia, tempo e interação. $n = 4$ para os grupos CTL e PINX e $n = 10$ para o grupo GCSx. Basal = média dos valores obtidos nas semanas controle do próprio animal.

Após serem submetidas ao método Cosinor as curvas diárias semanais de todos os grupos apresentaram ritmicidade, sendo possível a determinação do mesor, amplitude e acrofase. Semelhantemente à análise feita para a temperatura, a análise de mesor e amplitude da atividade se deu a partir da variação desses parâmetros com relação à média do período basal do animal, sendo mostrados como porcentagem.

Assim como para a temperatura, a cirurgia e a duração do protocolo foram fatores que contribuíram para o resultado visto na determinação do valor médio da atividade. Após análise individual, viu-se que os animais controles e ganglionectomizados apresentaram variação do

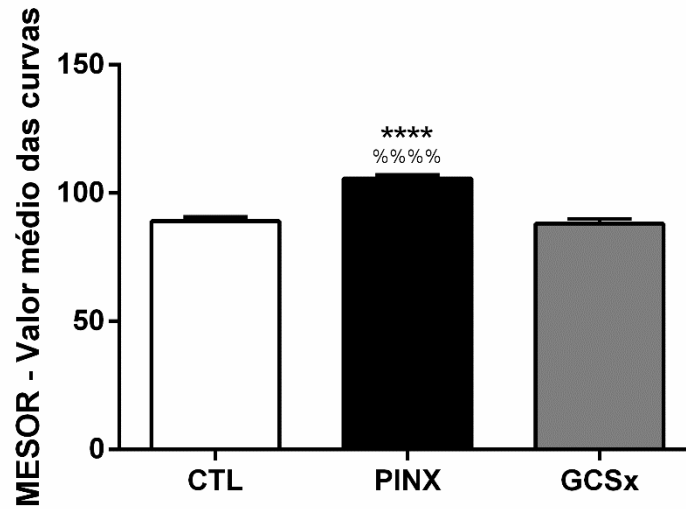
mesor ao longo do tempo, com a queda da atividade ao longo do período experimental (Figuras 86A e C). Nos animais pinealectomizados a redução da atividade foi atenuada, como demonstrado pelo aumento do valor de *slope* e pelo aumento do valor médio do mesor ao longo do tempo (Figuras 85 B e 86).

Figura 85 – Mesor do ritmo de atividade motora



Mesor das curvas diárias feitas semanalmente ao longo do experimento. O mesor foi plotado como variação em porcentagem com relação à média do mesor das semanas do período controle do animal. (A) Variação do mesor da atividade ao longo das 12 semanas de protocolo. ANOVA bifatorial, com pós teste Bonferroni, onde $p > 0,05$ para o fator interação; $p < 0,0001$ para o fator cirurgia e $p = 0,0367$ para o fator cirurgia. Para análise individual das curvas, ANOVA de uma via, múltiplas comparações, com pós teste Bonferroni, onde $p = 0,0295$ para o CTL, $p = 0,9763$ para PINX e $p = 0,0208$ para GCSx. $n = 4$ para CTL e PINX; $n = 10$ para GCSx. (B) Regressão linear do mesor de animais controles e pinealectomizados, no qual os slopes não foram considerados diferentes. Teste T de Student, não pareado bi-caudal, com $p > 0,05$. (C) Regressão linear do mesor de animais controles e ganglionectomizados, no qual os slopes não foram considerados diferentes. Teste T de Student, não pareado, bi-caudal com $p > 0,05$. Basal = média dos valores obtidos nas semanas controle do próprio animal.

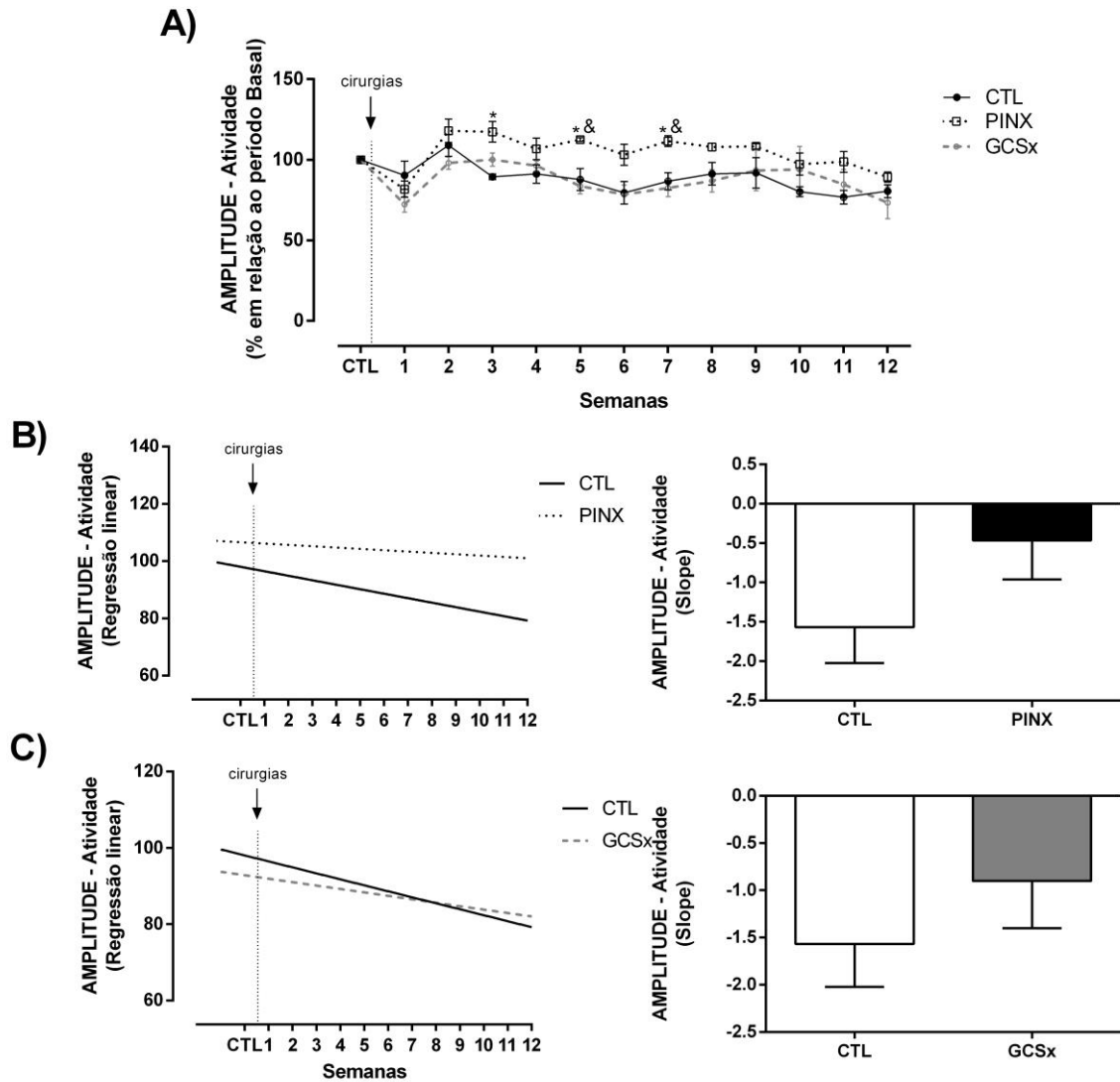
Figura 86 – Valor médio do mesor do ritmo de atividade motora



Valor médio do mesor nos animais controles, pinealectomizados e ganglionectomizados. ANOVA de uma via, pós teste Bonferroni, $p < 0,0001$. **** $p < 0,001$ vs CTL e %%% $p < 0,0001$ vs GCSx.

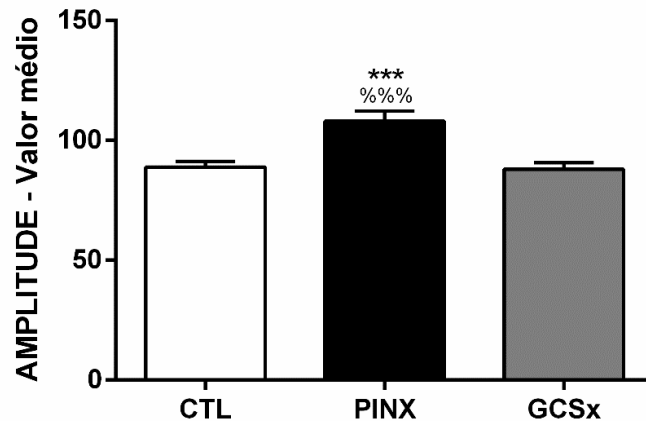
A amplitude do ritmo de atividade motora foi influenciada pelo tempo de protocolo e pelo fator cirurgia. Quando analisados individualmente, a variação vista nos animais controles foi perdida após a pinealectomia e mantida na ganglionectomia (Figura 87 A). Após a análise de regressão linear, não houve diferença entre os *slopes* dos animais operados e controles, apesar de se observar uma tendência ao aumento nos animais pinealectomizados (Figuras 88 B e C). O aumento da amplitude foi visto nos animais pinealectomizados através da análise da média da amplitude, que foi maior do que nos animais controles e ganglionectomizados (Figura 89). Sendo assim, a remoção da glândula pineal levou a redução da queda da amplitude que havia sido vista nos animais controles e ganglionectomizados ao longo das 12 semanas.

Figura 87 – Amplitude do ritmo de atividade motora



Amplitude das curvas diárias feitas semanalmente ao longo do experimento. A amplitude foi plotada como variação em porcentagem com relação à média da amplitude das semanas do período controle do animal. (A) Variação da amplitude do ritmo de atividade ao longo das 12 semanas de protocolo. ANOVA bifatorial, com pós teste Bonferroni, onde $p > 0,05$ para o fator interação; $p < 0,0001$ para o fator tempo e cirurgia, * $p < 0,05$ PINX vs CTL; & $p < 0,05$ PINX vs GCSx. ANOVA de uma via, com pós teste Bonferroni, onde $p = 0,0430$ para o CTL, $p = 0,0622$ para o grupo PINX e $p = 0,0014$ para o GCSx. $n = 4$ para CTL e PINX; $n = 10$ para GCSx. (B) Regressão linear da amplitude de animais controles e pinealectomizados, no qual os slopes não foram considerados diferentes. Teste T de Student, não pareado bi-caudal, com $p > 0,05$. (C) Regressão linear da amplitude de animais controles e ganglionectomizados, no qual os slopes foram considerados diferentes. Teste T de Student, não pareado, bi-caudal com $p > 0,05$. Basal = média dos valores obtidos nas semanas controle do próprio animal.

