

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
PPG CBIOL

Dissertação

**A variação da temperatura
como pista ambiental na
expressão temporal de genes
em cardiomiócitos de
camundongos neonatos.**

Franciane Toledo Nogueira

Ouro Preto

2021



UFOP

FRANCIANE TOLEDO NOGUEIRA

**A VARIÇÃO DA TEMPERATURA COMO PISTA AMBIENTAL NA
EXPRESSÃO TEMPORAL DE GENES EM CARDIOMIÓCITOS DE
CAMUNDONGOS NEONATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Orientador: Prof. Dr. Mauro César Isoldi (DCBI/UFOP)

Coorientador(a): Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci (IBUSP/USP)

OURO PRETO – MG

2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

N778a Nogueira, Franciane Toledo .

A variação da temperatura como pista ambiental na expressão temporal de genes em cardiomiócitos de camundongos neonatos. [manuscrito] / Franciane Toledo Nogueira. - 2021.

82 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Mauro César Isoldi.

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Miócitos Cardíacos. 2. Expressão gênica. 3. Temperatura corporal. I. Castrucci, Ana Maria de Lauro. II. Isoldi, Mauro César. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 577.1

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E
BIOLOGICAS DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS
BIOLOGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Franciane Toledo Nogueira

A variação da temperatura como pista ambiental na expressão temporal de genes em cardiomiócitos de camundongos neonatos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Aprovada em 30 de julho de 2021.

Membros da banca

Dr. Mauro Cesar Isoldi - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP
Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci - Coorientadora - Universidade de São Paulo - USP
Dra. Fernanda Cacilda dos Santos Silva - Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP
Dr. Victor Neiva Lavorato - Centro Universitário Governador Ozanam Coelho - UNIFAGOC

Dr. Mauro Cesar Isoldi, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 27 de agosto de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cesar Isoldi, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 13/09/2021, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0219877** e o código CRC **77D4A5F1**.

Dedico esse trabalho às mulheres e a todos que reconhecem a ciência como o não reflexo de seus anseios e desejos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Newton Luiz** e **Ivanice Adelina**, por me ensinarem os valores fundamentais que constituem um *ser humano* e ao meu querido irmão **Diogo**, *in memoriam*, por todas as aventuras, risadas e cumplicidade que compartilhamos no seu tempo conosco.

À minha família do coração, **Fernando Manoel**, por todo amor, amizade, escuta, dedicação, carinho e alegria que compartilhamos em diversos momentos de nossa trajetória juntos. À minha cunhada **Regina Irene**, possuidora de uma inteligência singular e incrível habilidade em sua hospitalidade e uso da palavra.

Aos meus amigos de longa data, **Danielle** por me acolher com apenas o seu olhar e que a cada reencontro é como se nunca tivéssemos nos separado; **Karine** por ser a minha melhor companhia e que nossas diferenças nos unam cada vez mais; **Tomás** por sua simplicidade encantar a todos que estão a sua volta; **Vitor** por sua lealdade e amizade, além das experiências únicas que tivemos desde a nossa tenra idade; **Alexandra** pela confiança e escuta nos momentos mais importantes.

Aos escritores, por nos envolverem com seus esclarecimentos, em especial à Hannah Arendt: “A violência aparece onde o poder está em risco, mas, deixada a seu próprio curso, conduz a desaparecimento do poder”.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Mauro César Isoldi**, pelo incentivo e dedicação ao projeto. Agradeço por sinalizar os caminhos a serem percorridos na carreira científica e me proporcionar a percepção do profissional que pretendo ser. A **Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci** e ao **Dr. Leonardo de Assis**, que gentilmente colaboraram de forma assertiva na execução do meu projeto.

Aos amigos do **Laboratório de Sinalização Celular**, especialmente à Denise, Ana Beatriz, Maria Cecília, Laura e Isabella, pela paciência e companheirismo.

A **todos os professores do NUPEB** pela atenção, interesse e disposição ao auxiliar os alunos em sua comunicação entre os laboratórios da pós-graduação.

Agradeço a **todos os funcionários da UFOP** por toda dedicação aos alunos que a frequentam.

À **UFOP**, à **USP**, à **CAPES**, ao **CNPq**, à **FAPEMIG** e à **FAPESP** pelo financiamento que possibilitou a realização deste trabalho.

RESUMO

O trabalho teve como objetivo analisar a expressão temporal medida em um período de 24 h de genes do relógio (*Bmal1* e *Per1*), opsinas (*Opn2*, *Opn3* e *Opn4*), canais TRP (*Trpa1*, *Trpv1* e *Trpm8*) e receptores natriuréticos (*Npra*, *Nprb* e *Nprc*) em cultura primária de cardiomiócitos de camundongos neonatos C57BL/6J, mantidos em escuridão constante. As células foram lisadas imediatamente após estímulo de pulso de frio de 2 h de duração (*zeitgeber* ou ZT0) e 6 h (ZT6), 12 h (ZT12) e 18 h (ZT18) após o estímulo. Para quantificar os níveis de mRNA dos genes selecionados, foi realizada técnica de qPCR seguida da análise pelo método de quantificação relativa da expressão gênica ($\Delta\Delta CT$). Os genes alvos foram normalizados pelo RNA ribossômico *18S*. Os dados foram apresentados como média e erro padrão da média utilizando-se o teste ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste Bonferroni para comparação entre os grupos, e *One-way* seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação intragrupo. Destaca-se aqui que para os genes *Trpm8* e *Nprb* o pulso de frio ocasionou aumento nos níveis de expressão gênica no tempo ZT18 para ambos os genes entre os grupos e uma maior expressão no ZT12 para o gene *Nprb*. A comparação intragrupo para ambos os genes apresentou maior expressão no ZT18 em relação ao ZT0, ZT6 e ZT12 no grupo tratado. Quanto ao perfil temporal da *Opn2*, houve maior expressão intragrupo no ZT6 do grupo controle em relação ao ZT0, ZT12 e ZT18, e maior expressão no ZT18 em relação ao controle. Para os genes do relógio, a expressão gênica de *Bmal1* apresentou maior expressão intragrupo no ZT6 em relação ao ZT18 no grupo controle e no ZT18 em relação ao ZT0 no grupo tratado, houve aumento da expressão entre grupos no ZT18 em relação ao controle. Já para o gene *Per1* observamos um aumento intragrupo no ZT6 em relação ao ZT0 e ZT12 apenas no grupo controle, e aumento da expressão entre grupos no ZT18 em relação ao controle. Não observamos diferença estatisticamente significativa para a expressão gênica de *Npra* e *Nprc* para a análise intragrupo, mas houve aumento da expressão entre grupos no ZT18 em relação ao controle para o gene *Nprc*. Não houve detecção da expressão dos genes *Trpa1*, *Trpv1*, *Opn3* e *Opn4*. Por fim, relatamos que o pulso de frio foi capaz de aumentar os níveis de expressão gênica da maior parte dos genes analisados, indicando que o estímulo foi captado pelas células. Embora não tenhamos observado expressão cíclica dos genes ligados ao relógio biológico, observamos que o pulso de frio foi capaz de alterar os níveis de expressão similarmente entre os genes *Trpm8* e *Nprb*. Conclui-se que os cardiomiócitos são responsivos ao pulso de frio em nível de expressão gênica. **Palavras-Chave:** cultura primária de cardiomiócitos; expressão gênica; variação de temperatura; relógio biológico.

ABSTRACT

This study aimed to analyze the temporal expression measured over a 24 h period of clock genes (*Bmall* and *Per1*), opsins (*Opn2*, *Opn3* and *Opn4*), TRP channels (*Trpa1*, *Trpv1* and *Trpm8*) and natriuretic receptors (*Npra*, *Nprb* and *Nprc*) in primary culture of C57BL/6J neonatal mouse cardiomyocytes, kept in constant darkness. Cells were lysed immediately after cold pulse stimulation of 2 h duration (zeitgeber or ZT0) and 6 h (ZT6), 12 h (ZT12) and 18 h (ZT18) after stimulation. To quantify the mRNA levels of the selected genes, a qPCR technique was performed followed by the analysis by the relative quantification of gene expression method ($\Delta\Delta\text{CT}$). Target genes were normalized by 18S ribosomal RNA. Data were presented as the mean and standard error of the mean using the Two-way ANOVA test followed by Bonferroni post-test for comparison between groups, and One-way followed by Tukey post-test for intra-group comparison. It is noteworthy here that for genes *Trpm8* and *Nprb* the cold pulse caused an increase in gene expression levels at time ZT18 for both genes between groups and a higher expression in ZT12 for the *Nprb* gene. The intragroup comparison for both genes showed greater expression in ZT18 compared to ZT0, ZT6 and ZT12 in the treated group. As for the temporal profile of *Opn2*, there was a greater intragroup expression in ZT6 of the control group compared to ZT0, ZT12 and ZT18, and greater expression in ZT18 compared to the control group. For clock genes, the gene expression of *Bmall* showed higher intragroup expression in ZT6 compared to ZT18 in the control group and ZT18 compared to ZT0 in the treated group, there was an increase in expression between groups in ZT18 compared to the control. As for the *Per1* gene, we observed an intragroup increase in ZT6 compared to ZT0 and ZT12 only in the control group, and an increase in expression between groups in ZT18 compared to the control group. We did not observe a statistically significant difference for the gene expression of *Npra* and *Nprc* for the intragroup analysis, but there was an increase in expression between groups in ZT18 compared to the control for the *Nprc* gene. There was no detection of the expression of genes *Trpa1*, *Trpv1*, *Opn3* and *Opn4*. Finally, we report that the cold pulse was able to increase the gene expression levels of most of the analyzed genes, indicating that the stimulus was captured by the cells. Although we did not observe the cyclical expression of genes linked to the biological clock, we observed that the cold pulse was able to change expression levels similarly between *Trpm8* and *Nprb* genes. It is concluded that cardiomyocytes are responsive to the cold pulse at the level of gene expression. **Keywords:** primary cardiomyocyte culture; gene expression; temperature variation; biological clock.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Os sistemas circadianos dos mamíferos são mais sensíveis aos ciclos de luz e escuridão por volta das 24 horas do dia. A luz serve como o ZT externo predominante para acompanhar os ritmos circadianos dos mamíferos. Usualmente, os sinais fóticos das fontes de luz são recebidos pelos ipRGCs e chegam o relógio mestre, localizado no SCN sob o hipotálamo do cérebro via RHT. No NSQ, as oscilações primárias são produzidas e transmitidas a nível molecular celular para os tecidos periféricos distais em todo o corpo do organismo. Assim, as diferentes saídas circadianas específicas do tecido são produzidas. Além disso, os ritmos periféricos regulados localmente são integrados para manter a homeostase circadiana, mantendo a sincronização com o relógio mestre. Fonte: CHOWDHURY et al., 2019.26
- Figura 2.** Ilustração do ciclo de retroalimentação transcricional/traducional positivo e negativo básico do relógio circadiano. Alças externas e modificações pós-traducionais, como a fosforilação, contribuem para a manutenção dos principais osciladores. Fonte: ECKELMAHAN e SASSONE-CORSI (2013).27
- Figura 3.** Os peptídeos natriuréticos produzidos pelos cardiomiócitos (CM) mediante regulação hemodinâmica e neuroendócrina atuam nas células-alvo por meio de receptores específicos, guanilil ciclase solúvel (sGC), tipo A e B (GC-A e GC-B). É descrito o tipo de efeito biológico mediado por cada receptor através da via do cGMP, envolvendo a proteína quinase G (PKG) e a fosfodiesterase (PDE). O peptídeo natriurético tipo C produzido pelas células endoteliais (EC) atua através do GC-B, além do receptor do peptídeo natriurético (NPR-C), um receptor não GC capaz de inibir a adenilil ciclase (AC) e reduzir os níveis de AMPc. O NPR-C também desempenha um papel fundamental na eliminação de NPs. Adaptado de: VOLPE; RUBATTU; BURNETT (2014).39
- Figura 4.** Protocolo experimental de avaliação do perfil temporal dos genes do relógio frente ao pulso de frio.46
- Figura 5.** (A) Expressão temporal de *Bmal1* em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J neonatos expostos a temperatura de 37°C em comparação com cardiomiócitos expostos a 34°C durante duas horas, mantidos em escuridão constante. A análise estatística foi realizada por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. (B) e (C) Comparação entre os

ZTs intragrupo foi realizada. A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. (a≠b) Indica diferença intragrupo (p <0.05). Os valores foram normalizados por 18S RNA e expressos relativos à média do controle ZT0. (n= 3)51

Figura 6. (A) Expressão temporal de *Per1* em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J neonatos expostos a temperatura de 37°C em comparação com cardiomiócitos expostos a 34°C durante duas horas, mantidos em escuridão constante. A análise estatística foi realizada por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. (B) e (C) Comparação entre os ZTs intragrupo foi realizada. A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. (a≠b) Indica diferença intragrupo (p <0.05). Os valores foram normalizados por 18S RNA e expressos relativos à média do controle ZT0. (n= 3)52

Figura 7. (A) Expressão temporal de *Opn2* em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J neonatos expostos a temperatura de 37°C em comparação com cardiomiócitos expostos a 34°C durante duas horas, mantidos em escuridão constante. A análise estatística foi realizada por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. (B) e (C) Comparação entre os ZTs intragrupo foi realizada. A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. (a≠b) Indica diferença intragrupo (p <0.05). Os valores foram normalizados por 18S RNA e expressos relativos à média do controle ZT0. (n= 3)53

Figura 8. (A) Expressão temporal de *Trpm8* em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J neonatos expostos a temperatura de 37°C em comparação com cardiomiócitos expostos a 34°C durante duas horas, mantidos em escuridão constante. A análise estatística foi realizada por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. (B) e (C) Comparação entre os ZTs intragrupo foi realizada. A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. (a≠b) Indica diferença intragrupo (p <0.05). Os valores foram normalizados por 18S RNA e expressos relativos à média do controle ZT0. (n= 3)54

Figura 9. Expressão temporal de *Npra* em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J neonatos expostos a temperatura de 37°C em comparação com cardiomiócitos expostos a 34°C durante duas horas, mantidos em escuridão constante. A análise estatística foi realizada por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. (B) e (C) Comparação entre os ZTs intragrupo foi realizada. A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. Os valores foram normalizados por 18S RNA e expressos relativos à média do controle ZT0. (n= 3).....55

Figura 10. (A) Expressão temporal de *Nprb* em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J neonatos expostos a temperatura de 37°C em comparação com cardiomiócitos expostos a 34°C durante duas horas, mantidos em escuridão constante. A análise estatística foi realizada por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. (B) e (C) Comparação entre os ZTs intragrupo foi realizada. A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. (a≠b≠c) Indica diferença intragrupo (p <0.05). Os valores foram normalizados por 18S RNA e expressos relativos à média do controle ZT0. (n= 3).....56