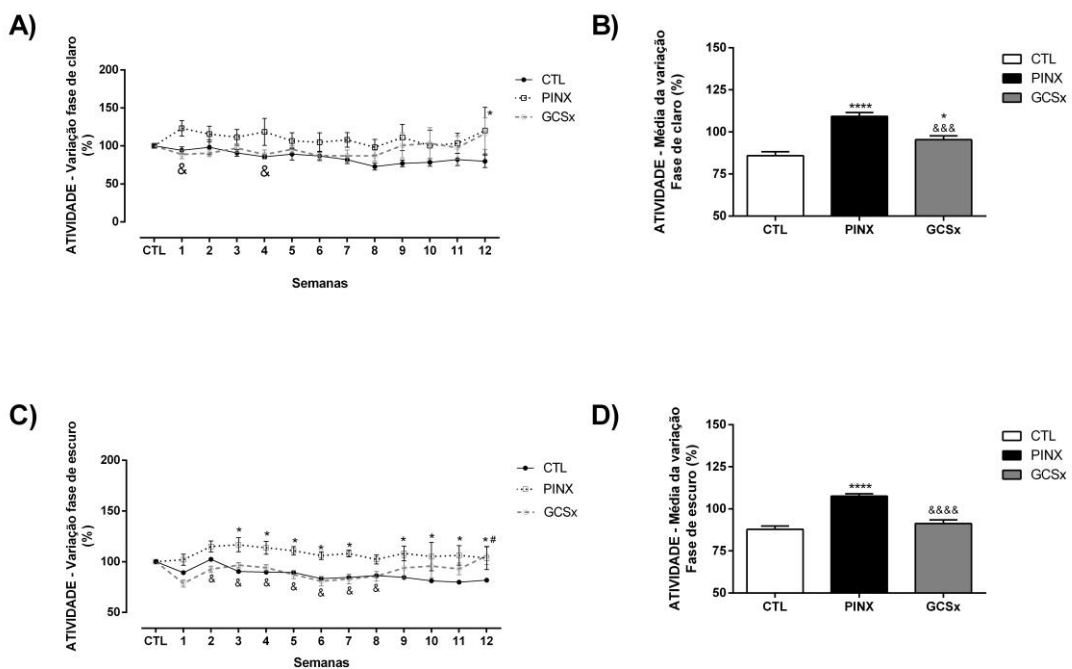
Figura 88 – Valor médio da amplitude do ritmo de atividade motora



Valor médio da amplitude nos animais controles, pinealectomizados e ganglionectomizados. ANOVA de uma via, pós teste Bonferroni, $p < 0,0001$. *** $p < 0,001$ vs CTL e %%% $p < 0,001$ vs GCSx.

Além disso, a análise da atividade entre o dia e a noite dos animais revelou que os animais pinealectomizados apresentaram maior atividade motora do que os controles e ganglionectomizados, tanto de dia, quanto de noite (Figura 89). Durante a fase de claro, nenhum grupo variou ao longo das 12 semanas, enquanto que durante a noite apenas os animais pinealectomizados não mostraram variação ao longo do tempo. Nas últimas semanas do experimento, observou-se o aumento da atividade também nos animais ganglionectomizados.

Figura 89 – Variação semanal de atividade motora durante a fase de claro e a fase de escuro

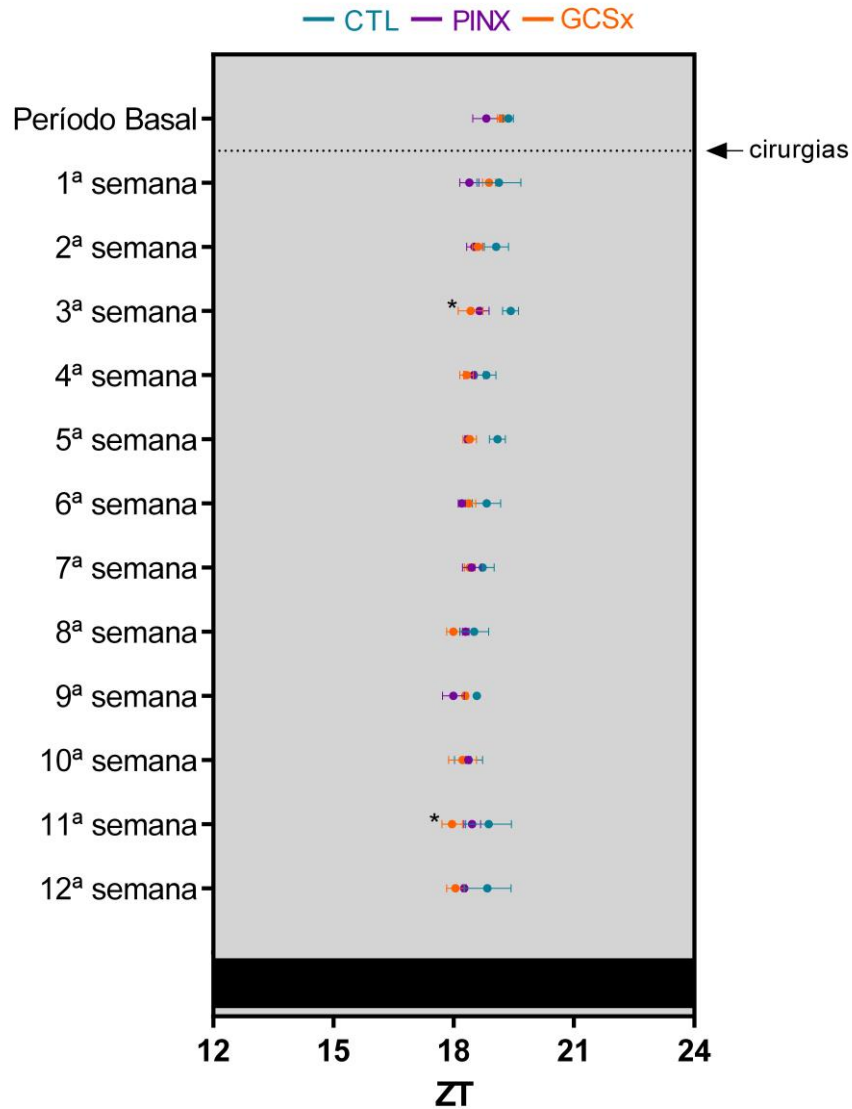


Comparação entre a variação de atividade durante a fase de claro e a fase de escuro. (A) Atividade apenas durante a fase de CLARO (dia). ANOVA bifatorial, múltiplas comparações, com pós teste Bonferroni, onde $p > 0,05$ para

o fator interação e tempo e $p < 0,0001$ para o fator cirurgia, * $p < 0,05$ PINX vs CTL; # $p < 0,05$ GCSx vs CTL. ANOVA de uma via, múltiplas comparações, com pós teste Bonferroni, onde $p > 0,05$ para o CTL, PINX e GCSx. $n = 4$ para CTL e PINX; $n = 10$ para GCSx. (B) Atividade apenas durante a fase de ESCURO (noite). ANOVA bifatorial, múltiplas comparações, com pós teste Bonferroni, onde $p > 0,05$ para o fator interação, $p = 0,0088$ para o fator tempo e $p < 0,0001$ para o fator cirurgia, ANOVA de uma via, múltiplas comparações, com pós teste Bonferroni, onde $p = 0,0009$ para o CTL; $p = 0,07324$ para o PINX, e $p < 0,0012$ para p GCSx. $n = 4$ para CTL e PINX; $n = 10$ para GCSx. Basal = média dos valores obtidos nas semanas controle do próprio animal.

Por fim, a análise das acrofases semanais do ritmo de atividade mostrou que o tempo e cirurgia foram capazes de afetar o resultado obtido. Após a análise individual das curvas, viu-se que houve variação da acrofase ao longo das 12 semanas. E assim como o visto para o ritmo de temperatura, foi possível notar uma tendência ao adiantamento da fase do ritmo de temperatura nos animais operados, porém nas múltiplas comparações apenas os animais ganglionectomizados foram diferentes do controle na 3^a e 12^a semana (Figura 88).

Figura 90 – Mapa de acrofase do ritmo de atividade



Mapa de acrofases do ritmo de atividade dos animais controles, pinealectomizados e ganglionectomizados após 12 semanas de protocolo. Análise individual das curvas por ANOVA de uma via, pós teste Bonferroni com múltiplas comparações, onde $p < 0,05$ para todos os grupos. ANOVA bifatorial, pós teste Bonferroni com múltiplas comparações com $p > 0,05$ para o fator interação, $p = 0,093$ para o fator tempo, e $p < 0,0001$ para o fator cirurgia. * $p < 0,05$ GCSx vs CTL. Período basal = média dos valores obtidos nas semanas controle do próprio animal.

6 DISCUSSÃO

Com o objetivo de se avaliar os efeitos da inervação simpática sobre os genes relógio da glândula pineal, usou-se a metodologia de ablação bilateral do gânglio cervical superior que, apesar de suas limitações, remove a liberação de noradrenalina na glândula pineal, prejudicando a produção de melatonina durante a noite, já que o principal estímulo para a sua produção é a presença desta catecolamina.

Primeiramente, para a validação do procedimento cirúrgico, poucos dias depois da realização da ganglionectomia, observou-se a uma redução da abertura entre as pálpebras, resultado da queda relativa da pálpebra superior, culminando no fenômeno conhecido como ptose palpebral. Esse resultado era esperado e foi um indício de que a ganglionectomia foi realizada com sucesso. Esse fenótipo é uma consequência da remoção dos gânglios, já que uma das regiões parcialmente inervadas pelas fibras ganglionares do gânglio cervical superior é o músculo de Müller. Esse músculo é o responsável por controlar a posição da pálpebra superior e controlar a abertura involuntária dessa estrutura, logo qualquer interrupção que ocorra nessa inervação faz com que o músculo não tenha tônus, gerando a ptose (76).