Figura 11. (A) Expressão temporal de *Nprc* em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J neonatos expostos a temperatura de 37°C em comparação com cardiomiócitos expostos a 34°C durante duas horas, mantidos em escuridão constante. A análise estatística foi realizada por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. (B) e (C) Comparação entre os ZTs intragrupo foi realizada. A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. Os valores foram normalizados por 18S RNA e expressos relativos à média do controle ZT0. (n= 3)57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da solução tampão de digestão	44
Tabela 2. Composição da solução tampão.....	44
Tabela 3. Composição do meio de cultura normal	44
Tabela 4. Sequência de primers para PCR quantitativo	48
Tabela 5. $\Delta\Delta CT$ dos genes analisados para cada condição analisada	59

LISTA DE ABREVIATURAS

cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPK	Adenosina monofosfato quinase
ANP	Peptídeo natriurético A
ATP	Trisfosfato de adenosina
bHLH – PAS	<i>basic Helix-loop-helix - period-Arnt-single minded</i>
<i>Bmal1</i>	<i>Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein</i>
BNP	Peptídeo natriurético B
Ca ²⁺	Cálcio
CCA	Centro de Ciências Animal
<i>Clock</i>	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>
CKIε	Caseína quinase 1
CNP	Peptídeo natriurético C
<i>Cry</i>	<i>Cryptochrome</i>
DAG	Diacilglicerol
DBP	Proteína de ligação à caixa D
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E-box	Caixa <i>Enhancer</i>
GABA	Ácido gama aminobutírico
GC	Guanilil ciclase
GHT	Trato geniculado-hipotalâmico
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina

GTP	Trisfosfato de guanosina
HDM	Hipotálamo dorsomedial
HL	Hipotálamo lateral
5 – HT	Serotonina
HVM	Hipotálamo ventromedial
ICEB	Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
IGL	Folhetos intergeniculados
ipRGCs	Células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina
IP ₃	1,4,5-trifosfato de inositol solúvel
Na ⁺	Sódio
NAQ	Núcleo arqueado
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NHM	Núcleo hipotálamo medial
NMR	Núcleo mediano da rafe
NPs	Peptídeos natriuréticos
NPRA	Receptor de peptídeo natriurético A
NPRB	Receptor de peptídeo natriurético B
NPRC	Receptor de peptídeo natriurético C
NPV	Núcleo paraventricular
NPRs	Receptores de peptídeos natriuréticos
NPY	Neuropeptídeo Y
NSQ	Núcleo supraquiasmático hipotalâmico
OPN2	Rodopsina

OPN3	Encefalopsina
OPN4	Melanopsina
OPN4m	Melanopsina com variantes genéticas de mamíferos
OPN4x	Melanopsina com variantes genéticas semelhantes de não-mamíferos
p38 α MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
PACAP	Proteína ativadora do adenilil ciclase hipofisária
PDE	Fosfodiesterase
<i>Per</i>	<i>Period</i>
PIP ₂	4,5-Bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	Proteína quinase dependente de cAMP
PKG	Proteína quinase dependente de cGMP
PLC	Fosfolipase C
<i>Rev-erba</i>	Receptor alfa da subfamília 1 do receptor nuclear
RHT	Trato retino-hipotalâmico
RNA	Ácido Ribonucleico
ROR	Receptor órfão nuclear relacionado ao retinóide
TAM	Tecido adiposo marrom
TRP	Canais iônicos de potencial receptor transitório
TRPA	Canal TRP anquirina
TRPC	Canal TRP canônico
TRPL	Canal TRP- <i>like</i>
TRPM	Canal TRP melastatina
TRPML	Canal TRP mucolipina

TRPN	Canal TRP sem potencial mecanorreceptor C
TRPP	Canal TRP policisteína
TRPV	Canal TRP vanilóide
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
ZT	Zeitgeber

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	5
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Relógio Biológico	22
2.2 Expressão dos genes do relógio biológico.....	23
2.3 Opsinas e o ciclo circadiano	30
2.4 Opsinas e interações com canais TRPs para percepção de temperatura.....	31
2.5 O coração e sua relação com o relógio biológico, opsinas e temperatura	34
2.6 Peptídeos natriuréticos produzidos pelo coração	36
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivos gerais	42
3.2 Objetivos específicos	42
4. METODOLOGIA.....	43
4.1 Ensaio em cultura primária de cardiomiócitos de camundongos neonatos	43
4.1.1 Animais.....	43
4.1.2 Cultura primária de cardiomiócitos	43
4.1.3 Soluções utilizadas nos ensaios	44
4.1.4 Preparo das placas	45
4.1.5 Protocolo experimental para análise do perfil temporal de genes em cardiomiócitos de camundongos neonatos selvagens expostos ao pulso de frio	45
4.2 Extração de RNA total	46

4.3	RT-PCR e q-PCR.....	47
4.4	PCR quantitativo.....	47
4.5	Análise estatística	50
5.	RESULTADOS	51
6.	DISCUSSÃO.....	60
7.	CONCLUSÃO.....	67
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
9.	ANEXO	82
	ANEXO A: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	82

1. INTRODUÇÃO

Da origem da vida até o momento atual, a competição entre seres vivos foi, por assim dizer, o fator decisivo para que ocorresse a evolução. A luta diária pela sobrevivência tornava os mais adaptados capazes de transmitirem suas heranças genéticas às gerações futuras. Nesse processo de adaptação/evolução, o surgimento de sistemas celulares capazes de marcar o tempo e, dessa forma, prever mudanças e ajustar o organismo ao ambiente externo levou seus possuidores a uma grande vantagem evolutiva (LOWREY; TAKAHASHI, 2004). Esse sistema chamamos, hoje, de relógio biológico.

Nos mamíferos, o relógio biológico pode ser dividido em dois grandes blocos: os componentes do chamado relógio central e os relógios periféricos. Cabe ao relógio central não só a marcação das horas, mas principalmente seu ajuste ao meio externo, o que ocorre devido à capacidade do relógio de perceber e interpretar as “pistas” ambientais. Os cronobiologistas chamam tais pistas por um termo específico; *zeitgeber* (em alemão, ‘doador de tempo’) (ZT) (BROWN; AZZI, 2013; TAKAHASHI, 2017). A principal pista ambiental para o relógio central é a luz, que é percebida por células específicas da retina, as quais expressam um tipo de opsina não visual denominado melanopsina (OPN4). A ativação da OPN4 por luz desencadeia uma resposta que faz com que essa informação chegue até o chamado núcleo supraquiasmático hipotalâmico (NSQ), o qual hoje é reconhecido como nosso relógio central (RALPH, 1990).

Essa região específica do sistema nervoso central irá gerenciar respostas (hormonais, neurais etc.) que irão gerar novas “pistas” ao demais sistemas (TAKAHASHI, 2004; BROWN; AZZI, 2013). Cabe aqui uma observação de que não se trata apenas de um relógio. Não que isso já não fosse extraordinário, pois a simples observação da natureza nos mostra que o sistema é bem mais complexo. Podemos citar como exemplo a troca de pelagem do coelho que normalmente é cinza vindo a se tornar branco no início do inverno ou no deslocamento de aves para o sul um pouco antes da chegada dos meses mais frios etc (BUSSIÈRE; UNDERHILL; ALTWEGG, 2015). Dessa forma, podemos visualizar o “relógio” muito mais como um calendário, informando seus portadores não apenas as horas, mas os dias do ano, sua posição geográfica, seu hemisfério entre outras possíveis informações.

Se podemos dizer que a luz é a principal pista para o relógio central, o mesmo não pode ser dito para os relógios periféricos. Como já mencionamos, as pistas geradas pelo NSQ

irão orientar os relógios periféricos, os quais na prática, acabam acumulando informações vindas de outras fontes. Entre essas outras “pistas”, vêm sendo muito destacados os hormônios, os nutrientes provenientes da alimentação e a variação da temperatura corpórea interna (PANDA 2016; DE ASSIS; OSTER, 2021). Vale ressaltar que essas outras “pistas” atuam de maneira distinta para cada tecido periférico, pois dentro da visão de modelo federado, cada tecido tem o seu próprio set de pistas. Igualmente a outros parâmetros, a temperatura também apresenta uma flutuação dita circadiana, o que, em outras palavras, significa dizer que temos valores altos e baixos de temperatura em horas específicas do dia. Isso também ocorre para nossa pressão arterial, por exemplo. Destaca-se, ainda, que variações da temperatura ambiental irão certamente influenciar esse sistema (BUHR; YOO; TAKAHASHI, 2010; SHINOHARA *et al.*, 2017; HUSSEIN, MOLLARD E BONNEFONT, 2019).

Apesar do organismo procurar manter a temperatura dentro de determinada faixa, variações externas irão promover ajustes internos para aumentá-la ou diminuí-la. Esses ajustes precisarão ser feitos e monitorados de forma precisa, sendo que grande parte desse ajuste acaba sendo feito pelo sistema nervoso simpático (ENGELI *et al.*, 2012). No entanto, existem evidências que indicam a participação de outros sistemas no processo, como a do cardiovascular. É pertinente apontar que, já há algum tempo o coração deixou de ser visto apenas como uma bomba, impulsionando o sangue pelo organismo, ao passo que o coração como um órgão endócrino vem crescendo em importância. Muito disso vem do fato do coração ocupar uma posição estratégica: a cada instante, ele recebe inúmeras informações trazidas pelo sangue, oriundo, por sua vez, tanto da circulação sistêmica quanto da circulação pulmonar. Um trabalho realizado em camundongos ilustra de forma muito elegante um trecho desse circuito. Animais submetidos a baixas temperaturas tinham maior concentração de peptídeos natriuréticos (NPs) circulantes. Esses peptídeos atuaram no tecido gorduroso não só aumentando a termogênese, como também ativando a formação de tecido marrom (BORDICCHIA *et al.*, 2012) processo conhecido como *browning*. Porventura, essa influência direta no coração está ocorrendo em outros tecidos ou órgãos. A pergunta natural feita agora é: como o coração percebe essa variação pequena de temperatura?

Dentre os órgãos chamados “cegos” (por não receberem luz), o coração é o que mais expressa OPN4 (Projeto Encode, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=30044>), além de apresentar uma forte expressão de canais TRP (YUE *et al.*, 2015; DIAZ *et al.*, 2016;

HUGHES *et al.*, 2016). Pesquisas recentes podem explicar esse aparente paradoxo. Descobriu-se que a OPN4 pode ser ativada, além da luz, por variação de temperatura (PEREZ-CEREZALES *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2016; ROY, *et al.*, 2020). Complementando a presença da OPN4 no coração, canais TRPs também já foram relatados como presentes no órgão; entre eles, os pertencentes à família dos ativados por temperatura. A atividade da OPN4 associada a canais TRP já é fato conhecido em estimulação por luz na retina (HUGHES *et al.*, 2016). Todos esses fatos somados abriram a possibilidade de uma nova frente de estudos colocando o coração como órgão endócrino em um novo patamar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Relógio Biológico

Os organismos vivos sofreram diversas pressões seletivas desde a origem da vida, por meio, por exemplo, da evolução convergente, o que resultou no surgimento de características semelhantes em organismos de ramos filogenéticos distintos (BHADRA, *et al.*, 2017). Acredita-se que efeitos diretos da radiação ultravioleta e do dano foto-oxidativo possivelmente restringiram a fase S do ciclo celular, ou seja, a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), para o período noturno (LOWREY; TAKAHASHI, 2004). Considera-se que esse possa ter sido um mecanismo primitivo de sincronização celular. Além disso, o comportamento circadiano dos seres foi marcado principalmente pelo padrão de atividade e repouso, aparentemente sincronizado no que tange às oscilações diárias de luz e temperatura, adaptações essas que permitiram o surgimento de um novo campo da ciência, a cronobiologia.

As características apresentadas pelos seres pluricelulares estão relacionadas à capacidade de adaptação e sincronização aos ciclos ambientais de luz e temperatura, não só diários, mas também no que diz respeito às mudanças sazonais, mediante a propriedade de ajuste proporcionada pelo relógio circadiano intrínseco. Esse possui três mecanismos essenciais para se regular ao ciclo diário ambiental: (a) um mecanismo de entrada, que permite zerar o relógio mestre autossustentável através de estímulos ambientais; (b) o marcapasso circadiano intrínseco ou “relógio circadiano” e (c) um mecanismo de saída responsável por regular processos fisiológicos e comportamentais em todo o organismo (ASSIS, 2019).

Nos mamíferos, o relógio circadiano está amplamente distribuído nas células e organizado em um sistema multi oscilatório hierárquico composto por uma rede altamente unificada, comunicando-se através do relógio central que propaga sinais aos relógios periféricos e coordenando seu próprio tempo intrínseco em relação ao tempo geofísico (PARTCH; GREEN; TAKAHASHI, 2014). Todavia, se alterações nas condições ambientais em que os mamíferos estão inseridos perdurarem por dias ou semanas, o mecanismo do relógio circadiano pode reiniciar em um processo conhecido como arrastamento, o que resulta na expressão de moléculas circadianas e componentes de sinalização celular, que distribuem as informações de temporização entre células e tecidos (ASHER; SCHIBLER, 2011). Salienta-se

que recorrentes arrastes devido a desajustes circadianos podem levar a dessincronização entre o relógio central e os relógios periféricos (ECKEL-MAHAN; SASSONE-CORSI, 2013).

Portanto, o arrastamento dos osciladores circadianos central ou periféricos, nos seres humanos e em outros mamíferos, está vinculado às pistas ambientais externas, principalmente o fotoperíodo para o relógio central (DAMIOLA *et al.*, 2000; ABBOTT; QUEENER; OSTRIN, 2018), assim como a percepção da variação de temperatura ambiental, no caso dos relógios periféricos, já que o central é insensível a variações de temperatura (RUBY, 2011). Contudo, o ZT capaz de orientar os relógios periféricos também pode estar relacionado a outras pistas, entre elas a alimentação e hormônios, podendo ser tecido-específico e complexo (HUSSE; EICHELE; OSTER, 2015; PANDA, 2016).

Dessa forma, os relógios periféricos procedem singularmente em cada um de seus respectivos tecidos, impulsionando a expressão circadiana de genes específicos que estão envolvidos em uma variedade de funções fisiológicas (HUSSEIN; MOLLARD; BONNEFONT, 2019). E, quando ocorre dessincronização do relógio central frente aos relógios periféricos, resulta um quadro chamado de cronoruptura (RICHARDS; GUMZ, 2012), refletindo-se em alteração fisiológica correlacionada a diferentes disfunções, como câncer, doenças cardiovasculares, depressão, obesidade e síndrome metabólica, entre outras (GARAULET; GÓMEZ-ABELLÁN, 2014; ROENNEBERG; WEST; BECHTOLD, 2015; MERROW, 2016).

2.2 Expressão dos genes do relógio biológico

Os avanços nos estudos da biologia molecular proporcionaram a identificação dos mecanismos básicos de *feedback* autorregulatórios transcricionais e traducionais do relógio circadiano. Com efeito, para desempenhar seu caráter oscilador, o relógio biológico demonstra ser composto por uma maquinaria molecular própria, variando o metabolismo, a fisiologia e o comportamento do organismo (ECKEL-MAHAN; SASSONE-CORSI, 2013). A ritmicidade conferida pela maquinaria do relógio circadiano autônomo das células induz aos seres uma antecipação preparatória e conectada à natureza, capaz de gerar oscilações moleculares e fisiológicas em períodos de aproximadamente 24 horas (TAKAHASHI, 2017), mesmo na ausência de pistas ambientais (BROWN; KOWALSKA; DALLMANN, 2012). Dessa forma, a sincronização periódica por meio do tempo geofísico define a fase e a amplitude do relógio, caracterizando, por exemplo em mamíferos, expressões gênicas

antagônicas de alguns dos principais genes de controle circadiano como *Bmal1* e *Per1* (BROWN; KOWALSKA; DALLMANN, 2012).

Esses mecanismos estão presentes em dois dos três domínios da vida: *Eukarya* e *Bacteria*, já descritos em insetos, plantas, fungos, cianobactérias e mamíferos (HARMER; PANDA; KAY, 2001). A compreensão da base genética capaz de gerar ritmos circadianos nos organismos iniciou-se a partir do trabalho dos pesquisadores Konopka e Benzer (1971) realizado com mutantes isolados de drosófila (*Drosophila melanogaster*) em que tanto o ritmo de eclosão quanto a atividade locomotora apresentavam-se alterados.

Estudos posteriores realizados em mamíferos avaliaram as implicações fisiológicas das oscilações circadianas, elucidando que os sinais de luz provenientes do ambiente são recebidos por meio de um tipo especial de célula neuronal na retina, um subconjunto de células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs), com projeções para o núcleo NSQ (REPPERT; WEAVER, 2002), localizado em uma pequena região inferior do hipotálamo e acima do quiasma óptico cerebral, considerado o relógio central, formado por 20.000 neurônios (ANTLE; SILVER, 2005).

No momento em que a informação fótica chega à retina, a luz irá interagir com um fotopigmento, a OPN4 (ROLLAG; BERSON; PROVENCIO, 2003; BERSON; CASTRUCCI; PROVENCIO, 2010). Uma vez que as células ipRGCs expressam OPN4, o sinal luminoso é convertido através da geração de segundos mensageiros e enviado, via transmissão sináptica para as diversas projeções cerebrais e os núcleos cerebrais, ocasionando o arraste do relógio central (DOYLE *et al.*, 2006) e conseqüentemente dos periféricos (KOFUJI *et al.*, 2016), por mecanismo que iremos explorar abaixo.

A organização da transmissão sináptica de camundongo (*Mus musculus*), por exemplo, apresentam fibras monossinápticas do trato retino-hipotalâmico (RHT) que terminam diretamente nos neurônios da parte ventrolateral do NSQ, com projeções também para os folhetos intergeniculados (IGL). Assim, o NSQ recebe diversos sinais referentes ao estímulo fótico, sendo um proveniente do RHT e outro do IGL, por intermédio do trato geniculohipotalâmico (GHT), os quais fornecem informações adicionais, levando a uma resposta mais diferenciada do NSQ à luz (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010).

Desse modo, a detecção de luz de comprimento de onda curto, por volta de 488 nm, proporcionado pela OPN4 nas células ipRGCs da retina de mamíferos ocasiona o influxo de

cálcio (Ca^{2+}) e sódio (Na^+) via canais iônicos de potencial receptor transitório (TRP) do tipo TRPC6 e TRPC7, despolarizando a membrana celular para transmitir a informação elétrica (POLETINI *et al.*, 2015a). Essa informação é transmitida pelo RHT através da liberação de glutamato e PACAP, tal qual NPY e GABA via GHT, que convertem a informação elétrica em informação química. O estímulo luminoso gera a secreção de GABA pelo NSQ, agindo de forma inibitória e interrompendo a via de sinalização secundária. Porém, no escuro, a secreção de GABA não ocorre, o que torna ativa a via de secreção secundária, ocasionando entre outras coisas, por exemplo, a secreção de melatonina. Dessa forma, é possível que ocorra alteração da fase de expressão dos genes do relógio biológico em um dos subconjuntos de neurônios do NSQ (REPPERT; WEAVER, 2002; DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010).

Portanto, a nova fase é reestabelecida rapidamente em todos os neurônios do NSQ, que, por fim, sinalizará o estímulo claro-escuro para quase todas as células do organismo de um mamífero (WELSH; TAKAHASHI; KAY, 2009), conforme esquematizado na Figura 1, uma vez que os genes envolvidos no mecanismo intracelular do relógio do NSQ são ritmicamente expressos em outras áreas do cérebro e em órgãos periféricos (RICHARDS; GUMZ, 2012).

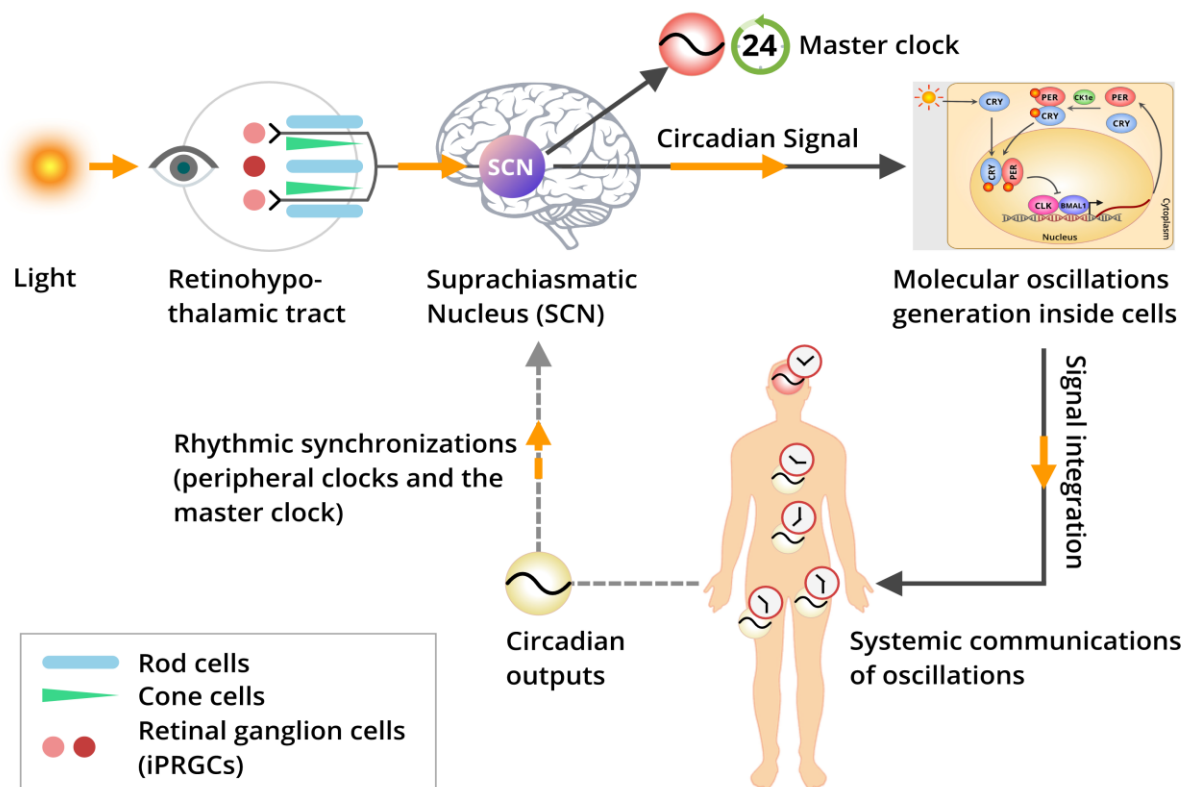


Figura 1. Os sistemas circadianos dos mamíferos são mais sensíveis aos ciclos de luz e escuridão por volta das 24 horas do dia. A luz serve como o ZT externo predominante para acompanhar os ritmos circadianos dos mamíferos. Usualmente, os sinais fóticos das fontes de luz são recebidos pelos ipRGCs e chegam o relógio mestre, localizado no SCN sob o hipotálamo do cérebro via RHT. No NSQ, as oscilações primárias são produzidas e transmitidas a nível molecular celular para os tecidos periféricos distais em todo o corpo do organismo. Assim, as diferentes saídas circadianas específicas do tecido são produzidas. Além disso, os ritmos periféricos regulados localmente são integrados para manter a homeostase circadiana, mantendo a sincronização com o relógio mestre. Fonte: CHOWDHURY *et al.*, 2019.

Segundo Reppert e Weaver (2002), os osciladores circadianos autossustentáveis presentes no NSQ e em outros tecidos são coordenados por mecanismos biomoleculares. O aparato do relógio intracelular envolve a interação de alças de retroalimentação transcricional, traducional e modificações pós-traducionais, positivas e negativas, que direcionam ritmos recorrentes nos níveis de ácido ribonucleico (RNA) e proteína dos principais componentes do relógio. A unidade básica essencial para a função do relógio biológico é composta, principalmente, por dois fatores básicos positivos de transcrição que contêm *basic helix-loop-helix* (bHLH)-PAS (*period-Arnt-singleminded*). Esses fatores são denominados *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* (CLOCK) e *Brain and Muscle Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein* (BMAL1) (ZHANG; KAY, 2010).

Por conseguinte, com a transcrição rítmica do gene *Bmal1* e contínua do gene *Clock*, e a tradução de suas respectivas proteínas no citoplasma, BMAL1 e CLOCK serão capazes de formar heterodímeros e migrar de volta para o núcleo da célula. O heterodímero CLOCK:BMAL1 irá se ligar às sequências E-boxes dos promotores dos genes *Period* (*Per*; homólogos 1, 2 e 3) e *Cryptochrome* (*Cry*; homólogos 1 e 2) para estimular a transcrição desses genes (ASTIZ; HEYDE; OSTER, 2019) e, assim, impulsionar a transcrição positiva do bHLH-PAS (REPERT; WEAVER, 2002). No citoplasma das células, as proteínas produzidas, PER e CRY, irão formar heterodímeros e migrar para o núcleo celular a fim de bloquearem a ação de CLOCK:BMAL1, promovendo o braço negativo transcricional canônico da alça bHLH-PAS (PADMANABHAN *et al.*, 2012).

Nessa perspectiva, a principal regulação do *feedback* negativo ocorre através da fosforilação das proteínas PER e CRY pela proteína quinase ativada por monofosfato de

adenosina (AMPK) e caseína quinase 1 (CKI ϵ) no citoplasma, sendo, por fim, ubiquitinadas e degradadas nos proteossomos; e, quando não são suficientes para inibir o CLOCK:BMAL1, um novo ciclo começa (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010). Além das proteínas PER e CRY, outras proteínas que compõem circuitos acessórios são capazes de modular a atividade da alça bHLH-PAS, como a proteína de ligação à D-box (DBP), além da ativação dos receptores órfãos nucleares relacionados ao retinóide (ROR) e dos receptores da subfamília 1 do receptor nuclear, grupo D, membro 1 (NR1D1; REV-ERB) (PREITNER *et al.*, 2002).

Vale ainda ressaltar que a transcrição de *Bmal1* é regulada negativamente por REV-ERB α , um de seus alvos genéticos, resultando no controle da quantidade de BMAL1 disponível para ligação à CLOCK (HASTINGS; MAYWOOD; BRANCACCIO, 2019). Contudo, ROR exerce efeitos opostos a REV-ERB α na região promotora de *Bmal1*, conforme ilustrado na Figura 2.

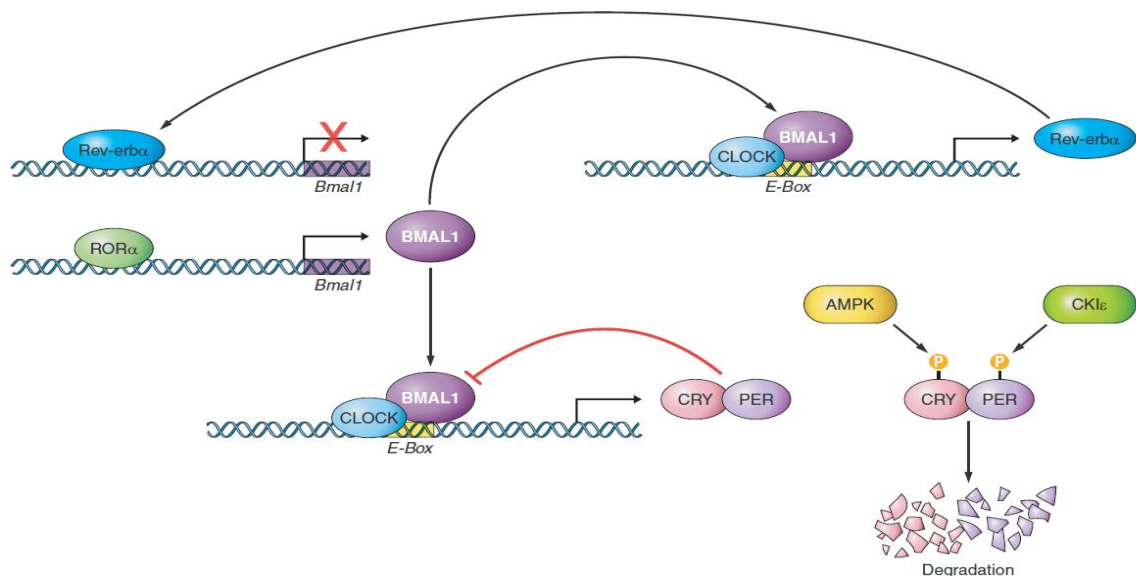


Figura 2. Ilustração do ciclo de retroalimentação transcricional/traducional positivo e negativo básico do relógio circadiano. Alças externas e modificações pós-traducionais, como a fosforilação, contribuem para a manutenção dos principais osciladores. Fonte: ECKEL-MAHAN e SASSONE-CORSI (2013).

Segundo Dibner, Schibler e Albrecht (2010), as diversas vias eferentes de comunicações rítmicas incluem as conexões neuronais, os sinais endócrinos e os ritmos de temperatura corporal e abrangem todos os órgãos, tecidos e células; auxiliando, consequentemente, na coordenação do tempo circadiano, da fisiologia e do comportamento.

Ademais, a sincronização cerebral possui coordenação diferente dos mecanismos de controle periféricos devido à barreira hematoencefálica. Conforme exposto neste mesmo trabalho, os mecanismos de sincronização que coordenam órgãos e tecidos periféricos não têm necessariamente o mesmo efeito no cérebro.

Seguindo essa linha, verifica-se que o NSQ funciona como marcapasso central e sincronizador dos relógios periféricos, transmitindo o sinal de cronometragem intrínseco por intermédio de hormônios, metabólitos circulares e por vias eferentes, com terminações em uma série de sítios cerebrais como: o núcleo arqueado (NAQ), o hipotálamo dorsomedial (HDM), o hipotálamo lateral (HL), o hipotálamo ventromedial (HVM) e o núcleo paraventricular (NPV) (HIRAYAMA; MURE; PANDA, 2018). Essas estruturas exibem expressão rítmica de genes circadianos e respondem, por exemplo, a mecanismos de controle da ingestão alimentar, à regulação da pressão arterial (BUIJS *et al.*, 2017), à atividade-reposo e a sono-vigília para, assim, ocasionar o arraste dos osciladores periféricos de forma indireta (REINKE; ASHER, 2019).