Os níveis de noradrenalina na glândula pineal reduz progressivamente após a ganglionectomia, chegando a níveis indetectáveis após 24 h da cirurgia (80), e provavelmente por esse motivo, a ablação do gânglio cervical superior bilateralmente promoveu importantes alterações na via de síntese de melatonina na glândula pineal.

O gene que codifica o receptor α_{1b} adrenérgico apresentou variação rítmica circadiana de sua expressão nos animais controles, como já descrito na literatura (81), com valores maiores durante a noite. No prazo de 10 dias, a ganglionectomia foi capaz de abolir o ritmo de expressão observado nos animais controles. Dados da literatura mostram que ratos expostos à luz durante a noite apresentaram abolição do ritmo de expressão desse gene na glândula pineal ao impedir o seu aumento noturno, ou seja, a informação luminosa captada pelas retinas durante a noite bloqueia a estimulação da glândula pineal feita pelo núcleo supraquiasmático em ratos, e esse bloqueio resultou na abolição de ritmo provocada pela luz (81). Nesse sentido, a ganglionectomia age como a luz no bloqueio do aumento noturno de *Adra1b*, impedindo a chegada da informação da via neural à glândula pineal e a liberação de noradrenalina em seu interstício. Como a transcrição de *Adra1b* é regulada ritmicamente pela liberação de noradrenalina e aumento de AMPc promovido pela ativação do receptor β adrenérgico, isso poderia explicar a ausência de ritmicidade observada (81).

Sabe-se que 3 semanas de ganglionectomia ou de exposição à luz leva ao aumento da densidade de receptores α_{1b} na glândula pineal (82), como uma tentativa de mecanismo compensatório à ausência de noradrenalina. Corroborando esse dado, no presente trabalho viu-se o aumento da expressão do gene *Adra1b* e a volta da ritmicidade desse gene, mesmo que com menor robustez, após a 12 semanas de remoção do gânglio cervical superior. Um possível mecanismo compensatório que explique o aumento e o reestabelecimento de ritmicidade poderia ser a ativação da expressão gênica mediada por AMPc induzido pelo polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), que também está presente na glândula pineal e exhibe variação rítmica (83).

Assim, o VIP, que também participa como coadjuvante da síntese de melatonina, se ligaria à receptores VIP1/PACAP, promovendo o aumento de AMPc, como mostrado através do tratamento de pinealócitos de ratos com essa substância. Essa estimulação é menos robusta que o estímulo por noradrenalina, pois apenas 30-60% dos pinealócitos respondem ao VIP, enquanto que 95% dessas células respondem à noradrenalina (84). A demora vista na recuperação da ritmicidade de *Adra1b* pode ser explicada por essa baixa responsividade, não sendo visto nos primeiros 10 dias. A secção do nervo carotídeo interno, próximo ao gânglio cervical superior, não promove alterações no conteúdo de VIP na glândula pineal (85), nos levando a crer que a ganglionectomia também não geraria esse efeito, garantindo a presença de VIP na glândula. Além disso, seu conteúdo varia circadianamente, assim como a sensibilidade ao acúmulo de AMPc (86), exibindo maiores valores no início da noite. Considerando o tempo gasto pela transcrição e acúmulo do RNAm de *Adra1b*.após estímulo para a transcrição, faria sentido o seu pico estar avançado, quando comparado ao início da noite.

A principal via de ativação da síntese de melatonina por noradrenalina se dá através do receptor β_1 adrenérgico. A expressão do gene *Adr β_1* é circadianamente rítmica, com maiores valores durante a noite, sendo que trabalhos mostram que a ganglionectomia é capaz de abolir essa ritmicidade, levando à valores diurnos e noturnos semelhantes (87,88), além de promover a redução da expressão desse gene em até 25% (87) como visto no presente trabalho após 12 semanas de ganglionectomia. A sua ativação pela noradrenalina desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, que culmina no aumento do AMPc que fosforila CREB, o qual se liga ao sítio CRE ativando a transcrição de genes. A clonagem da região promotora de transcrição do gene *Adr β_1* revelou a presença de um sítio CRE, validando o mecanismo de retroalimentação positiva da expressão desse gene (89). Como a noradrenalina é o principal sinalizador na glândula pineal, levando ao aumento de AMPc, a sua ausência levaria à redução da expressão de genes induzíveis pelo elemento responsivo ao AMPc, como o *Adr β_1* . A redução da densidade

de receptores β está associada com a redução da síntese de melatonina, como o visto em animais idosos (90).

Semelhantemente, as expressões gênicas das enzimas da via de síntese de melatonina também foram modificadas devido à ausência da sinalização noradrenérgica.

A primeira enzima da via, a triptofano hidroxilase (*Tph*), exibiu redução da expressão no grupo ganglionectomizado a curto prazo, e, depois de 12 semanas, teve sua variação rítmica abolida. A ritmicidade da expressão gênica de *Tph*, assim como de sua enzima, são induzidos pela estimulação noradrenérgica, via AMPc e PKA, por mecanismo independente de CREB, já que a região promotora de *Tph* não apresenta um sítio CRE (91–95). A ativação transcricional mediada em resposta ao AMPc se dá através de uma região invertida CCAAT box (96) com uma região rica em GC próxima à ela que são reconhecidas pelos fatores transcritivos NF-Y e Sp1 ativados pela PKA (97,98), sendo essa uma possível explicação para a redução e abolição vistas na expressão de *Tph* após a remoção da inervação simpática na glândula pineal. Apesar de alguns trabalhos afirmarem a presença de ritmo na expressão desse gene, Huang e colaboradores (2008) discordam (99). No presente trabalho, viu-se tanto a presença, quanto a ausência em animais controles, aparentemente dependendo da idade dos animais.

A expressão gênica da enzima passo limitante da síntese de melatonina (a *Aanat*) foi a que mais sofreu alterações dentre as enzimas da via. Dez dias após a ganglionectomia, viu-se a alteração de todos os parâmetros rítmicos avaliados, com redução de mesor, amplitude e adiantamento da acrofase, enquanto que mais a longo prazo houve a abolição do ritmo de expressão. Em ambos os protocolos, viu-se a redução da expressão, a eliminação da variação entre valores noturnos e diurnos, além de um pequeno aumento dos valores diurnos de expressão. Esses resultados eram esperados, uma vez que já foram reportados em outros trabalhos que utilizaram a ganglionectomia como método (49–52). Em ratos, o gene *Aanat* tem, em sua região promotora, uma sequência CRE-like, um CCAAT Box invertido (ligação de C/EBP), um sítio de ligação para proteína ativadora 1 (AP-1) e uma região PIRE que se liga ao CRX (*Cone-rod homeobox protein*). Como o esperado notou-se nos animais controles o aumento da expressão gênica da *Aanat* durante a escotofase, momento do dia no qual a liberação de noradrenalina no interstício glandular acontece. A existência do sítio CRE demonstra a responsividade da transcrição desse gene à presença de noradrenalina. Nos ganglionectomizados a sinalização noradrenérgica está abolida, e em resposta à ausência da noradrenalina viu-se considerável redução da transcrição desse gene (33,40–42). Apesar de ser a principal via de estimulação da síntese de melatonina, a noradrenalina não é a única responsável. Outros fatores de transcrição como AP-1, Fra2 e CRX complementam a ação do

pCREB (43), o que também ajudaria a explicar a persistência de expressão vista nos animais ganglionectomizados, mesmo na ausência de noradrenalina.

No núcleo celular de pinealócitos, existem, além de estimuladores da transcrição, os inibidores, como a proteína ICER (*inducible cAMP early repressor*) que compete com o pCREB pela ligação ao sítio CRE. Uma vez que ICER se liga ao sítio CRE, há inibição da transcrição da *Aanat*. O ICER é estimulado noradrenergicamente, e, portanto, também participa da regulação fina da enzima passo limitante da via de síntese da melatonina. Como nos animais ganglionectomizados temos uma deficiência da estimulação noradrenérgica, os níveis de ICER devem estar baixos, sendo a proteína, portanto, incapaz de realizar sua função (41,100), o que também poderia explicar a pequena expressão da *Aanat* vista mesmo na ausência de noradrenalina durante a noite, fazendo com que a expressão gênica e proteica de ICER seja um interessante alvo de estudos nos animais ganglionectomizados. Outro candidato não adrenérgico que promoveria a síntese de melatonina na ausência de sinalização adrenérgica, através da estímulo de AC, seria o VIP, como já mencionado (101). Além disso, adrenalina e noradrenalina circulantes podem contribuir na determinação do nível basal da expressão da *Aanat* medido.

A última enzima da via de síntese, a *Asmt/Hiomt* também teve sua expressão gênica reduzida após a ganglionectomia, seja a curto ou longo prazo. Além disso, a variação rítmica, com valores maiores durante a noite, foi abolida. A transcrição desse gene também é dependente de estimulação adrenérgica, da ativação do receptor β adrenérgico e do aumento da concentração de AMPc. Além da ausência de noradrenalina devido à remoção do gânglio cervical superior, houve também redução da expressão de receptores β adrenérgicos, o que pode ter contribuído para a redução da expressão da *Hiomt/Asmt*(102), já que a inibição desse receptor também impede seu aumento noturno (102). A atividade da HIOMT também é reduzida e perde a variação dia e noite após a ganglionectomia (53,82).

Analisando esses dados em conjunto, vemos que a fisiologia da glândula pineal está comprometida após a ganglionectomia. A alteração do perfil de expressão gênica dos receptores α adrenérgicos, a redução da expressão gênica de *Adrb*, *Tph*, *Hiomt* e *Aanat* levam à síntese prejudicada de melatonina. A AANAT é a enzima passo limitante na síntese de melatonina (42,103). A abolição do ritmo de expressão gênica e atividade dessa enzima, leva a redução da síntese de melatonina e à ausência de sua ritmicidade, que passa a apresentar valores semelhantes de dia e de noite (49), afetando assim sua capacidade cronobiótica.

Independentemente do tempo experimental adotado, na glândula pineal dos animais controles, foi vista a expressão rítmica diária dos genes *Bmall*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1*, *Per2*, *Dbp* e

Rev-erba, de acordo com a literatura (59,64,67,68,104). A relação de fase entre os genes foi mantida, com acrofase de *Bmal1* no início da fase de claro, *Rev-erba* com fase oposta à *Bmal1* e os genes *Cry*s e *Pers* com acrofase durante a fase de escuro (105). Demonstrando que há uma maquinaria funcional do oscilador nessas glândulas com inervação periférica simpática mantida. O único gene cuja expressão não apresentou variação rítmica foi o *Clock* que se manteve constante ao longo do dia, o que também já foi observado em outros tecidos, como no NSQ (106).

A ganglionectomia levou à importantes alterações no oscilador molecular da pineal, abolindo o ritmo de *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erba* independentemente da duração de protocolo, e alterando os parâmetros rítmicos em todos os genes, com exceção de *Clock*. Essa perda de ritmicidade em alguns genes já era esperada, uma vez que a glândula pineal de mamíferos não é uma estrutura oscilatória autônoma e, portanto, depende de inervação simpática (107), além disso, em outro trabalho *in vitro*, foi demonstrado que a noradrenalina é um importante ativador da transcrição rítmica dos genes relógio na glândula pineal (71).

O *Bmal1*, que teve sua expressão reduzida e os parâmetros rítmicos alterados, é um componente importante do oscilador, participando tanto da alça primária quanto da secundária. Como já mencionado, após transcrito e traduzido, BMAL1 juntamente com CLOCK, formam o dímero CLOCK:BMAL1 responsável por, no núcleo, ativar a expressão de uma série de genes, como *Cry* (1,2), *Per* (1,2,3), *Rev-erba* e *Rora* (22,23,58). Coerentemente, as expressões de alguns desses genes se mostraram reduzidas após a remoção bilateral do gânglio cervical superior. A sequência à qual CLOCK:BMAL1 se liga ativando a transcrição desses genes também pode ser encontrada no primeiro íntron da *Aanat* em ratos (108), fazendo com que a síntese de melatonina também seja regulada por esse complexo. Sendo assim, a alteração vista na expressão rítmica diária do gene *Bmal1* pode, além de alterar o oscilador molecular, interferir na síntese de melatonina. Sendo esse mais um mecanismo por trás da redução da expressão gênica da *Aanat* e, conseqüentemente da síntese de melatonina, após a remoção da inervação simpática.

A ritmicidade diária da expressão gênica de *Per1* também foi consideravelmente alterada na glândula pineal de ratos após a ganglionectomia, com a redução de seu mesor e amplitude, e adiantamento de fase após 10 dias e 12 semanas de cirurgia, demonstrando assim que a estimulação noradrenérgica é fundamental para a sua ritmicidade. Segundo Sugimoto e colaboradores (2011), após a ativação do receptor α_1 adrenérgico, haveria o recrutamento das proteínas ERK e JNK. A JNK teria o efeito de fosforilar a c-Jun, que juntamente com a ERK promoveriam o aumento da expressão gênica de *Per1* (70). Como nos animais

ganglionectomizados não há estimulação noradrenérgica nas células da glândula pineal, essa sinalização deve estar deficitária, o que promoveu a alteração na expressão gênica de *Per1* nesses animais. Além do receptor α_1 adrenérgico, o receptor β também parece ter um papel, já que, em células de glioma, a sua ativação com noradrenalina inicia duas cascatas de sinalização (PKA/CREB e Src-GSK-3 β) que culminam na transcrição do gene *Per1* (109). Na ausência da sinalização noradrenérgica, se vê redução da via PKA/CREB já que a o receptor β não está sendo ativado, o que seria mais uma possível explicação pra redução da expressão de *Per1* na glândula pineal.

Somado a isso, a proteína DBP também pode agir como um ativador transcricional, se ligando diretamente na região promotora de *Per1* ativando a sua transcrição (110). Na glândula pineal, viu-se a abolição e redução de *Dbp* após 10 dias e a diminuição do mesor após 12 semanas de ganglionectomia. Essa redução poderia afetar a ativação transcricional promovida por esse gene sobre atividade transcricional de *Per1*, sendo mais uma possível explicação para a redução vista. Essa dependência entre *Per1* e *Dbp* também se manteve no núcleo supraquiasmático e no fígado, onde não houve redução da expressão de nenhum dos dois quando comparado ao grupo controle. Outro indicativo é a manutenção da relação de fase entre esses dois genes, no qual o pico de *Dbp* precede o de *Per1* em todos os tecidos estudados, ressaltando o seu papel como ativador transcricional de *Per1*.

Após o *Clock*, *Per2* foi o gene que sofreu as menores alterações pela ausência de noradrenalina, mantendo um perfil muito semelhante ao grupo controle. Apesar de alguns trabalhos estabelecerem a relação entre a expressão gênica de *Per2* e a presença de noradrenalina (111), uma possível explicação para o fato de a ganglionectomia não ter abolido a ritmicidade de *Per2* é que, como mostrado em trabalho anterior, a expressão do gene, pode ser sustentado pela temperatura e glicocorticoides, mesmo na ausência do complexo ativador CLOCK:BMAL1 (112) não dependendo da inervação simpática diretamente e não sendo afetado pelas alterações vistas em *Bmall*.

A ativação transcricional do gene *Dbp* é dependente da ligação, em sua região promotora do complexo CLOCK:BMAL1 (110). Na glândula pineal a expressão do gene *Bmall* foi afetada pela ganglionectomia, independentemente da duração dos protocolos. A redução vista nesse gene, pode ter levado às alterações vistas na expressão do gene controlado pelo relógio, *Dbp*.

A ganglionectomia e a pinealectomia resultam em diferentes alterações do padrão de melatonina circulante. A remoção bilateral dos gânglios cervicais superiores promove uma queda significativa da síntese de melatonina (o valor noturno sendo aproximadamente 15% do conteúdo de melatonina da noite de animais controles), além de abolir a ritmicidade de

produção ao abolir o pico noturno e aumentar discretamente o conteúdo diurno (51). A remoção da glândula pineal, por sua vez, promove a redução da melatonina plasmática a níveis indetectáveis (113).

O núcleo supraquiasmático coordena a variação rítmica de osciladores periféricos, direta e indiretamente, através de efetores neurais e humorais. A melatonina é um importante marcador circadiano interno, que pode ser considerada como um dos sinais humorais controlados pelo núcleo supraquiasmático para regular a oscilação de estruturas centrais e periféricas (114). Tendo em mente seu papel como mensageira circadiana, a sua ausência ou redução e arritmicidade, poderia levar ao comprometimento de osciladores periféricos, como já visto para o tecido adiposo branco (115).

O fígado é um oscilador periférico, cuja ritmicidade e sincronização é fundamental para que exerça a sua função. Portanto, para a sobrevivência do organismo, o fígado deve responder prontamente às alterações cíclicas do meio ambiente. A manutenção da expressão dos genes relógio e de suas fases promove a correta regulação das funções hepáticas e o seu ajuste perante alterações ambientais através da regulação de enzimas, garantindo, por exemplo, a homeostase do metabolismo de glicose, já que alguns genes envolvidos nas alças do oscilador molecular contribuem para tal (116,117). Sabendo das alterações promovidas pela pinealectomia e pela ganglionectomia com relação à presença de melatonina no plasma e o papel do fígado como oscilador na manutenção do metabolismo, fez-se interessante a análise de seu oscilador molecular sob as duas condições.

Porém, apesar da provável alteração plasmática de melatonina promovida pelos dois métodos cirúrgicos, a análise do oscilador molecular do fígado revelou sua robustez, não havendo diferenças significativas entre o visto nos animais operados e nos controles, com exceção do gene *Cry2* no fígado. A ausência de melatonina ou a sua redução e falta de ritmicidade não alterou a expressão da maioria dos genes relógio, e apesar de haver uma importante regulação do NSQ sobre a expressão circadiana de genes no fígado (118), as alterações vistas nos osciladores do NSQ mediante ganglionectomia e pinealectomia por 12 semanas, não geraram modificações neste oscilador periférico. Além de estar sob regulação direta do NSQ, o fígado também é coordenado por outras variáveis rítmicas que podem ditar sua oscilação, como é o caso do regime de consumo alimentar, ao qual o fígado responde rapidamente às alterações (119–121), fazendo o ajuste fino de seu papel no metabolismo energético e no processamento de alimentos de acordo com essas variações.

No fígado, um dos papéis da melatonina é o controle do metabolismo energético. Estudos mostram que o tratamento com melatonina promove o aumento da síntese de

glicogênio em hepatócitos, dentre outros motivos, pelo aumento da fosforilação da enzima GSK3 β (122), que pode seguir para a formação de glicogênio ou também fosforilar em Ser553 a proteína DYRX1A, que por sua vez fosforila ritmicamente em Ser557 a porção C-terminal de CRY2 culminando na degradação dessa proteína durante a noite, auxiliando na manutenção de sua ritmicidade (123). Na ausência da melatonina, a variação rítmica dessa cascata poderia estar afetada, promovendo o acúmulo de CRY2 no fígado e um desbalanço na sua capacidade de inibir ritmicamente a sua própria transcrição. Essas alterações poderiam justificar a ausência de ritmo do único gene afetado no oscilador do fígado, o *Cry2*.

Sabath e colaboradores (2014) (124) mostraram que o oscilador molecular do fígado é regulado principalmente pela alimentação do animal, já que diferentes regimes alimentares modularam a expressão dos genes relógio mesmo após lesão do núcleo supraquiasmático, e consequente ausência das pistas rítmicas provenientes dessa estrutura. Uma vez isolados do núcleo supraquiasmático, os hepatócitos conseguiram se ajustar mais rapidamente aos ciclos de alimentação (125). Por esse ajuste dos genes relógio promovido pelo ritmo de alimentação, independentemente da influência do NSQ, a ideia de hierarquia entre os osciladores tem sido discutida.