No entanto, há muito o que se pesquisar a respeito dos mecanismos que distinguem a função oscilatória desempenhada pelo relógio central no NSQ influenciando os relógios periféricos. Pesquisas têm demonstrado como os ciclos de temperatura ambiental são capazes de regular a amplitude da expressão gênica circadiana, promovendo o arrastamento de fase em células das regiões ventrolateral e dorsomedial do NSQ. A efeito de exemplo, cita-se a investigação dos mecanismos pós-traducionais das proteínas do relógio que sugere a participação de muitas pistas ambientais, capazes de redefinirem a ritmicidade das células circadianas. Entre elas a variação de temperatura, como veremos a seguir.

Há relatos na literatura que demonstram que os tecidos periféricos podem usar diferentes pistas para o seu arrastamento, e muitos desses estímulos de redefinição parecem envolver mudanças na temperatura corporal ou podem convergir nas vias de resposta à temperatura; por exemplo, a temperatura corporal dos mamíferos exhibe flutuações circadianas de 1 °C a 4 °C, a depender da espécie (REFINETTI; MENAKER, 1992; BROWN *et al.*, 2002). E, independentemente do tipo de tecido estudado, regiões isoladas do NSQ ou tecido periférico, a reconfiguração sensível à temperatura demonstrou ser uma propriedade autônoma da célula (BUHR; YOO; TAKAHASHI, 2010). Para mais, evidências na literatura demonstraram que os tecidos periféricos podem usar diferentes pistas para o seu arrastamento,

e muitos desses estímulos de redefinição parecem envolver mudanças na temperatura corporal ou podem convergir nas vias de resposta à temperatura (POLETINI *et al.*, 2015b).

Somado a isso, consoante a Hussein, Mollard e Bonnefont (2019), a complexidade da interação entre ritmicidade circadiana no NSQ e temperatura pode parecer estar em contradição entre a conhecida resistência do NSQ à variação de temperatura e a sua sensibilidade imediata a ela, pois o choque térmico de calor pode ser um candidato para mediar o efeito da temperatura no ritmo circadiano no disparo dos potenciais de ação em células do NSQ. Não obstante, outros relatos na literatura comprovaram que ciclos de 1,5 °C de temperatura e pulsos de 34 a 37 °C por 2 horas induzem atrasos de fase no NSQ isolado de ratos (BUHR; YOO; TAKAHASHI, 2010). Ademais, Brown *et al.* (2002) propuseram que em mamíferos a resistência ao arrastamento da temperatura é uma propriedade da comunicação celular dentro do NSQ, pois, quando a comunicação entre as células do NSQ é bloqueada, a sensibilidade à temperatura é observada.

Também foi comprovado que a exposição de camundongos adultos a 37°C em escuridão constante é capaz de propiciar avanço de fase no fígado, porém sem influenciar a expressão de genes do relógio no NSQ (WU; OUYANG; WANG, 2017), uma vez que mudanças de temperatura semelhantes ao ritmo circadiano da temperatura corporal possivelmente estimula a reinicialização em tecidos periféricos (BROWN; PENDERGAST; YAMAZAKI, 2019). Dessa forma, a influência da temperatura sobre o ciclo circadiano demonstra complexidade tanto nos neurônios do NSQ quanto no relógio periférico perante os estímulos térmicos ambientais, assim como perante os mecanismos responsáveis por prover a sensibilidade térmica.

Segundo relatos de Brown *et al.* (2002), ciclos de 12 horas com 4 °C a menos na temperatura padrão (12h 37°C e 12h 33°C) seriam capazes de agirem como ZT para a expressão de genes circadianos em fibroblastos RAT1. Os dados coletados por esses pesquisadores elucidaram uma fraca indução de ritmicidade na expressão gênica com pequena, mas significativa, amplitude circadiana, só que em fases opostas. Esses resultados foram atribuídos à potencial reinicialização circadiana, embora vários sinais durante dias distintos se fizeram necessários para induzir ritmicidade significativa. Assim, o NSQ impulsiona os ritmos circadianos, tanto através da captação de luz quanto pela temperatura corporal para conferir controle preciso de fase e estabilidade aos sistemas fisiológicos amplamente distribuídos (REPPERT; WEAVER, 2002).

2.3 Opsinas e o ciclo circadiano

A adaptação dos vertebrados frente à variação de luz culminou na seleção de fotorreceptores que desempenham estratégias adaptativas oriundas da evolução. Nesse contexto, as opsinas participam de diversos processos - incluindo a regulação dos ritmos circadianos, a fotofobia, a síntese de melatonina e a regulação de sono-vigília (TSAI *et al.*, 2009) - que foram atribuídos, a princípio, às respostas a OPN4 em células ipRGCs não formadoras de imagem e dependentes de luz (XUE *et al.*, 2011).

As opsinas são proteínas fotorreceptoras que, quando expressas por um neurônio, tornam a membrana plasmática dessas células sensível à luz. Elas são constituídas pela fusão de um domínio efetor acoplado a um domínio fotorreceptor, permitindo, através do disparo de segundos mensageiros específicos, a despolarização da membrana plasmática em células excitáveis que expressam essa opsina. Destaca-se também que opsinas como receptores estão acoplados às proteínas G que ativam vias de transdução de sinais no interior da célula (LAMMEL; DÖLEN; MALENKA, 2016).

Dessa forma, a classificação das opsinas segue a natureza do acoplamento à proteína G, estando distribuídas em algumas famílias, sendo que, dentre elas, as mais estudadas são: (a) opsinas visuais de vertebrados (OPN1 e OPN2), proteína Gt; (b) encefalopsinas/opsinas de múltiplos tecidos em teleosteo (OPN3, tmt), proteína Gi/G0; (c) OPN4, proteína Gq e (d) neuropsina (OPN5), proteína Gi (POLETINI *et al.*, 2015a).

Relatos na literatura demonstram que a expressão das opsinas OPN1 e OPN2 em cones e bastonetes, é capaz de mediar a penumbra e a visão de cores (YAU; HARDIE, 2009), enquanto a OPN4 é expressa nas células ipRGCs, responsável pela regulação do relógio central. Já as opsinas OPN3 e OPN5 foram relatadas com expressão em tecido adiposo e pele murina, viáveis a utilizar pistas fóticas nesses tecidos para arrastamento circadiano (NISSILÄ *et al.*, 2012; BUHR *et al.*, 2019). Portanto, as opsinas citadas foram identificadas em diversos tecidos de mamíferos e de outros seres vivos, sendo amplamente distribuídas tanto em tecido central, a exemplo do córtex cerebral e NPV (NISSILÄ *et al.*, 2012), quanto periférico, como a pele (TSUTSUMI *et al.*, 2009), os melanócitos (DE ASSIS *et al.*, 2016), a retina (YAU; HARDIE, 2009), os tecidos cardíaco e adiposo (NISSILÄ *et al.*, 2012) e a vasculatura pulmonar (ORTIZ *et al.*, 2018).

Inicialmente identificada em melanóforos dérmicos fotossensíveis de *Xenopus laevis*, a OPN4 foi posteriormente identificada em um grupo de fotorreceptores da retina (PROVENCIO *et al.*, 1998). Posteriormente, outras OPN4s foram descritas até os dias de hoje, apresentando variantes genéticas semelhantes a de mamíferos (OPN4m) e não mamíferos (OPN4x) (CHAURASIA *et al.*, 2005), tais como *OPN4x1*, *OPN4x2*, *OPN4m1*, *OPN4m2* e *OPN4m3*, identificadas a partir de pesquisas realizadas em peixes teleósteos (DAVIES *et al.*, 2011).

A OPN4 é uma proteína transmembrânica contendo sete domínios transmembrânicos com três domínios intracelulares e três extracelulares, com sensibilidade máxima à luz de baixo comprimento de onda, próximo a 488 nm. A transdução do sinal ocorre na parte transmembrânica da proteína, responsável pela ligação ao cromóforo 11-*cis*-retinal que será isomerizado pela luz em *all-trans*-retinaldeído (DOYLE *et al.*, 2006).

Os principais passos da cascata de transdução de ativação consistem na estimulação da OPN4 pela luz nas células ipRGCs e, conseqüentemente, estimulação da enzima efetora fosfolipase C (PLC). A ativação da PLC é resultante da ativação da proteína G do tipo $G_{q/11e}$ que leva à clivagem de fosfolípidios de membrana em 1,4,5-trisfosfato de inositol solúvel (IP_3) e diacilglicerol (DAG). IP_3 comanda a abertura de canais de Ca^{2+} do retículo, promovendo a liberação de Ca^{2+} para o citoplasma. DAG e PIP2 ligam-se aos canais TRPC6 e TRPC7 que se abrem originando uma resposta despolarizante na membrana celular frente ao estímulo de luz (ISOLDI *et al.*, 2005; SONODA *et al.*, 2019).

Vale ressaltar que a sequência peptídica de OPN4, detectada em diversos tecidos periféricos de mamíferos (MORAES *et al.*, 2021) possui maior homologia com a de invertebrados (PROVENCIO *et al.*, 1998) e, por analogia, apresenta semelhanças quanto a cascata de fototransdução rabdomérica, em contrapartida aos bastonetes e cones que utilizam transducina e fosfodiesterase (PDE) (PANDA *et al.*, 2005).

2.4 Opsinas e interações com canais TRPs para percepção de temperatura

A descoberta da expressão de OPN4 em células ipRGCs possibilitou a compreensão do mecanismo de detecção de luz, sem formação de imagem, abrindo caminhos para uma gama de conhecimento sobre sua atuação fisiológica. Além disso, há indícios de que a variação da temperatura pode ser um importante *zeitgeber* para os tecidos periféricos de mamíferos, possivelmente envolvendo a participação de opsinas na percepção desse estímulo ambiental

(MORAES *et al.*, 2017a; BUHR *et al.*, 2019). É importante ressaltar que os mecanismos de retroalimentação do maquinário do relógio biológico necessitam da via de transdução de OPN4 e, provavelmente, de outras opsinas para sincronizar as células frente às pistas ambientais de luz e de temperatura, usadas como pistas seletivas simultâneas. Os primeiros relatos que confirmam essa hipótese vieram de estudos realizados em diferentes conjuntos neuronais centrais a partir de modelos genéticos da mutação de transdução visual em drosófila (PICOT *et al.*, 2009).

Shen e colaboradores (2011) observaram que larvas de drosófila mantidas em escuridão constante e sem OPN2 demonstravam perda da capacidade de discriminar temperaturas. Interessantemente, o comportamento termostático retornava quando as larvas eram transfectadas com OPN4. Isso pode indicar que, aparentemente, os sistemas de fotorrecepção/termorrecepção possam ter coevoluído, demonstrando que a sinalização do relógio circadiano de mamífero compartilharia os mesmos componentes descritos nos invertebrados, possivelmente por meio da interação dos canais TRPs e OPN2/OPN4 para gerar ritmos circadianos (YOUNG *et al.*, 2001).

Curiosamente, a participação de opsinas na percepção de temperatura também foi relatada em outras espécies. Um dos integrantes da equipe que colaboramos demonstrou de forma pioneira o envolvimento da OPN4 em respostas termossensoras em células de mamíferos, trazendo a discussão sobre opsinas para além de uma atuação como fotorreceptora. Nesse estudo, Moraes e colaboradores (2017a) demonstraram que células sincronizadas de melanócitos de camundongo em cultura em escuro constante, expostas a um pulso de calor a 39,5 °C por 1 h, apresentaram aumento nos níveis de expressão de *Per1* imediatamente após o estímulo em relação ao controle mantido a 37 °C. A inibição com antagonista para OPN4 ou seu silenciamento com RNA de interferência realizados sob as mesmas condições, reverteram o aumento de expressão de *Per1* observada anteriormente.

Um outro componente celular que devemos levar em consideração são os canais TRPs. A família desses canais possui a capacidade de detectar uma grande variedade de sensações fisiológicas, como quimiossensibilidade, nocicepção, mecanossensação, incluindo detecção da variação de temperatura (VRIENS *et al.*, 2014). Foi elucidado, em experimentos com drosófila, que, durante os ciclos de variação de temperatura ambiental, a manutenção dos padrões de atividade para sincronizar seus ritmos locomotores é dependente da atividade do canal TRPA1 (LEE; MONTELL, 2013).

Os canais TRPs foram identificados e caracterizados em uma ampla variedade de organismos. Os identificados em mamíferos foram agrupados em famílias, tais como, TRPA (tipo de anquirina), TRPC (clássica ou canônica), TRPM (melastatina), TRPP (policisteína), TRPML (mucolipina), TRPN (sem potencial mecanorreceptor C (NOMPC)) e TRPV (vanilóide) (FLOCKERZI; NILIUS, 2014). Dentre os membros da família TRP, os responsivos aos estímulos térmicos foram selecionados para uma subfamília chamada de termo-TRPs, composta pelos canais TRPV (1-4), TRPM (2, 4, 5 e 8), TRPC5 e TRPA1 (SAITO; TOMINAGA, 2015).

É importante destacar que os canais da subfamília termo-TRPs possuem estrutura semelhantes aos canais ativados por voltagem, caracterizados como homotetrâmeros, em que cada monômero contém seis segmentos intramembranar e dois desses formam um laço entre si para compor o poro catiônico (POLETINI *et al.*, 2015b). Ademais, a subfamília termo-TRP compartilha os mesmos mecanismos de detecção de temperatura: (a) uma vez ativados, todos os canais geram uma corrente catiônica não seletiva, resultando em despolarização da membrana; (b) todos os membros são expressos no sistema nervoso periférico, e (c) são ativados dentro de faixa estreita de temperatura. Por exemplo, os canais TRPA1 e TRPM8 são responsivos em baixas temperaturas, abaixo de 17 °C e abaixo de 25 °C, respectivamente, enquanto ao canal TRPV1 é responsivo a alta temperatura, acima de 42 °C (CATERINA *et al.*, 1999). Curiosamente, Suh e Hille (2008) propuseram a existência de um sítio de ligação para o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) em canais TRPs que foram expressos em oócitos de *X. laevis*. Os mesmos autores também demonstraram que baixas temperaturas, entre 10 e 25°C, eram capazes de ativar o canal TRPM8 por sensibilizá-lo ao PIP₂, o qual acaba funcionando relativamente com um cofator para o canal TRP.

De fato, grande parte dos canais de TRP é regulada ou ativada por PIP₂ como descrito acima para a sinalização de OPN4. De acordo com o trabalho de revisão realizado por Shen *et al.* (2011) outros efeitos estão associados ao PIP₂: (a) nos canais TRPVs, PIP₂ ativa TRPV5, cessando inibição por Mg²⁺, induz a entrada de Ca²⁺ para inativar TRPV6 e é responsável por ativar TRPV1; (b) nos canais TRPM, PIP₂ regula as atividades dos canais TRPM (2, 4 e 5), alterando a dependência ou a afinidade de Ca²⁺, e ativa TRPM8 em baixa temperatura, e (c) modula TRPA1, evitando dessensibilização. Curiosamente, observa-se uma expressão elevada de OPN4 e de diferentes membros da família TRP (TRPC1, C3-7, TRPV1-V4, TRPM4, M5, M7 e TRPP2/1) no coração, apesar do mesmo não receber luz, sendo assim considerado um órgão “cego”.