Apesar dessa prevalência de coordenação do ritmo do fígado pelos ciclos de alimentação e os dados vistos no atual trabalho, em uma pesquisa feita por Houdek e colaboradores (2016) (126) com ratas, viu-se que em animais pinealectomizados por 1 ano, a ausência da melatonina levou à alteração parcial do oscilador molecular do fígado, visto pela redução da expressão de *Per1*, *Per2* e *Bmal1*, e manutenção de *Dbp* e *Rev-erba*. Uma das diferenças entre os protocolos é a escolha do gênero do modelo animal. No presente trabalho optou-se pela utilização de animais machos enquanto que Houdek et al. (2016) utilizaram fêmeas. Sabe-se que a expressão de *Bmal1*, *Per1* e *Per2* no plexo coroide varia entre machos e fêmeas (127), provavelmente devido às diferenças entre os hormônios sexuais de ambos. A modulação dos genes relógio dependente do gênero poderia justificar a diferença observada entre os dois trabalhos. Por fim, outra diferença observada foi a duração do tempo de protocolo. As 12 semanas de ganglionectomia ou pinealectomia aos quais os animais foram aqui submetidos pode não ter sido o suficiente para gerar alguma alteração no oscilador hepático, reforçando o interesse em se investigar como funcionaria tal oscilador nesses animais por um período maior.

Em um trabalho de 2014, Bonaconsa et al. viram que a expressão circadiana de alguns genes relógio do fígado de animais jovens (3 meses) foi diferente do de animais envelhecidos (22 meses), havendo a redução de *Per1* e *Per2*, o aumento de *Rev-erba* e a tendência ao aumento de *Cry1*, *Cry2*, *Clock*, *Bmal1* e *Dbp* (62). No presente trabalho, foram avaliados animais com 2

e 5 meses de idade. Entre os animais controles, viu-se que a duração do protocolo promoveu a redução de *Per2* e o aumento de *Rev-erba*, e *Dbp*, coincidindo com o observado anteriormente. Os outros genes que apresentaram variação ao longo do tempo, não seguiram o padrão visto por eles. Uma possível explicação é a diferença de idade, já que ratos com 5 meses ainda são considerado jovens e não envelhecidos. Portanto, apesar de não demonstrar a mesma oscilação entre os genes, assim como Bonaconsa et al., no atual trabalho foi vista a alteração da expressão de genes relógio no fígado com o passar do tempo, mostrando a influência que o processo de envelhecimento tem sobre o oscilador molecular.

Na pinealectomia há a remoção apenas da pineal superficial, e por vezes do pedúnculo pineal, de forma que a pineal profunda permanece em sua posição. A pineal profunda está em contato com a parede do terceiro ventrículo, suscitando a hipótese de que haveria a secreção de melatonina no fluido cérebro espinhal (128), que proveria a sinalização melatoninérgica no sistema nervoso central em animais controles. Porém, a remoção da pineal superficial promove o rompimento das fibras simpáticas que chegam à pineal profunda pelo pedúnculo pineal e faz com que se degenerem, perdendo sua função, portanto, apesar de íntegra, essa pineal profunda permanece desnervada (47). Em outro trabalho, foi visto que a remoção da pineal superficial em ratos, não promoveria mudanças de posição na pineal profunda, porém causaria uma redução em seu volume citoplasmático e nuclear, indicando uma atrofia e prejuízo na síntese de melatonina (129), levando a crer que a remoção da pineal superficial levaria à não produção de melatonina pela pineal profunda, por desnervá-la e atrofiá-la. Diferentemente, os efeitos da ganglionectomia sobre a produção de melatonina da pineal profunda seriam os mesmos vistos na pineal superficial, com a inibição do pico noturno (mantendo a melatonina em níveis baixos) e consequente variação circadiana. De forma que provavelmente haja liberação de melatonina de forma arritmica no 3º ventrículo pela pineal profunda, diferente do visto na pinealectomia.

No trabalho atual, viu-se que em animais ganglionectomizados houve a abolição da ritmicidade de *Cry1* e *Cry2*, principalmente após 12 semanas. Nos animais pinealectomizados, esses dois genes também foram modificados, mas de maneiras diferentes, com adiantamento de fase de *Cry1* e aumento do mesor em *Cry2*. Dessa forma, entende-se que a variação rítmica da melatonina é fundamental para o ajuste e manutenção do ritmo do oscilador central. O núcleo supraquiasmático de ratos possui receptores de melatonina MT1 e MT2 (130,131), permitindo que a melatonina aja como um mecanismo de feedback para os osciladores dentro do núcleo supraquiasmático (132,133), realizando o ajuste de fase e mantendo a estabilidade do ritmo através do controle de proteínas proteassomais que regulam o ritmo de degradação das proteínas do oscilador, principalmente no que diz respeito à alça negativa (134), e de fato todos os

componentes da alça primária negativa foram modificados de alguma forma, a curto ou longo prazo. Somado a isso, a microinjeção de melatonina na *pars tuberalis* de rato, foi capaz de induzir a expressão gênica do gene *Cry1*, demonstrando que o sinal melatoninérgico pode ser um regulador da expressão desses genes (135).

Apesar de a regulação dos genes relógio variar entre os tecidos, a expressão do gene *Per2* após 12 semanas de pinealectomia não foi alterada, assim como o visto em outra região do encéfalo após 4 semanas por Amir e colegas em 2000 (136).

No trabalho de Houdek e colaboradores (2016), viu-se que a pinealectomia por 1 ano não foi capaz de alterar as expressões de *Per1*, *Per2*, *Bmal1* e *Rev-erba* no núcleo supraquiasmático de ratas, enquanto que no presente trabalho, a pinealectomia por 12 semanas apenas *Per2* e *Rev-erba* não tiveram suas expressões alteradas e *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2* e *Per1* tiveram a alteração de um parâmetro rítmico. Na ganglionectomia, *Per1* e *Rev-erba* não tiveram a sua expressão alterada, porém os ritmos de *Cry1* e *Cry2* foram abolidos. As diferenças observadas podem estar correlacionadas com o tempo de protocolo (e, portanto, com idade dos animais como já mencionado), e no caso da ganglionectomia a diferença de metodologia. De toda a maneira, ambos os trabalhos demonstram a relevância da sinalização melatoninérgica no núcleo supraquiasmático para o correto ajuste do oscilador molecular.

Além disso, há a presença de GSK3 β no núcleo supraquiasmático, e como mencionado acima, através de mecanismo proteossomal rítmico, ajuda na regulação rítmica de genes relógio, modulando o ritmo de degradação de proteínas como PER2, CRY2, CLOCK, BMAL1 e REV-ERB α (137). Isso poderia em parte explicar as alterações nos parâmetros rítmicos da expressão de vários genes relógio após as alterações provocadas pela alteração de melatonina, já que a fosforilação de GSK3 β é regulada por esse hormônio.

Assim como o visto no fígado, o aumento da idade dos animais controles, devido ao tempo de protocolo, levou à alterações na expressão dos genes relógio no núcleo supraquiasmático, e apesar de não seguir o mesmo padrão de resposta observado por Bonaconsa et al. (62), inclusive pela diferença de idade dos animais, esse dado demonstra a alteração da expressão gênica dos osciladores do núcleo supraquiasmático ao longo de sua vida. Sabendo, portanto, que a alteração de melatonina (redução e abolição de ritmo) foi capaz de alterar a expressão do oscilador do NSQ e que a melatonina é um marcador temporal circadiano, sazonal, mas também ontogenético, a redução da melatonina poderia ser um dos motivos que levaria à tais alterações decorrentes na expressão dos genes relógio durante o envelhecimento (138).

Mediante os resultados obtidos até o momento, podemos afirmar que a inervação simpática na glândula pineal é fundamental para o organismo, não só por controlar a função

principal da glândula (produzir e secretar melatonina), mas também por comandar os principais genes responsáveis pela ritmicidade diária do seu metabolismo e influenciar indiretamente, através da redução e arritmia de melatonina, a ritmicidade circadiana do oscilador central de mamíferos.

O peso corporal e o consumo alimentar não foram alterados após 12 semanas de ganglionectomia ou pinealectomia. Trabalhos mostram que tratamento com melatonina leva à perda de peso (139,140), diferente do visto no presente trabalho, já que na ausência da melatonina deveria haver um aumento do peso. Dados do nosso grupo ainda não publicados, mostram que os animais pinealectomizados apresentam um peso maior do que os animais controles após 9 meses, justificando a não diferença observada no presente trabalho.

As análises dos ritmos de temperatura e atividade motora através dos termogramas e actogramas, respectivamente, mostraram que os animais de todos os grupos apresentaram um ritmo estruturado desses parâmetros. No qual puderam ser observados maiores valores de temperatura (141) e atividade durante a fase de escuro, refletindo assim o perfil de um animal noturno.

De acordo com os dados vistos aqui, a síntese de melatonina prejudicada foi capaz de alterar o perfil diário da produção de calor. O ritmo de temperatura corporal é controlado pelo núcleo supraquiasmático, e é considerado um importante marcador de ritmicidade já que costuma ser robusto e bastante estável. Porém, também pode ser influenciado por fatores externos como claro-escuro ambiental, ciclo de atividade, interações sociais e variação da temperatura ambiental e fatores internos como oscilações hormonais (142). Aparentemente, a melatonina aparece modulando a temperatura corporal desses animais.

Em animais controles, o mesor e a amplitude ao longo do tempo não variaram, porém a alteração do padrão de melatonina foi capaz de alterar o ritmo de temperatura desses animais diferentemente, de forma que nos animais ganglionectomizados, os parâmetros analisados ficaram como intermediários entre o grupo controle e o pinealectomizado. Uma possível explicação para essa diferença é que na pinealectomia há inibição total da melatonina, enquanto que nos animais ganglionectomizados, se nota uma redução e abolição de seu ritmo.

Nos animais pinealectomizados, a diminuição do mesor e aumento da amplitude demonstrou que a ausência de melatonina aumentou a diferença dia e noite, principalmente pela redução da temperatura na fase de claro, aumentando, em consequência a amplitude do ritmo.

O tecido adiposo marrom é um importante tecido termorregulador, promovendo geração de calor. A melatonina é capaz de estimular o crescimento desse tecido em hamsters (143), de aumentar a termogênese não dependente de tremor, por aumentar a quantidade de proteínas

mitocondriais, principalmente a proteína desacopladora 1 (UCP1), e aumentar a atividade da enzima citocromo oxidase no tecido adiposo marrom de hamsters (144). Em 2013, Jimenez-Aranda (145) e colaboradores também mostraram que a administração oral de melatonina foi capaz de induzir a modificação de um tecido adiposo branco em um tecido adiposo bege, através do processo de “browning”. Esse tecido bege seria intermediário entre o tecido adiposo branco e o marrom, mas também com produção de calor. Juntas essas evidências mostram o papel da melatonina no aumento da produção de calor, de forma que quando na sua ausência, espera-se, como de fato se viu, uma redução da temperatura do animal.

Complementando o que foi visto na temperatura, os animais pinealectomizados exibiram um aumento da atividade motora, impedindo a queda de atividade vista ao longo do tempo nos animais controles. Esse resultado corrobora o visto em outros trabalhos, como o de Wong e Whiteside (1967) e de Reiss et al. (1963), onde a administração de melatonina foi capaz de reduzir a atividade de ratos, logo a sua ausência o faria aumentar. Além disso, esse aumento da atividade pode ser um mecanismo compensatório para a redução de temperatura vista nos animais pinealectomizados, na tentativa de se produzir calor através da atividade muscular.

Trabalhos mostram que alterações em genes envolvidos na manutenção da estrutura rítmica circadiana, podem resultar em fortes alterações no ritmo de atividade locomotora desses animais. Em camundongos mutantes para a ausência de *Dbp*, o período da atividade motora dos animais mantidos em condições constantes é mais curto e quando mantidos em um ciclo de iluminação claro-escuro (12 h/12 h) a atividade motora diária se mostrou reduzida (146). Nem a ganglionectomia e nem a pinealectomia por 12 semanas promoveram alterações na expressão de *Dbp* no núcleo supraquiasmático, responsável pela coordenação rítmica da atividade motora. Esse dado, juntamente ao fato de os animais serem mantidos em regime de luz claro-escuro (12 h/12 h) poderiam explicar a manutenção do período de atividade dos animais em um valor próximo às 24 h.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto esses dados mostram a importância da inervação simpática na glândula pineal para a manutenção da integridade do sistema circadiano, já que a remoção da inervação simpática através da ganglionectomia, promoveu alterações na fisiologia rítmica da glândula pineal, sendo capaz de alterar os genes relógio expressos nesse tecido. Além disso, através da alteração na via de síntese de melatonina, e provável alteração do padrão de secreção desse hormônio, com redução e abolição da variação entre o dia e a noite, a ganglionectomia levou a alterações na expressão do oscilador central de mamíferos. Demonstrando que para gerar alterações na expressão rítmica do oscilador molecular do núcleo supraquiasmático, não é somente necessária a ausência completa de melatonina. Sendo assim, extrapolando esse dado, o ciclo de iluminação artificial a que estamos expostos atualmente, com fotoiluminação inclusive durante a noite, poderia afetar o oscilador central diretamente através da via retino-hipotalâmica, mas também indiretamente através da alteração da síntese de melatonina, já que é sabido que, assim como a ganglionectomia, pulsos de luz durante a noite é capaz de reduzir a via de síntese e, conseqüentemente, a secreção de melatonina (147,148), reenfatizando a necessidade de estudos na área.

Apesar de ser muito importante para manter essa coesão do sistema através de seus efeitos no supraquiasmático, os efeitos observados pela ganglionectomia nos ciclos de atividade e temperatura, foram menos marcantes do que aqueles provocados pela ausência total de melatonina através da pinealectomia, reforçando a ideia de que de fato a melatonina é um importante mensageiro circadiano, e que a sua redução ou arritmicidade, e principalmente sua abolição, é capaz de gerar modificações no sistema circadiano, molecularmente e comportamentalmente.

REFERÊNCIAS

1. Anokhin PK. Biology and Neurophysiology of the Conditioned Reflex and its Role in Adaptive Behavior. *Biology and Neurophysiology of the Conditioned Reflex and its Role in Adaptive Behavior*. 1974. 313-329 p.
2. Moore-Ede M, Sulzman F, Fuller C. The clocks that time us: physiology of the circadian timing system. Cambridge, Mass: Harvard University Press; 1982.
3. Menna-Barreto LS, Fortunato G. O que é cronobiologia? In: Cipolla-Neto J, Marques N, Menna-Barreto LS, organizadores. *Introdução ao Estudo da Cronobiologia*. São Paulo: Ícone; 1988. p. 15–23.
4. Paludetti LA, Afeche SC, Benedito-Silva AA. Conceitos fundamentais. In: Cipolla-Neto J, Marques N, Menna-Barreto LS, organizadores. *Introdução ao Estudo da Cronobiologia*. São Paulo: Ícone; 1988. p. 25–64.
5. Aschoff J. Die 24-Stunden-Periodik der Maus unter konstanten Umgebungsbedingungen. *Naturwissenschaften*. 1951;38(21):506–7.
6. Bonmati-Carrion MA, Arguelles-Prieto R, Martinez-Madrid MJ, Reiter R, Hardeland R, Rol MA, et al. Protecting the melatonin rhythm through circadian healthy light exposure. *Int J Mol Sci*. 2014;15(12):23448–500.
7. World Health Organization IA for R on, Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *Paint firefighting, Shiftw*. 2010;98:9–764.
8. Filipski E, King VM, Li X, Granda TG, Mormont M-C, Liu X, et al. Host circadian clock as a control point in tumor progression. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(9):690–7.
9. Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*. 2002;111(1):41–50.
10. Truong T, Liquet B, Menegaux F, Plancoulaine S, Laurent-Puig P, Mulot C, et al. Breast cancer risk, nightwork, and circadian clock gene polymorphisms. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(4):629–38.
11. Karantanos T, Theodoropoulos G, Pektasides D, Gazouli M. Clock genes: their role in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(8):1986–92.
12. Kelleher FC, Rao A, Maguire A. Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer Lett*. Elsevier Ireland Ltd; 2014;342(1):9–18.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

13. Qin L-Q, Li J, Wang Y, Wang J, Xu J-Y, Kaneko T. The effects of nocturnal life on endocrine circadian patterns in healthy adults. *Life Sci.* 2003;73(19):2467–75.
14. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. *Occup Environ Med.* 2001;58(11):747–52.
15. Garaulet M, Lee Y-C, Shen J, Parnell LD, Arnett DK, Tsai MY, et al. Genetic variants in human CLOCK associate with total energy intake and cytokine sleep factors in overweight subjects (GOLDN population). *Eur J Hum Genet.* 2010;18(3):364–9.
16. Fonken LK, Workman JL, Walton JC, Weil ZM, Morris JS, Haim A, et al. Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(43):18664–9.
17. Mendez N, Halabi D, Spichiger C, Salazar ER, Vergara K, Alonso-Vasquez P, et al. Gestational Chronodisruption Impairs Circadian Physiology in Rat Male Offspring, Increasing the Risk of Chronic Disease. *Endocrinology.* 2016;157(12):4654–68.
18. Arendt J. *Melatonin and the Mammalian Pineal Gland.* Vol. ed 1., London. Chapman & Hall. 1995.
19. Moller M, Møller M. Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech.* 1992;21(3):188–204.
20. Swanson LW. *Brain Maps: Structure of the Rat Brain.* 2^a. Oxford, United Kingdom: Elsevier Science & Technology; 1998. 274 p.
21. Reiter RJ. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol.* 1995;16(4):383–415.
22. Duguay D, Cermakian N. The crosstalk between physiology and circadian clock proteins. *Chronobiol Int.* 2009;26(8):1479–513.
23. Dardente H, Cermakian N. Molecular Circadian Rhythms in Central and Peripheral Clocks in Mammals. *Chronobiol Int.* 2007;24(2):195–213.
24. Skene DJ, Arendt J. Human circadian rhythms: physiological and therapeutic relevance of light and melatonin. *Ann Clin Biochem.* 2006;43(Pt 5):344–53.
25. Tan DX, Pöeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Lucien MC, et al. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett.* 1993;70(1–2):65–71.
26. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant

- and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*. 2002;2(2):181–97.
27. Kappers JA. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1960;52:163–215.
 28. Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia*. 1989;45(10):922–32.
 29. Campos L, Cipolla-Neto J, Amaral FG, Michelini LC, Bader M, Baltatu OC. The Angiotensin-melatonin axis. *Int J Hypertens*. 2013;2013:521783.
 30. Cipolla-Neto J, Bartol I, Seraphim PM, Afeche SC, Scialfa JH, Peraçoli AM. The effects of lesions of the thalamic intergeniculate leaflet on the pineal metabolism. *Brain Res*. 1995;691(1–2):133–41.
 31. Moore RY. Neural control of pineal function in mammals and birds. *J Neural Transm Suppl*. 1978;(13):47–58.
 32. Cipolla-Neto J, Afeche SC. Glândula Pineal. In: Aires M de M, organizador. *Fisiologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 980–90.
 33. Borjigin J, Wang MM, Snyder SH. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature*. dezembro de 1995;378(6559):783–5.
 34. Klein DC, Sugden D, Weller JL. Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(2):599–603.
 35. Chik CL, Ho AK, Klein DC. Alpha 1-adrenergic potentiation of vasoactive intestinal peptide stimulation of rat pinealocyte adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate: evidence for a role of calcium and protein kinase-C. *Endocrinology*. 1988;122(2):702–8.
 36. Vanecek J, Sugden D, Weller J, Klein DC. Atypical synergistic alpha 1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology*. 1985;116(6):2167–73.
 37. Sugden D, Klein DC. Activators of protein kinase C act at a postreceptor site to amplify cyclic AMP production in rat pinealocytes. *J Neurochem*. 1988;50(1):149–55.
 38. Sugden D, Vanecek J, Klein DC, Thomas TP, Anderson WB. Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature*. 1985;314(6009):359–61.
 39. Roseboom PH, Klein DC. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic

- receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol.* 1995;47(3):439–49.
40. Coon SL, Roseboom PH, Baler R, Weller JL, Namboodiri MA, Koonin E V, et al. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science.* 1995;270(5242):1681–3.
 41. Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology.* 1996;137(7):3033–45.
 42. Klein DC, Roseboom PH, Coon SL. New light is shining on the melatonin rhythm enzyme the first postcloning view. *Trends Endocrinol Metab.* 1996;7(3):106–12.
 43. Maronde E, Pfeffer M, Olcese J, Molina C a, Schlotter F, Dehghani F, et al. Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *J Neurosci.* 1999;19(9):3326–36.
 44. Ribelayga C, Pévet P, Simonneaux V. Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res.* 1997;777(1–2):247–50.
 45. Ribelayga C, Garidou M-LL, Malan A, Gauer F, Calgari C, Pévet P, et al. Photoperiodic Control of the Rat Pineal Arylalkylamine-N-Acetyltransferase and Hydroxyindole-O-Methyltransferase Gene Expression and Its Effect on Melatonin Synthesis. *J Biol Rhythms.* 1999;14(2):105–15.
 46. Horn JP, Swanson LW. The Autonomic Motor System and the Hypothalamus. In: Kandel ER, Shwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, organizadores. *Principles of Neuro Science.* 5th ed McGraw-Hill Companies; 2013. p. 1056–77.
 47. Reiter RJ, Hedlund L. Peripheral sympathetic innervation of the deep pineal gland of the golden hamster. *Experientia.* 1976;32(8):1071–2.
 48. Luo Y, Wang J, Wu H, Zhu D, Zhang Y. Working-memory training improves developmental dyslexia in Chinese children. *Neural Regen Res.* 2013;8(5):452–60.
 49. Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Garidou M-L, Wortel J, van der Vliet J, van Heijningen C, et al. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci.* 2003;17(2):221–8.
 50. Takekida S, Yan L, Maywood ES, Hastings MH, Okamura H. Differential adrenergic regulation of the circadian expression of the clock genes *Period1* and *Period2* in the rat pineal gland. *Eur J Neurosci.* 2000;12(12):4557–61.
 51. Garidou ML, Bartol I, Calgari C, Pévet P, Simonneaux V. In vivo observation of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the

- rat pineal complex. *Neuroscience*. 2001;105(3):721–9.
52. Klein DC, Weller JL, Moore RY. Melatonin metabolism: neural regulation of pineal serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(12):3107–10.
 53. Nagle CA, Cardinali DP, Rosner JM. Retinal and Pineal Hydroxyindole—O—Methyl Transferases in the Rat: Changes Following Cervical Sympathectomy, Pinealectomy or Blinding. *Endocrinology*. 1973;92(5):1560–4.
 54. Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972;69(6):1583–6.
 55. Eastman CI, Mistlberger RE, Rechtschaffen A. Suprachiasmatic nuclei lesions eliminate circadian temperature and sleep rhythms in the rat. *Physiol Behav*. 1984;32(3):357–68.
 56. Saito M, Ibuka N. Decreased food intake of rats kept under adurnal feeding cycles: effect of suprachiasmatic lesions. *Physiol Behav*. 1983;30(1):87–92.
 57. Stoynev AG, Ikononov OC, Usunoff KG. Feeding pattern and light-dark variations in water intake and renal excretion after suprachiasmatic nuclei lesions in rats. *Physiol Behav*. 1982;29(1):35–40.
 58. Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res*. 2002;309(1):47–56.
 59. Simonneaux V, Poirel V-J, Garidou M-L, Nguyen D, Diaz-Rodriguez E, Pévet P. Daily rhythm and regulation of clock gene expression in the rat pineal gland. *Mol Brain Res*. 2004;120(2):164–72.
 60. Takahashi JS. Molecular components of the circadian clock in mammals. *Diabetes, Obes Metab*. 2015;17:6–11.
 61. Ye R, Selby CP, Chiou Y-Y, Ozkan-Dagliyan I, Gaddameedhi S, Sancar A. Dual modes of CLOCK:BMAL1 inhibition mediated by Cryptochrome and Period proteins in the mammalian circadian clock. *Genes Dev*. 2014;28(18):1989–98.
 62. Bonaconsa M, Malpeli G, Montaruli A, Carandente F, Grassi-Zucconi G, Bentivoglio M. Differential modulation of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus, liver and heart of aged mice. *Exp Gerontol*. Elsevier B.V.; 2014;55:70–9.
 63. Agez L, Laurent V, Pévet P, Masson-Pévet M, Gauer F. Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience*. 2007;144(2):522–30.
 64. Masson-Pévet M. [Melatonin in the circadian system]. *J Soc Biol*. 2007;201(1):77–83.

65. Namihira M, Honma S, Abe H, Tanahashi Y, Ikeda M, Honma K. Daily variation and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the pineal body and different areas of brain in rats. *Neurosci Lett.* 1999;267(1):69–72.
66. Fukuhara C, Yamazaki S, Liang J. Pineal circadian clocks gate arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the mouse pineal gland. *J Neurochem.* 2005;93(1):156–62.
67. Wongchitrat P, Felder-Schmittbuhl M-P, Phansuwan-Pujito P, Pévet P, Simonneaux V. Endogenous rhythmicity of Bmal1 and Rev-erb alpha in the hamster pineal gland is not driven by norepinephrine. *Eur J Neurosci.* maio de 2009;29(10):2009–16.
68. Wu T, Dong Y, Yang Z, Kato H, Ni Y, Fu Z. Differential resetting process of circadian gene. 2009;26(6):793–807.
69. Fukuhara C, Dirden JC, Tosini G. Regulation of period 1 expression in cultured rat pineal. *Neurosignals.* 2002;11(2):103–14.
70. Sugimoto T, Morioka N, Sato K, Hisaoka K, Nakata Y. Noradrenergic regulation of period1 expression in spinal astrocytes is involved in protein kinase A, c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase activation mediated by α 1- and β 2-adrenoceptors. *Neuroscience.* 2011;185:1–13.
71. Andrade-Silva J, Cipolla-Neto J, Peliciari-Garcia R a. The in vitro maintenance of clock genes expression within the rat pineal gland under standard and norepinephrine-synchronized stimulation. *Neurosci Res.* 2014;81–82:1–10.
72. Kennaway DJ, Owens J a, Voultzios A, Boden MJ, Varcoe TJ. Metabolic homeostasis in mice with disrupted Clock gene expression in peripheral tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293(4):R1528-37.
73. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron.* 1994;13(5):1177–85.
74. Bellavía SL, Carpentieri a R, Vaqué a M, Macchione a F, Vermouth NT. Pup circadian rhythm entrainment--effect of maternal ganglionectomy or pinealectomy. *Physiol Behav.* 2006;89(3):342–9.
75. Mihara T, Kikuchi T, Kamiya Y, Uchimoto K, Kurahashi K, Goto T. Day or Night Administration of Ketamine and Pentobarbital Differentially Affect Circadian Rhythms of Pineal Melatonin Secretion and Locomotor Activity in Rats. *Anesth Analg.* 2012;115(4):805–13.
76. Savastano LE, Castro AE, Fitt MR, Rath MF, Romeo HE, Muñoz EM. A standardized surgical technique for rat superior cervical ganglionectomy. *J Neurosci Methods.* 2010;192(1):22–33.

77. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
78. Harkin A, O'Donnell JM, Kelly JP. A study of VitalView for behavioural and physiological monitoring in laboratory rats. *Physiol Behav*. 2002;77(1):65–77.
79. Usvyat LA, Carter M, Thijssen S, Kooman JP, van der Sande FM, Zabetakis P, et al. Seasonal variations in mortality, clinical, and laboratory parameters in hemodialysis patients: a 5-year cohort study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7(1):108–15.
80. Morgan WW, Hansen JT. Time course of the disappearance of pineal noradrenaline following superior cervical ganglionectomy. *Exp brain Res*. 1978;32(3):429–34.
81. Coon SL, McCune SK, Sugden D, Klein DC. Regulation of pineal alpha1B-adrenergic receptor mRNA: day/night rhythm and beta-adrenergic receptor/cyclic AMP control. *Mol Pharmacol*. 1997;51(4):551–7.
82. Sugden D, Klein DC. Regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase in neonatal and adult rats. *J Neurochem*. 1983;40(6):1647–53.
83. Chik CL, Young I, Ho AK. Differential involvement of the arachidonic acid cascade on the alpha 1-adrenergic potentiation of vasoactive intestinal peptide- versus beta-adrenergic-stimulated cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in rat pinealocytes. *J Neurochem*. 1991;57(5):1534–9.
84. Simonneaux V, Kienlen-Campard P, Loeffler JP, Basille M, Gonzalez BJ, Vaudry H, et al. Pharmacological, molecular and functional characterization of vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in the rat pineal gland. *Neuroscience*. 1998;85(3):887–96.
85. Piszczkiewicz S, Zigmund RE. Is the vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in the rat pineal gland present in fibers originating in the superior cervical ganglion? *Brain Res*. 1992;598(1–2):327–31.
86. Kaku K, Tsuchiya M, Tanizawa Y, Okuya S, Inoue Y, Kaneko T, et al. Circadian cycles in VIP content and VIP stimulation of cyclic AMP accumulation in the rat pineal gland. *Peptides*. 1986;7 Suppl 1:193–5.
87. Moller M, Phansuwan-Pujito P, Morgan KC, Badiu C. Localization and diurnal expression of mRNA encoding the beta1-adrenoceptor in the rat pineal gland: an in situ hybridization study. *Cell Tissue Res*. 1997;288(2):279–84.
88. Pfeffer M, Kuhn R, Krug L, Korf HW, Stehle JH. Rhythmic variation in beta1-adrenergic receptor mRNA levels in the rat pineal gland: circadian and developmental regulation. *Eur J Neurosci*. 1998;10(9):2896–904.
89. Collins S, Ostrowski J, Lefkowitz RJ. Cloning and sequence analysis of the human beta

- 1-adrenergic receptor 5'-flanking promoter region. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1172(1-2):171-4.
90. Henden T, Stokkan KA, Reiter RJ, Nonaka KO, Lerchl A, Jones DJ. Age-associated reduction in pineal beta-adrenergic receptor density is prevented by life-long food restriction in rats. *Biol Signals*. 1(1):34-9.
 91. Sugden D. Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J Neurochem*. 2003;86(5):1308-11.
 92. Boadle-Biber MC. Activation of tryptophan hydroxylase from slices of rat brain stem incubates with N6, 02'-dibutyryl adenosine-3':5'-cyclic monophosphate. *Biochem Pharmacol*. fevereiro de 1980;29(4):669-72.
 93. Ehret M, Pevet P, Maitre M. Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *J Neurochem*. 1991;57(5):1516-21.
 94. Shibuya H, Toru M, Watanabe S. A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rat pineals. *Brain Res*. 1977;138(2):364-8.
 95. Sitaram BR, Lees GJ. Effect of oxygen on the induction of tryptophan hydroxylase by adrenergic agents in organ cultures of rat pineal glands. *J Neurochem*. abril de 1984;42(4):1183-5.
 96. Boularand S, Darmon MC, Mallet J. The human tryptophan hydroxylase gene. An unusual splicing complexity in the 5'-untranslated region. *J Biol Chem*. 1995;270(8):3748-56.
 97. Faniello MC, Bevilacqua MA, Condorelli G, de Crombrughe B, Maity SN, Avvedimento VE, et al. The B subunit of the CAAT-binding factor NFY binds the central segment of the Co-activator p300. *J Biol Chem*. 1999;274(12):7623-6.
 98. Côté F, Schussler N, Boularand S, Peirotes A, Thévenot E, Mallet J, et al. Involvement of NF-Y and Sp1 in basal and cAMP-stimulated transcriptional activation of the tryptophan hydroxylase (TPH) gene in the pineal gland. *J Neurochem*. 2002;81(4):673-85.
 99. Huang Z, Liu T, Chatteraj A, Ahmed S, Wang MM, Deng J, et al. Posttranslational regulation of TPH1 is responsible for the nightly surge of 5-HT output in the rat pineal gland. *J Pineal Res*. 2008;45(4):506-14.
 100. Ho a K, Price DM, Terriff D, Chik CL. Timing of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the rat pineal gland. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;252(1-2):34-9.
 101. Yuwiler A, Brammer GL, Bennett BL. Interaction between adrenergic and peptide stimulation in the rat pineal: pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *J Neurochem*.