2.5 O coração e sua relação com o relógio biológico, opsinas e temperatura

O sistema cardiovascular é responsável por fornecer oxigênio e nutrientes a todo o corpo e pelo transporte de resíduos para os órgãos excretores. O coração dos vertebrados é composto por (a) endocárdio, células endoteliais que mantêm contato com o fluxo sanguíneo; (b) miocárdio, músculo responsável pelas contrações do coração e (c) epicárdio, lâmina de tecido conjuntivo denso revestido externamente por um epitélio pavimentoso simples. O miocárdio é composto pelos cardiomiócitos, fibroblastos intracardíacos e células do estroma, sendo nutrido pela vasculatura coronária (ANDRÉS-DELGADO; MERCADER, 2016).

Segundo pesquisas realizadas com transcriptoma e proteômica de tecido cardíaco de camundongos, verificou-se que aproximadamente 13% dos genes e 8% das proteínas são rítmicas (DURGAN *et al.*, 2011b). O cruzamento de dados transcriptômicos e metabólicos indicaram que os cardiomiócitos de camundongos atravessam, diária e sequencialmente, uma fase de geração de trifosfato de adenosina (ATP) para a função contrátil durante a fase ativa noturna, seguida por uma fase de crescimento/reparo no período diurno (DURGAN *et al.*, 2011a).

Ainda, dados epidemiológicos evidenciam que o sistema renina-angiotensina-aldosterona, o infarto do miocárdio, as arritmias ventriculares graves e a morte cardíaca súbita em humanos possuem robusta ritmicidade circadiana. Isso pode ser constatado, por exemplo, na associação entre a incidência de infarto do miocárdio e as primeiras horas da manhã em função da variação circadiana no sistema nervoso autônomo (CRNKO *et al.*, 2019). As oscilações circadianas demonstraram influências na função dos cardiomiócitos, mesmo em corações *ex vivo*, sugerindo que a dependência entre as funções cardíacas específicas e a hora do dia são mediadas por mecanismos intrínsecos (PODOBED *et al.*, 2014).

Da mesma forma, os parâmetros fisiológicos cardíacos como a frequência cardíaca, a pressão arterial e a função endotelial vascular possuem ritmicidade circadiana, apresentando atividade fisiológica cíclica (HSIEH; ZHANG; JAIN, 2017). Somado a isso, a pressão arterial apresenta pico no meio da manhã e depressão à noite, demonstrando que tanto a atividade cíclica quanto fatores humorais e tônus autônomo são intrinsecamente regulados (SCHEER *et al.*, 2010).

Ademais, foi bem documentado que lesões seletivas no NSQ de roedores causam supressão ou atenuação dos ritmos diários da pressão arterial, da frequência cardíaca, da

atividade locomotora e da temperatura corporal, comprovando que são endógenos (SAPER *et al.*, 2005). Contudo, os mecanismos pelos quais os sinais rítmicos oriundos do NSQ são transmitidos para o sistema cardiovascular, gerando ritmo diário dos níveis pressóricos podem ter origem tanto do sistema nervoso autônomo quanto endócrino (KOHSAKA *et al.*, 2012). O núcleo hipotálamo medial (NHM) contribui direta ou indiretamente ao receber considerável parte do NSQ eferente e se projetar para várias áreas neuronais que estão envolvidas na regulação cardiovascular, porém ainda não está claro quais são as vias descendentes que medeiam o sinal de temporização do NSQ para os tecidos cardiovasculares (SASSE *et al.*, 2007).

Intrigantemente, a funcionalidade do tecido cardíaco depende da cascata de sinalização conferida pela proteína G_q , tanto em condições fisiologia quanto em algumas condições patológicas. A ativação dos receptores acoplados a proteína G_q nos cardiomiócitos foi documentada no envolvimento da iniciação e regulação da atividade elétrica espontânea por intermédio do segundo mensageiro IP_3 para liberação cíclica de Ca^{2+} intracelular (KOCKSKÄMPER *et al.*, 2008). Problemas no gerenciamento do Ca^{2+} intracelular estão diretamente ligados à geração de arritmias atriais e ventriculares (YUE *et al.*, 2015).

Também há relatos na literatura explanando a atuação de canais TRPs na funcionalidade cardíaca em várias células excitáveis e não excitáveis. Dentre os vários canais permeáveis a Ca^{2+} descritos no coração, os canais TRPs contribuem para o influxo de Ca^{2+} , além de serem amplamente distribuídos no sistema cardiovascular e estarem associados a muitas doenças cardiovasculares, como fibrose miocárdica, hipertrofia cardíaca e arritmias (ZHONG *et al.*, 2018). Nesse contexto, diversos estudos avaliaram a atuação dos canais TRPs no influxo de Ca^{2+} , por exemplo, demonstrou-se que um alto influxo de Ca^{2+} dependente de estiramento em células distróficas necessita, em cardiomiócitos de camundongo, de canais TRPC1, TRPC6 e TRPV2, sendo o último associado aos mecanismos moleculares de aumento da contratilidade dos cardiomiócitos (AGUETTAZ *et al.*, 2016). Ademais, foi relatado que o TRPM4 promove o ajuste da quantidade de influxo de Ca^{2+} nos cardiomiócitos de camundongos por meio de canais de Ca^{2+} operados por armazenamento após estimulação crônica de angiotensina-II – aponta-se que a remoção seletiva de TRPM4 do coração ocasionou aumento do crescimento hipertrófico, sugerindo um papel protetor do TRPM4 (KECSKÉS *et al.*, 2015).

Outros relatos sobre o papel protetor desempenhado pelos canais TRPs em tecido cardíaco também foram reportados, especificamente nos canais termossensíveis ativados por baixas temperaturas como TRPA1 (17 °C), TRPC5 (20 °C) e TRPM8 (25 °C), que, curiosamente, compartilham algumas propriedades. Destaca-se o fato de a ativação do canal TRPM8 ser capaz de inibir o estresse oxidativo (BAŞ; NAZIROĞLU; PECZE, 2019). Ainda, segundo Cheng *et al.* (2019), a isquemia miocárdica leva a danos ao coração como apoptose e morte celular, e um dos tratamentos é a reperfusão miocárdica. Contudo, a restauração do suprimento sanguíneo pode por si mesma induzir à morte dos cardiomiócitos, a qual é conhecida como lesão de isquemia/reperfusão miocárdica. Como o estresse oxidativo é uma das principais causas desse tipo de lesão, a ativação do canal TRPM8 pode fornecer efeitos cardioprotetores por esse mecanismo. Vale ressaltar que, também segundo os autores, entre os três canais TRPs sensíveis ao frio supracitados, a temperatura de ativação do TRPM8 é mais próxima à temperatura corporal normal e a cardioproteção fornecida pela reperfusão hipotérmica, capaz de ativar esses canais TRPs, demonstrou-se atenuada frente ao bloqueio por antagonista do canal TRPM8.

Em adição, os canais TRPs desempenham um papel essencial na contração e no relaxamento, assim como na proliferação, diferenciação, fisiopatologia cardíaca e nas doenças hereditárias do sistema cardiovascular (ABRAMOWITZ; BIRNBAUMER, 2009; SULLIVAN; EARLEY, 2013). No tecido cardíaco, os mecanismos de vasorelaxamento de células endoteliais da aorta primária foram menores quando induzidos por carbacol - um agonista muscarínico resistente à hidrólise por acetilcolinesterase - em camundongos TRPC1 e TRPC3 nocautes. Houve também uma concomitante diminuição de influxo de Ca^{2+} , comprovando que os canais TRPC1 e TRPC3 participam do vasorelaxamento da aorta e do influxo de Ca^{2+} (POBLETE *et al.*, 2005). Além disso, a ativação do TRPV1 induz vasodilatação pela produção de óxido nítrico (WANG; WANG, 2005) e possui atuação protetora contra estresse isquêmico em corações de camundongos, sendo que sua exclusão prejudica a recuperação pós-isquêmica em coração isolado perfundido (FU *et al.*, 2018).

2.6 Peptídeos natriuréticos produzidos pelo coração

Em 1981, de Bold e colaboradores (1981) demonstraram que extratos atriais eram capazes de promover redução da pressão arterial através de um componente que estimulava a secreção renal de Na^+ e água, descobrindo, assim, o primeiro peptídeo natriurético (NP). Os principais locais de produção dos NPs são os tecidos cardíacos, respondendo ao estiramento

mecânico da parede atrial e da parede do ventrículo devido à pressão transmural ou sobrecarga de volume. Além da produção cardíaca, outros tecidos, como cerebrais e renais, também produzem NPs, os quais atuam significativamente no organismo dos mamíferos de forma autócrina, parácrina e endócrina (KERKELÄ; ULVILA; MAGGA, 2015).

A família dos NPs é composta por três membros, que são localizados em diferentes tecidos de mamíferos: (a) o peptídeo natriurético atrial (ANP), que foi identificado nos grânulos atriais, em que é principalmente produzido e armazenado, e possui atividade natriurética, diurética e/ou relaxante quando liberado dos cardiomiócitos atriais (NISHIKIMI *et al.*, 2009); (b) o peptídeo natriurético do tipo B (BNP), o qual foi o segundo membro a ser descoberto, sendo produzido e armazenado nos grânulos atriais e ventriculares, e, em caso de pressão transmural ou sobrecarga de volume, sua secreção é acionada no ventrículo via fator de transcrição *GATA4* (SANGARALINGHAM *et al.*, 2011); (c) o peptídeo natriurético do tipo C (CNP), o último membro da família encontrado em extratos cerebrais, sintetizado no átrio, ventrículo, rim, condrócitos e endotélio, e que possui efeitos de crescimento, antifibróticos e a capacidade de relaxamento da musculatura lisa (POTTER *et al.*, 2009).

Todos os NPs são sintetizados como pré-pró-hormônios, variando para cada um a quantidade de aminoácidos que os compõem, apesar da estrutura de aminoácidos primários ser semelhante para todos os membros, contendo um anel dissulfeto com dezessete resíduos, e de serem provenientes de genes distintos (YAN *et al.*, 2000). O preproANP possui 151 aminoácidos em sua cadeia polipeptídica, e os 25 primeiros constituem uma sequência de sinal que será clivada para produzir o proANP com 126 aminoácidos, sendo essa a principal forma armazenada nos grânulos atriais e, quando liberado, sofre clivagem pela corina, uma serina protease semelhante à tripsina, responsável por sua ativação (WONG; GUO; ZHANG, 2017). A liberação dos grânulos atriais é estimulada pelo aumento do volume intravascular, ocasionando o estiramento da parede atrial e liberando, assim, o ANP para ser distribuído para os órgãos-alvo através da circulação (FU *et al.*, 2018).

Quanto ao BNP, o preproBNP possui cadeia polipeptídica de 134 aminoácidos e uma sequência sinal de 26 aminoácidos que será clivada para produzir o proBNP com 108 aminoácidos (CLERICO; VITTORINI; PASSINO, 2012). As peptidases responsáveis por clivar e ativar o proBNP são a furina e a corina, e a sua liberação nos grânulos atriais e ventriculares normais ocorre em menor proporção em relação ao ANP (GLEZEVA *et al.*, 2013). O BNP também desempenha importantes papéis natriurético, diurético e vasodilatador,

além de atuar na modulação das reações imunológica e inflamatória (SCHWACHTGEN *et al.*, 2005). Sua função na embriogênese cardíaca humana está correlacionado a altos níveis plasmáticos no nascimento e na diminuição progressiva até se estabilizar por volta dos dez anos de idade (POTTER *et al.*, 2009).

Por último, o CNP é produzido e secretado em células endoteliais vasculares, estimulado pelo fator transformador de crescimento – β ; possui 126 aminoácidos em sua forma preproCNP, que sofrerá a remoção de 23 aminoácidos de peptídeo sinal para produzir o proCNP com 103 aminoácidos (YASODA *et al.*, 2009). A furina é a responsável por clivar e ativar o proCNP, mas seu processamento de clivagem gera dois subprodutos equipotentes: o CNP-53, que será, então, clivado em CNP-22, e respectivamente equipotentes (MANGIAFICO *et al.*, 2013). A predominância do CNP-53 se dá no coração, endotélio e cérebro, enquanto o CNP-22 é mais presente no líquido cefalorraquidiano e no plasma (FU *et al.*, 2018).

Os receptores dos NPs (NPRs) também são amplamente distribuídos no organismo e possuem regiões de ligação extracelular, uma de guanilil ciclase (GC) intracelular, com exceção para NPRC, e uma região de proteína quinase intracelular (MISONO, 2002). O receptor de peptídeo natriurético A (GC-A ou NPR-A) é encontrado nos pulmões, adrenais, rins, tecido adiposo, íleo terminal, cardiomiócitos e aorta (ABBEY; POTTER, 2002), enquanto o receptor de peptídeo natriurético B (GC-B ou NPR-B) está principalmente presente nos fibroblastos e cardiomiócitos, e o receptor de peptídeo natriurético C (GC-C ou receptor de depuração ou NPR-C) no átrio, aorta, cardiomiócitos, veia, córtex cerebral, pulmão, adrenal e rim (THEILIG; WU, 2015).

Os NPs exercem suas ações ligando-se aos receptores GCs, que são proteínas transmembrânicas que catalisam a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), o qual, por sua vez, atuará como segundo mensageiro para ativar proteína quinase dependente de cGMP (PKG) e PDE, e, assim, regular canais de íons, fosforilação de proteínas, translocação nuclear e expressão gênica (POTTER, 2005). O NPRC é um receptor depurador, auxiliando na remoção dos NPs que se ligarem nele (RUBATTU *et al.*, 2019), conforme ilustrado na Figura 3.

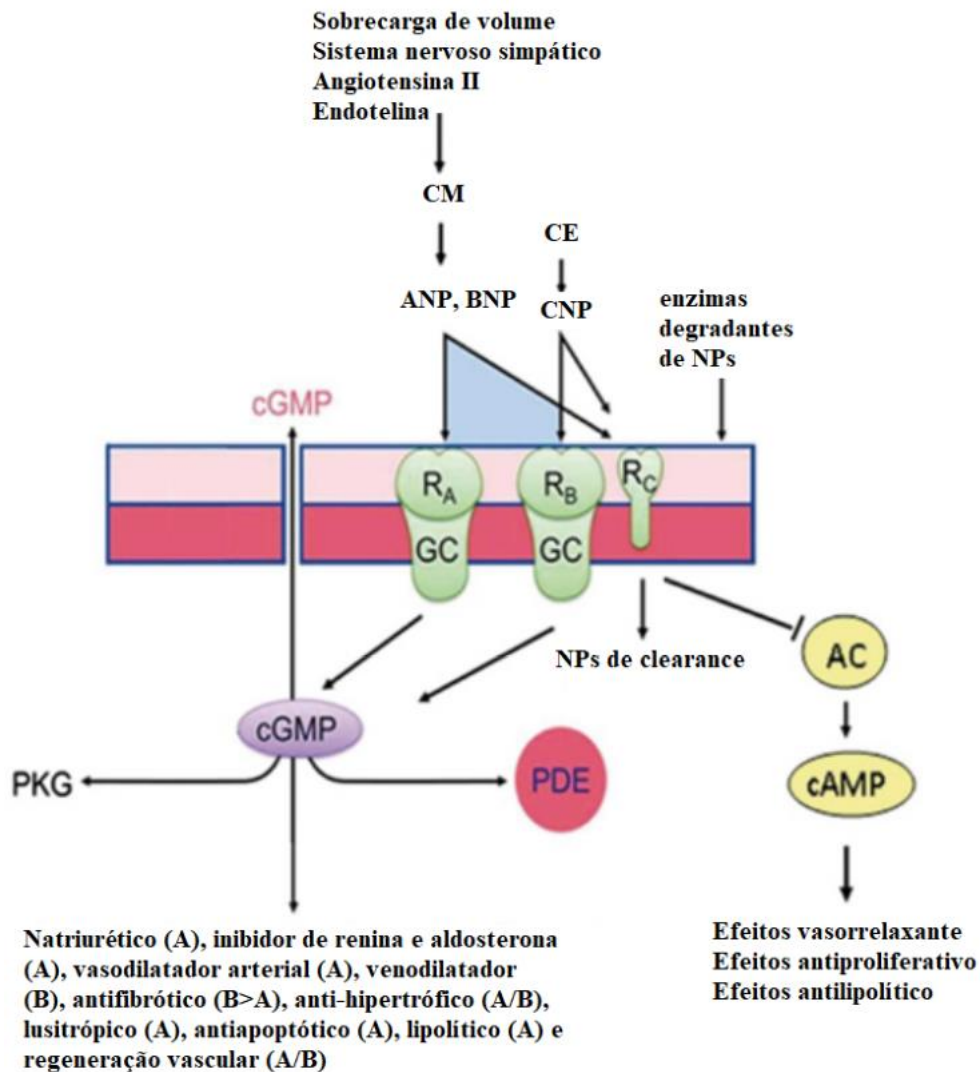


Figura 3. Os peptídeos natriuréticos produzidos pelos cardiomiócitos (CM) mediante regulação hemodinâmica e neuroendócrina atuam nas células-alvo por meio de receptores específicos, guanilil ciclase solúvel (sGC), tipo A e B (GC-A e GC-B). É descrito o tipo de efeito biológico mediado por cada receptor através da via do cGMP, envolvendo a proteína quinase G (PKG) e a fosfodiesterase (PDE). O peptídeo natriurético tipo C produzido pelas células endoteliais (EC) atua através do GC-B, além do receptor do peptídeo natriurético (NPR-C), um receptor não GC capaz de inibir a adenilil ciclase (AC) e reduzir os níveis de AMPc. O NPR-C também desempenha um papel fundamental na eliminação de NPs. Adaptado de: VOLPE; RUBATTU; BURNETT (2014).

Outros agentes também são capazes de inativar os NPs, tais como endopeptidase neutra, localizada nas células tubulares renais e vasculatura, bem como a enzima degradadora de insulina dipeptidil peptidase-IV (VOLPE; RUBATTU; BURNETT, 2014). Além disso, um

importante papel de destaque de todos os membros da família dos NPs está na proteção contra o desenvolvimento da hipertensão, elucidado em experimentos com deleções genéticas em camundongos e variantes funcionais de genes humanos correspondentes para os receptores de corina, furina, NPRA e NPRC (OLIVER *et al.*, 1997). Por exemplo, a deleção de *Nppa*, um gene envolvido no controle da pressão arterial, em camundongos ocasionou hipertensão sensível ao sal, assim como a deleção de NPRA. Por conseguinte, a superexpressão de *Nppa* gerou hipotensão (TAMURA *et al.*, 2000). Por outro lado, o BNP demonstrou menor impacto na condição hipertensiva, pois a deleção de *Nppb* em camundongos promoveu fibrose cardíaca e não desenvolveu hipertensão (CHEN *et al.*, 2012). Dessa forma, os NPs possuem efeitos diretos em vários tecidos e estão envolvidos na regulação de amplos processos biológicos, como fibrose, hipertrofia cardíaca, angiogênese, viabilidade de cardiomiócitos e metabolismo (RUBATTU *et al.*, 2006).

A atuação do ANP na indução da hipovolemia e na redução da pressão arterial está bem documentada na literatura. Ele demonstrou agir na redução da pressão arterial aumentando a permeabilidade dos capilares e o efluxo de fluido sanguíneo, diminuindo, por conseguinte, a carga cardíaca com o deslocamento do fluido intravascular para o espaço intersticial (BRENNER *et al.*, 1990). Conseqüentemente, o ANP aumenta a taxa de filtração glomerular induzindo tanto a vasodilatação direta nas arteríolas aferentes, via reversão da vasoconstrição induzida pela norepinefrina, quanto no músculo liso vascular, através do efeito vasodilatador com redução do influxo de cálcio (RUBATTU *et al.*, 2006). Também há relatos da atuação do ANP e BNP na redução da pressão arterial sistêmica e pulmonar e inibição da hipertrofia cardíaca na insuficiência cardíaca (SCOTLAND *et al.*, 2005). Para mais, há descrições de efeitos diretos do ANP e CNP nos vasos sanguíneos, reduzindo as moléculas de adesão e infiltração inflamatória das placas de ateroma (GOETZE *et al.*, 2010). Diversos hormônios cardiotróficos além dos NPs, como aldosterona, renina e fatores de crescimento, demonstram padrões rítmicos ao longo do dia (SONG; WANG; WU, 2015). Vale ressaltar que os NPs apresentam comportamentos de atuação rítmica no coração. Provavelmente, essa ritmicidade está associada a diversos elementos regulatórios localizados na região promotora do gene que os codificam. Os NPs possuem E-box em sua região promotora, o que sugere uma possível participação do heterodímero CLOCK:BMAL1 nesse elemento responsivo, regulando de forma circadiana a produção desses peptídeos (GARAMI; GARDNER, 1996). ANP e BNP demonstram oscilações circadianas quanto ao seu conteúdo de mRNA (GOETZE *et al.*, 2010).

É importante destacar que nosso trabalho é o primeiro trabalho a realizar análises para testar a influência da temperatura em tecido cardíaco, pois poucos são os trabalhos analisando os genes do relógio e opsinas em tecido cardíaco, e a interrelação desses genes com a temperatura, canais TRPs e receptores de NPs ainda não foi relatada. Para mais, já está bem estabelecido na literatura que a temperatura é uma pista importante e impulsionadora do tempo interno em tecidos periféricos. O coração, como é um órgão periférico, possivelmente modularia a expressão de receptores e hormônios e seu estado metabólico frente às informações de temperatura ambiente recebidas por meio do retorno de sangue venoso periférico. Um exemplo importante a ser citado é a temperatura ideal para cultivo em estufa de tecidos e células de *Mus musculus*. A temperatura ideal para o cultivo dessas células é 37°C e a exposição das células a temperaturas abaixo deste valor, estabelece o desafio térmico. Dessa forma, o tecido periférico analisado nesse trabalho foi o coração, especificamente cardiomiócitos ventriculares que foram expostos a um pulso de 34°C durante 2 h. Temperatura essa escolhida para gerar um estresse momentâneo nas células e analisarmos como elas responderão ao estímulo, mas sem gerar consequências como apoptose ou qualquer outro tipo de injúria celular.

Diante do exposto, o presente trabalho visa a compreender se cardiomiócitos de camundongos neonatos são sensíveis à variação de temperatura, frente a um pulso frio (34°C) aplicado no início do ensaio. Escolhemos analisar os genes do relógio *Per1* e *Bmal1*, as opsinas *Opn2*, *Opn3* e *Opn4*, os canais TRPs, *Trpv1*, *Trpa1*, *Trpm8* e os receptores de peptídeos natriuréticos *Npra*, *Nprb* e *Nprc*. Diante do exposto, a nossa hipótese é que o coração pode ser termoresponsivo e que alterações na temperatura possam modular os níveis de expressão gênica nos cardiomiócitos ventriculares.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar a expressão temporal medida em um período de 24 h de genes do relógio, opsinas, canais TRPs, receptores natriuréticos e 18S (normalizador), em cultura primária de cardiomiócitos oriundos de ventrículos de camundongos neonatos C57BL/6J, mantida em escuro constante.

3.2 Objetivos específicos

Investigar o perfil temporal dos genes do relógio biológico, *Bmal1* e *Per1*, as opsinas *Opn2*, *Opn3* e *Opn4*, os canais TRPs, *Trpa1*, *Trpv1* e *Trpm8* e os receptores natriuréticos *Npra*, *Nprb* e *Nprc* (gene 18S como normalizador), *in vitro*, em cultura primária de cardiomiócitos de camundongos neonatos C57BL/6J, sincronizados por trocas sucessivas de meio e posterior exposição a um pulso de frio de 34°C por duas horas (controle a 37°C), sendo os genes descritos analisados a cada 6 h por 24 h de ensaio.

4. METODOLOGIA

4.1 Ensaio em cultura primária de cardiomiócitos de camundongos neonatos

4.1.1 Animais

A linhagem de camundongos neonatos selvagens C57Bl/6J de 1 a 3 dias de vida, sexo indiferente e pesando aproximadamente 3 g foi utilizada para obtenção de cardiomiócitos. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), perante protocolo aprovado (CEUA-UFOP nº9621230419), em anexo. Eles permaneceram junto com a mãe até o dia do experimento e foram mantidos sob os cuidados do CCA/UFOP. A eutanásia dos neonatos foi realizada por decapitação e ocorreu imediatamente após a acomodação dos animais no Laboratório de Sinalização Celular (LSC), localizado no Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB) da UFOP.

4.1.2 Cultura primária de cardiomiócitos

A extração de células do miocárdio para cultura primária foi obtida conforme o protocolo adaptado de Ehler, Moore-Morris e Lange (2013) para sua execução. Resumidamente, utilizaram-se 14 camundongos neonatos por cultura capazes de fornecer aproximadamente 1×10^6 cm² por poço de células em placas de 6 poços, os quais foram higienizados com álcool 70% e decapitados. Os corações, removidos após abertura da caixa torácica, foram lavados em solução ADS 1X pH 7,35. Em seguida, selecionaram-se os ventrículos que foram fragmentados e, posteriormente, digeridos enzimaticamente em solução tampão de digestão (Tabela 1), agitados em banho maria a 37°C em 1 ciclo de 10 min., 1 ciclo de 20 min. e 1 ciclo de 30 min. A suspensão de células resultante dessa etapa foi centrifugada (Befer BMCD modelo CMPlus) a 560 x g por 2 min. O *pellet* foi ressuscitado com meio de cultura DMEM e enriquecido com 5% de soro fetal bovino, 10% de soro de cavalo, 1% de penicilina/estreptomicina (penicilina 10.000 U/mL, estreptomicina 10.000 µL/mL) e 0,1% de inibidor de fibroblasto BRDU (5-Bromo-2'-deoxiuridina) (Tabela 2). As células foram distribuídas em placa de 6 poços e incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 45 min para adesão preferencial dos fibroblastos e para, assim, aumentar a pureza da cultura. O sobrenadante dessa etapa (cardiomiócitos) foi retirado e distribuído em uma nova placa de 6 poços, a qual foi acondicionada em estufa de CO₂ (5%) à temperatura constante de 37°C por 48 h para adesão completa das células.

4.1.3 Soluções utilizadas nos ensaios

Tabela 1. Composição da solução tampão de digestão

Itens	Quantidade (q.s.p.)
Solução tampão ADS 1X	20 mL
Colagenase tipo II (Sigma-Aldrich)	4 mg
Pancreatina (Sigma-Aldrich)	12 mg

Tabela 2. Composição da solução tampão

Itens	Quantidade (q.s.p.)
NaCl	6,8 g
Herpes	4,76 g
Na ₂ HPO ₄	0,138 g
D-Glucose	1,0 g
KCl	0,4 g
MgSO ₄	0,195 g
Água Milli-Q q.s.p.	1 L

Tabela 3. Composição do meio de cultura normal

Itens	Quantidade (q.s.p.)
DMEM/F-12 (Vitrocell)	42,5 mL
Soro de cavalo (LGC)	5 mL
Soro fetal bovino (LGC)	2,5 mL
Penicilina-estreptomicina (LGC)	0,5 mL
Solução de BRDU [10^{-2} M] (Sigma-Aldrich)	50 μ L

As culturas celulares foram divididas em grupos controle e tratado, mantidas em escuro constante a fim de que o único estímulo capitado pelas células seja o pulso de frio, para extração de RNA a cada 6 h durante 24 h. Foram confeccionados três cultivos celulares primários em momentos distintos para cada grupo, resultando em triplicata biológica. Após atingir a confluência celular adequada, realizaram-se duas passagens celulares a partir das

placas confeccionadas a fim de obter o número amostral de poços adequado (EHLER; MOORE-MORRIS e LANGE, 2013), conforme demonstrado no protocolo experimental na Figura 4.

4.1.4 Preparo das placas

Após obtenção dos poços necessários para a execução do protocolo experimental, o meio de cultura foi cuidadosamente removido com pipeta Pasteur e foram adicionados 500 μ L de Triplex (Tryple Express Enzyme, Gibco) por 5 min., em cada um dos poços. Foi realizado sucção e deposição, com micropipetador, por 5 vezes para que as células se soltassem da placa. Realizada a ressuspensão das células, coletaram-se 100 μ L em microtubo acrescido de 100 μ L de azul de Trypan. O conteúdo foi homogeneizado e a contagem, executada em camera de Neubauer. Os cardiomiócitos restantes foram coletados em tubo Falcon e centrifugados a 583 x g por 5 min., o sobrenadante foi descartado e as células, ressuspendidas em meio de cultura (Tabela 2).

4.1.5 Protocolo experimental para análise do perfil temporal de genes em cardiomiócitos de camundongos neonatos selvagens expostos ao pulso de frio

Os cardiomiócitos foram semeados na densidade de 10^6 células por poço e em placa de 6 poços, acondicionados em estufa de 5% CO₂ à temperatura constante de 37°C. Foram distribuídos em triplicata para cada ponto temporal de coleta e para cada um dos grupos, controle e tratado, objetivando a adesão completa das células por dois dias. Após a adesão celular, as células foram mantidas em escuridão constante e as trocas de meio realizadas dentro de fluxo laminar e manipuladas sob luz vermelha provenientes de um iluminador Konex com lâmpada de 7W e com filtro Safe-Light GBX-2 (Kodak, EUA). As células foram sincronizadas através de duas trocas de meio de cultura com intervalo de duas horas entre cada uma - procedimento responsável por sincronizar os genes do relógio (MORAES, *et al.*, 2017a). Posteriormente, realizou-se a exposição das células ao pulso de frio, acondicionadas em estufa de 5% CO₂ à temperatura de 34°C durante duas horas. A coleta do material ocorreu nos tempos ZT0, ZT6, ZT12 e ZT18 em intervalos de 6 h (Figura 4). Finalizada a coleta, seguiu-se o protocolo de PCR em tempo real para análise do material.