- 1995;64(5):2273–80.
102. Gauer F, Craft CM. Circadian regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA levels in rat pineal and retina. *Brain Res.* 1996;737(1–2):99–109.
 103. Klein DC, Schaad NL, Namboordiri MA, Yu L, Weller JL. Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Biochem Soc Trans.* 1992;20(2):299–304.
 104. Wang G-Q, Du Y-Z, Tong J. Daily oscillation and photoresponses of clock gene, *Clock*, and clock-associated gene, arylalkylamine N-acetyltransferase gene transcriptions in the rat pineal gland. *Chronobiol Int.* 2007;24(1):9–20.
 105. Wongchitrat P, Felder-schmittbuhl M. A Noradrenergic Sensitive Endogenous Clock Is Present in the Rat Pineal Gland. 2011;75–83.
 106. Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science.* 2000;288(5468):1013–9.
 107. Yoshikawa T, Yamazaki S, Menaker M. Effects of preparation time on phase of cultured tissues reveal complexity of circadian organization. *J Biol Rhythms.* 2005;20(6):500–12.
 108. Chen W, Baler R. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;81(1–2):43–50.
 109. Morioka N, Sugimoto T, Tokuhara M, Dohi T, Nakata Y. Noradrenaline induces clock gene *Per1* mRNA expression in C6 glioma cells through beta(2)-adrenergic receptor coupled with protein kinase A - cAMP response element binding protein (PKA-CREB) and Src-tyrosine kinase - glycogen synthase kinase-3beta (Src-GSK. *J Pharmacol Sci.* 2010;113(3):234–45.
 110. Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S, Okamura H. Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol.* 2000;20(13):4773–81.
 111. Takekida S, Yan L, Maywood ES, Hastings MH, Okamura H. Differential adrenergic regulation of the circadian expression of the clock genes *Period1* and *Period2* in the rat pineal gland. *Eur J Neurosci.* 2000;12(12):4557–61.
 112. Kornmann B, Schaad O, Bujard H, Takahashi JS, Schibler U. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol.* 2007;5(2):e34.
 113. Pang SF, Ralph CL. Pineal and serum melatonin at midday and midnight following pinealectomy or castration in male rats. *J Exp Zool.* 1975;193(3):275–80.
 114. Pevet P, Challet E. Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the

- circadian clocks network. *J Physiol Paris*. 2011;105(4–6):170–82.
115. de Farias TDSM, de Oliveira AC, Andreotti S, do Amaral FG, Chimin P, de Proença ARA, et al. Pinealectomy interferes with the circadian clock genes expression in white adipose tissue. *J Pineal Res*. 2015;58(3):251–61.
 116. Lamia KA, Storch K-F, Weitz CJ. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci*. setembro de 2008;105(39):15172–7.
 117. Zhang EE, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul PY, Liu AC, Hirota T, et al. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med*. 2010;16(10):1152–6.
 118. Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, et al. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol*. 2002;12(7):540–50.
 119. Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*. 2000;14(23):2950–61.
 120. Stokkan K-A, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. Entrainment of the Circadian Clock in the Liver by Feeding. *Science (80-)*. 2001;291(5503):490–3.
 121. Vollmers C, Gill S, DiTacchio L, Pulivarthy SR, Le HD, Panda S. Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(50):21453–8.
 122. Shieh J-M, Wu H-T, Cheng K-C, Cheng J-T. Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKC ζ -Akt-GSK3 β pathway in hepatic cells. *J Pineal Res*. 2009;47(4):339–44.
 123. Kurabayashi N, Hirota T, Sakai M, Sanada K, Fukada Y. DYRK1A and Glycogen Synthase Kinase 3 , a Dual-Kinase Mechanism Directing Proteasomal Degradation of CRY2 for Circadian Timekeeping. *Mol Cell Biol*. 2010;30(7):1757–68.
 124. Sabath E, Salgado-Delgado R, Guerrero-Vargas NN, Guzman-Ruiz MA, del Carmen Basualdo M, Escobar C, et al. Food entrains clock genes but not metabolic genes in the liver of suprachiasmatic nucleus lesioned rats. *FEBS Lett*. 2014;588(17):3104–10.
 125. Saini C, Liani A, Curie T, Gos P, Kreppel F, Emmenegger Y, et al. Real-time recording of circadian liver gene expression in freely moving mice reveals the phase-setting behavior of hepatocyte clocks. *Genes Dev*. 2013;27(13):1526–36.
 126. Houdek P, Nováková M, Polidarová L, Sládek M, Sumová A. Melatonin is a redundant entraining signal in the rat circadian system. *Horm Behav*. 2016;83:1–5.

127. Quintela T, Sousa C, Patriarca FM, Gonçalves I, Santos CRA. Gender associated circadian oscillations of the clock genes in rat choroid plexus. *Brain Struct Funct*. 2015;220(3):1251–62.
128. Hewing M. A liquor contacting area in the pineal recess of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Anat Embryol (Berl)*. 1978;153(3):295–304.
129. Heidbüchel U, Vollrath L. Pineal complex of rats: effects of superficial pinealectomy on the deep pineal. *Acta Anat (Basel)*. 1983;117(2):165–9.
130. Challet E. Minireview : Entrainment of the Suprachiasmatic Clockwork in Diurnal and Nocturnal Mammals. *Endocrinology*. 2007;148(12):5648–55.
131. Pévet P, Agez L, Bothorel B, Saboureau M, Gauer F, Laurent V, et al. Melatonin in the multi-oscillatory mammalian circadian world. *Chronobiol Int*. 2006;23(1–2):39–51.
132. Cassone VM. Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci*. 1990;13(11):457–64.
133. Agez L, Laurent V, Guerrero HY, Pévet P, Masson-Pévet M, Gauer F. Endogenous melatonin provides an effective circadian message to both the suprachiasmatic nuclei and the pars tuberalis of the rat. *J Pineal Res*. 2009;46(1):95–105.
134. Vriend J, Reiter RJ. Melatonin feedback on clock genes : a theory involving the proteasome. *J Pineal Res*. 2015;(58):1–11.
135. Dardente H, Menet JS, Poirel VJ, Streicher D, Gauer F, Vivien-Roels B, et al. Melatonin induces *Cry1* expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003;114(2):101–6.
136. Amir S, Harbour VL, Robinson B. Pinealectomy does not affect diurnal *PER2* expression in the rat limbic forebrain. *Neurosci Lett*. maio de 2006;399(1–2):147–50.
137. Besing RC, Paul JR, Hablitz LM, Rogers CO, Johnson RL, Young ME, et al. Circadian rhythmicity of active *GSK3* isoforms modulates molecular clock gene rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms*. 2015;30(2):155–60.
138. Reiter RJ, Richardson BA, Johnson LY, Ferguson BN, Dinh DT. Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science*. 1980;210(4476):1372–3.
139. Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrangé P, Renard P, et al. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2003;144(12):5347–52.
140. Bojková B, Orendás P, Friedmanová L, Kassayová M, Datelinka I, Ahlersová E, et al. Prolonged melatonin administration in 6-month-old Sprague-Dawley rats: metabolic

alterations. *Acta Physiol Hung.* março de 2008;95(1):65–76.

141. Fioretti MC, Riccardi C, Menconi E, Martini L. Control of the circadian rhythm of the body temperature in the rat. *Life Sci.* junho de 1974;14(11):2111–9.
142. Hanneman SK. Measuring Circadian Temperature Rhythm. *Biol Res Nurs.* 2001;2(4):236–48.
143. Heldmaier G, Hoffmann K. Melatonin stimulates growth of brown adipose tissue. *Nature.* 1974;247(5438):224–5.
144. Heldmaier G, Steinlechner S, Rafael J, Vsiansky P. Photoperiodic control and effects of melatonin on nonshivering thermogenesis and brown adipose tissue. *Science.* 1981;212(4497):917–9.
145. Jiménez-Aranda A, Fernández-Vázquez G, Campos D, Tassi M, Velasco-Perez L, Tan DX, et al. Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res.* 2013;55:416–23.
146. Lopez-Molina L, Conquet F, Dubois-Dauphin M, Schibler U. The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J.* 1997;16(22):6762–71.
147. Ribelayga C, Gauer F, Calgari C, Pevet P, Simonneaux V. Photoneural Regulation of Rat Pineal Hydroxyindole- O - Methyltransferase (HIOMT) Messenger Ribonucleic Acid Expression : An Analysis of Its Complex Relationship with HIOMT Activity *. *Endocrinology.* 1999;140(3).
148. Grundy A, Sanchez M, Richardson H, Tranmer J, Borugian M, Graham CH, et al. Light Intensity Exposure, Sleep Duration, Physical Activity, and Biomarkers of Melatonin Among Rotating Shift Nurses. *Chronobiol Int.* 2009;26(7):1443–61.