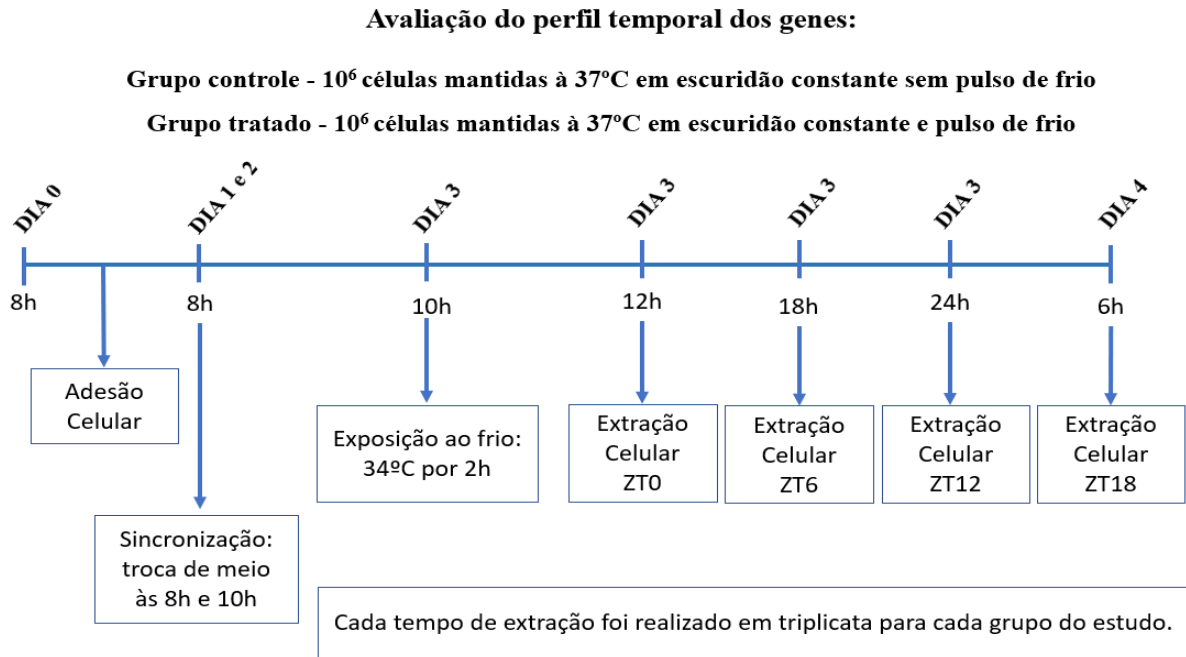


Figura 4. Protocolo experimental de avaliação do perfil temporal dos genes do relógio frente ao pulso de frio.

4.2 Extração de RNA total

Ao final do ensaio, procedeu com o descarte do meio de cultura e a adição de uma alíquota de TRIZOL (1mL) em cada poço, pipetando diversas vezes, com posterior incubação em estufa por 5 min. para obtenção do lisado celular. Coletaram-se os cardiomiócitos nos tempos ZT0, ZT6, ZT12 e ZT18, tanto do grupo controle quanto do grupo tratado com temperatura de 34°C. Foi transferido o conteúdo dos poços para eppendorfs de 1,5mL, deixando-o por 5 min em temperatura ambiente. Adicionaram-se 200 μ L de 1-bromo-3-cloropropano-BCP no eppendorf de 1,5mL seguido de agitação vigorosa (vortex) por 15 seg e, depois, permanecendo em temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g a 4°C durante 15 min e, com cuidado, transferiram-se 400 μ L da fase aquosa superior para um outro frasco eppendorf de 1,5 mL. A interfase curta que contém proteínas e a inferior que contém DNA foram descartadas. Adicionaram-se 600 μ L de isopropanol 100% para precipitar o RNA. Com um movimento de aspirar e depositar uma única vez, fazendo uso de micropipetador, deixou-se por 10 min em temperatura ambiente. As amostras foram, novamente, centrifugadas a 12.000 x g a 4°C durante 35 min para formarem um *pellet* e removeu-se o sobrenadante virando o eppendorf, sem bater, dispensando a fase líquida, e posteriormente, as amostras foram alocadas em gelo.

Acrescentou-se 1,3mL de etanol 75%, utilizando o vortex em seguida. Novamente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g a 4°C durante 15 min, então, levadas para o freezer a -20°C por pelo menos 1 hora para precipitação do RNA restante. Passado esse período, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 1,3 mL de etanol 75%, seguido de agitação no vortex. Centrifugou-se a 12.000 x g a 4°C durante 15 min e descartou-se o sobrenadante sem bater os frascos, apenas invertendo os eppendorfs em lencinhos de papel e deixando por 5 a 10 min até secar. Ressuspendeu-se o RNA com um volume de 20 µL de H₂O DEPC e pipetou-se para cima e para baixo até que o *pellet* se dissolvesse. Acrescentou-se 10% do volume do 10X Turbo DNase buffer e também 1 µL da turbo DNase, depois centrifugou-se brevemente na centrífuga de bancada. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 min. Após isso, ressuspendeu-se o reagente de inativação da DNase por vórtex e adicionaram-se 3 µL, fazendo uso do vórtex, novamente, para manter a suspensão homogênea. As amostras foram incubadas por 2 min em temperatura ambiente e, então, centrifugadas a 10.000 x g a 4°C durante 2 min para precipitar o reagente de inativação. Removeu-se o sobrenadante para um novo tubo e determinou-se a concentração de RNA, fazendo leitura no equipamento Nanodrop 1000 (ND-1000). A razão de OD₂₆₀/OD₂₈₀ foi considerada boa acima de 1,6.

4.3 RT-PCR e q-PCR

A reação de RT-PCR foi confeccionada utilizando 1 µg de RNA total, 1 µL de oligonucleotídeos randômicos (100 ng/µL) e 1 µL de dNTPs Mix 10 mM (Life Technologies, EUA), em reação com volume final de 13 µL ajustado com H₂O/DEPC. As amostras foram aquecidas por 5 min a 65°C e, em seguida, transferidas para cuba com gelo; adicionaram-se 7 µL do mix [4 µL de tampão para PCR (5x), 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de inibidor de ribonuclease (40 U/µL) e 1 µL da enzima Superscript III (200 U/µL, Life Technologies, EUA) para um volume final de 20 µL em cada tubo. A mistura foi homogeneizada, delicadamente, centrifugada brevemente e incubada por 5 min a 25°C, seguido de 50 min a 50°C. A reação foi inativada por incubação a 70° por 15 min. O cDNA sintetizado foi usado nas subsequentes reações de PCR quantitativo em tempo real.

4.4 PCR quantitativo

As reações de PCR quantitativo foram realizadas segundo o protocolo do Power SYBR Green PCR (Thermo Fisher Scientific, EUA), com um par de *primers*, específicos para cada um dos genes, *Bmal1*, *Per1*, *Opn2*, *Trpa1*, *Trpv1*, *Trpm8*, *Npra*, *Nprb*, *Nprc* (Tabela 3), e H₂O

DNaseRNase-free. O RNA ribossômico 18S, β -actina, Rpl37 e *Elongation factor 1-alpha 1* (eEF1 α 1) foram analisados, em placa separada, a fim de testá-los como normalizadores para o ensaio das culturas celulares primárias. Dentre os normalizadores realizados, o RNA ribossômico 18S foi escolhido por ter apresentado um padrão de expressão mais constante temporalmente e com menos variação em relação aos outros (Tabela 4).

No ensaio foram utilizados *primers* diluídos em H₂O DNaseRNase free para se obter a solução estoque de concentração igual a 10⁻⁵ M para uma solução intermediária dos *primers*, de forma que o volume não passasse de 1 μ L por poço. Os *primers* de cada gene de interesse foram diluídos 10 X (10 μ L em 90 μ L de H₂O DNaseRNase free), dando uma solução intermediária de 10⁻⁵ M, a partir de uma solução estoque de 10⁻⁴ M. A concentração final foi de 300 nM para *primers* dos genes e de 50nM para *primers* de RNA 18S. Essa solução foi aliqüotada em tubos e 1 μ L (aproximadamente 50 ng) de cDNA de cada amostra dos diferentes ensaios a cada tubo. As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa de experimento (10 μ L/poço).

Concluídas essas etapas e com auxílio de adesivo óptico *MicroAmp Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems®), as placas foram seladas. As reações foram executadas no equipamento ABI 7300 (Applied Biosystems), configurado a 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Os valores de *baseline* foram ajustados para 3 a 15 ciclos e o *threshold* foi ajustado manualmente para cada gene analisado. As análises foram realizadas pelo método de quantificação relativa da expressão gênica ($\Delta\Delta$ CT) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Foi efetuada a normalização dos genes alvos, seguida dos cálculos dos valores de $2^{-\Delta\Delta$ CT}.

As respectivas sequências de *primers* estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Sequência de primers para PCR quantitativo

Sequência	Concentração Final	Nome
For.: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' Rev.:5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	50 nM	RNA 18S

For:5'-AAGCTTCTGCACAATCCACAGCAC -3' Rev: 5'-TGTCTGGCTCATTTGTCTTCGTCCA-3'	300 nM	<i>mBmal1</i>
For:5'-AGCAGG TTCAGGCTAACCAGGAAT-3' Rev:5'-AGGTGTCCTGGTTTCGAAGTGTGT-3'	300 nM	<i>mPer1</i>
For: 5'-TGCCACACTTGGAGGTGAAA-3' Rev: 5'-ACCACGTAGCGCTCAATGG-3'	300 nM	<i>mOpn2</i>
For: 5'-TCTCTACTCCAAGTTCCCGAG-3' Rev: 5'-TGACTCCGAACAGGGATACCA-3'	300 nM	<i>mOpn3</i>
For: 5'-ACATCTTCATCTTCAGGGCCA-3' Rev: 5'-ACTCACCGCAGCCCTCAC-3'	300 nM	<i>mOpn4</i>
For: 5'-GGTCCAACATAACCGCATAGA-3' Rev: 5'-AGGGCAACACGAAGATGATAC-3'	300 nM	<i>mTrpa1</i>
For: 5'-CAGAGACCTGTGTCGGTTTATG-3' Rev: 5'-CATGTTGAGCAGGAGGATGTAG-3'	300 nM	<i>mTrpv1</i>
For: 5'-TACGCTTGTCTGTGACACC-3' Rev: 5'-TCCAGTGAGAATCCACGCAC-3'	300 nM	<i>mTrpm8</i>
For: 5'-CCACTTTTCCACACTGGAGGT-3' Rev: 5'-AGCAGGGAGCCATAATTGGAG-3'	300 nM	<i>Npra</i>
For: 5'-CGGGAGTCACCTTCATCATGT-3' Rev: 5'-TGTCATGAGCGAGCCGTAA-3'	300 nM	<i>Nprb</i>

For: 5'-GATGCTCGCTCTGTTTCGC-3' Rev: 5'-GTCACCACTGGCACACATGA-3'	300 nM	<i>Nprc</i>
---	--------	-------------

4.5 Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados foram feitas através do *software* GraphPad Prism (versão 7.0). Todos os valores são expressos como média e erro padrão da média ($x \pm EPM$). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas usando análise de variância unidirecional (ANOVA) *Two-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni para determinação das diferenças significativas entre os grupos. Diferenças significativas entre os ZTs foram determinadas usando análise de ANOVA *One-way*, seguida de pós-teste de Tukey para determinação das diferenças significativas entre os ZTs. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

O perfil de expressão temporal para o gene *Bmal1* do grupo que recebeu o pulso de frio foi significativamente maior no ZT18 do grupo exposto ao frio em relação ao ZT18 do grupo controle (Figura 5A). No grupo controle a expressão apresentou diferença estatisticamente significativa maior no ZT6 em relação ao ZT18 (Figura 5B), e significativamente maior no ZT18 em relação ao ZT0 no grupo exposto ao frio (Figura 5C).

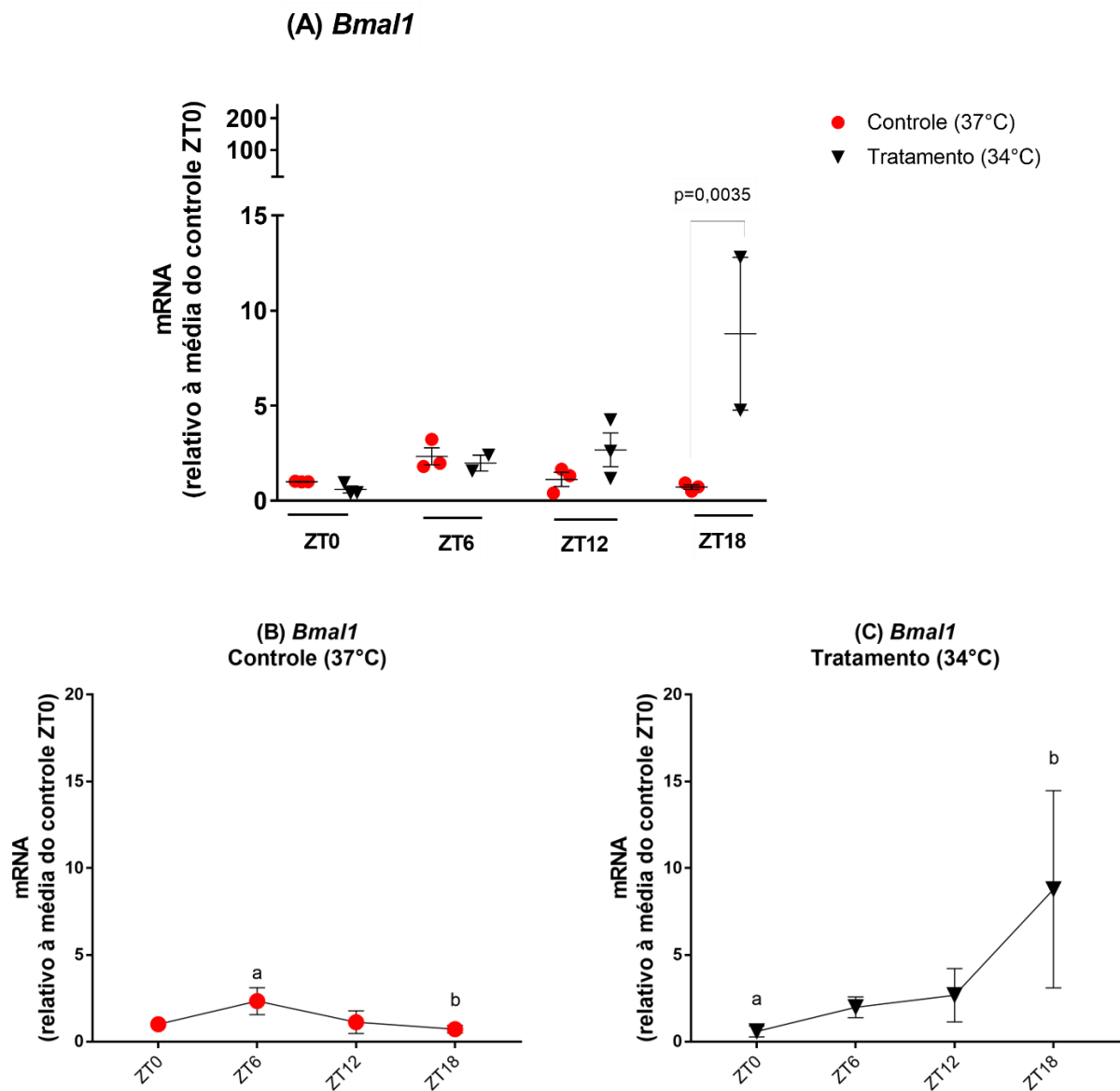


Figura 5. (A) Expressão temporal de *Bmal1* em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J neonatos expostos a temperatura de 37°C em comparação com cardiomiócitos expostos a 34°C durante duas horas, mantidos em escuridão constante. A análise estatística foi realizada por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. (B) e (C) Comparação entre os

ZTs intragrupo foi realizada. A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. ($a \neq b$) Indica diferença intragrupo ($p < 0.05$). Os valores foram normalizados por 18S RNA e expressos relativos à média do controle ZT0. ($n = 3$)

O perfil de expressão temporal para o gene *Per1* do grupo que recebeu o pulso de frio foi significativamente maior no ZT18 quando comparado ao controle (Figura 6A). No grupo controle a expressão apresentou diferença estatisticamente significativa maior no ZT6 em relação ao ZT0 e ZT12 (Figura 6B), enquanto não houve diferença significativa no grupo exposto ao frio (Figura 6C).

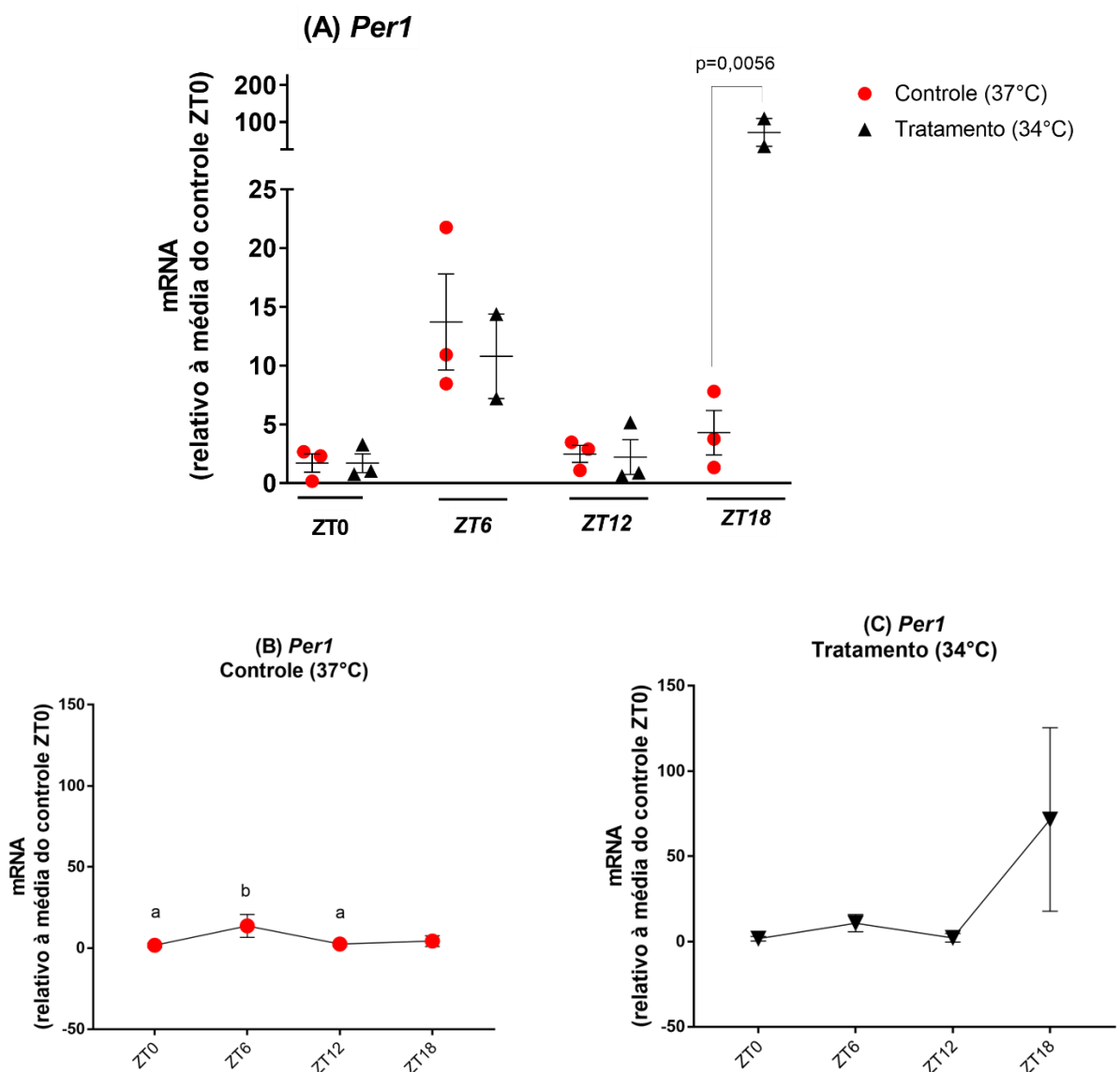


Figura 6. (A) Expressão temporal de *Per1* em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J neonatos expostos a temperatura de 37°C em comparação com cardiomiócitos expostos a 34°C durante duas horas, mantidos em escuridão constante. A análise estatística foi realizada

por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. (B) e (C) Comparação entre os ZTs intragrupo foi realizada. A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. ($a \neq b$) Indica diferença intragrupo ($p < 0.05$). Os valores foram normalizados por 18S RNA e expressos relativos à média do controle ZT0. ($n = 3$)

O perfil de expressão temporal para o gene *Opn2* no grupo que recebeu o pulso de frio foi significativamente maior no ZT18 quando comparado ao controle (Figura 7A). No grupo controle a expressão apresentou diferença estatisticamente significativa maior no ZT6 em relação ao ZT0, ZT12 e ZT18 (Figura 7B), enquanto não houve diferença significativa no grupo exposto ao frio (Figura 7C).

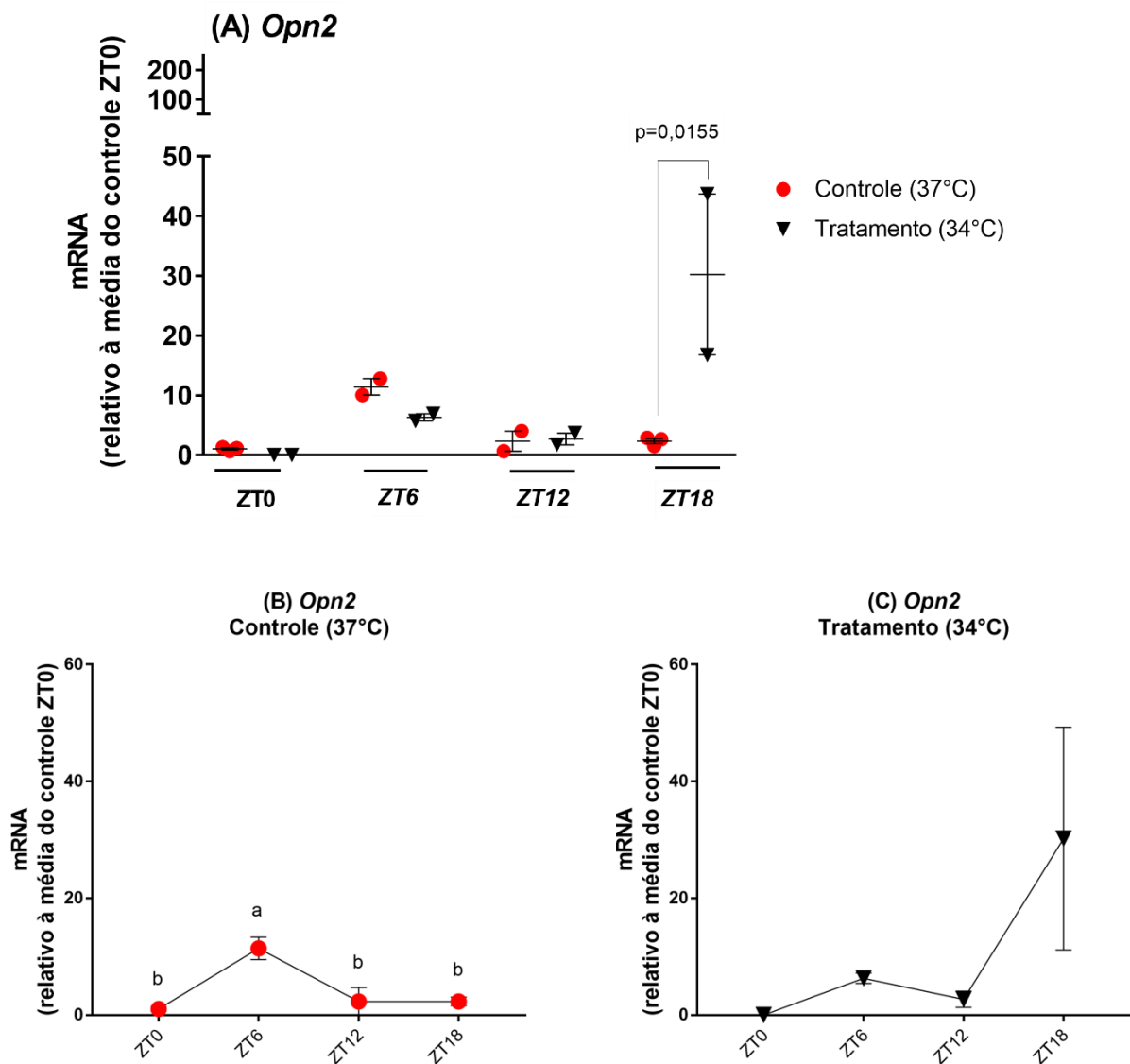


Figura 7. (A) Expressão temporal de *Opn2* em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J neonatos expostos a temperatura de 37°C em comparação com cardiomiócitos expostos a

34°C durante duas horas, mantidos em escuridão constante. A análise estatística foi realizada por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. (B) e (C) Comparação entre os ZTs intragrupo foi realizada. A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. (a≠b) Indica diferença intragrupo ($p < 0.05$). Os valores foram normalizados por 18S RNA e expressos relativos à média do controle ZT0. (n= 3)

O perfil de expressão temporal para o gene *Trpm8* do grupo que recebeu o pulso de frio foi significativamente maior no ZT18 quando comparado ao controle de mesmo ZT (Figura 8A). Quando comparado o perfil de expressão temporal entre os ZTs no grupo que recebeu o pulso de frio, foi observado significativamente maior expressão no ZT18 em relação ao ZT0, ZT6 e ZT12 (Figura 8C).

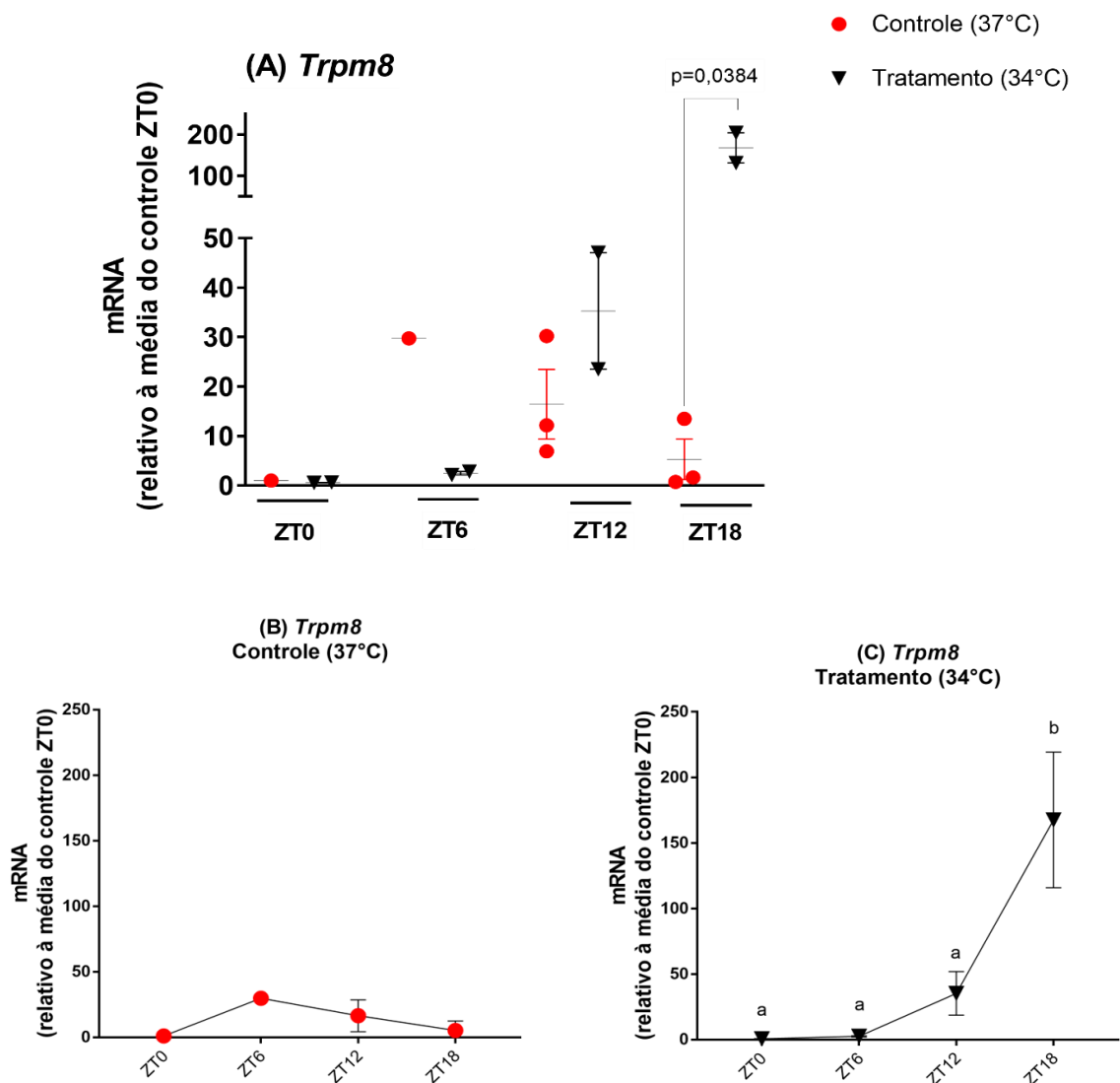


Figura 8. (A) Expressão temporal de *Trpm8* em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J neonatos expostos a temperatura de 37°C em comparação com cardiomiócitos expostos a

34°C durante duas horas, mantidos em escuridão constante. A análise estatística foi realizada por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. (B) e (C) Comparação entre os ZTs intragrupo foi realizada. A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. (a≠b) Indica diferença intragrupo ($p < 0.05$). Os valores foram normalizados por 18S RNA e expressos relativos à média do controle ZT0. (n= 3)

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no perfil de expressão temporal para o gene *Npra* em ambos os grupos ou entre os grupos (Figura 9A, 9B e 9C). Deve-se ressaltar a maior dispersão das replicatas, o que prejudicaria a revelação de qualquer diferença.

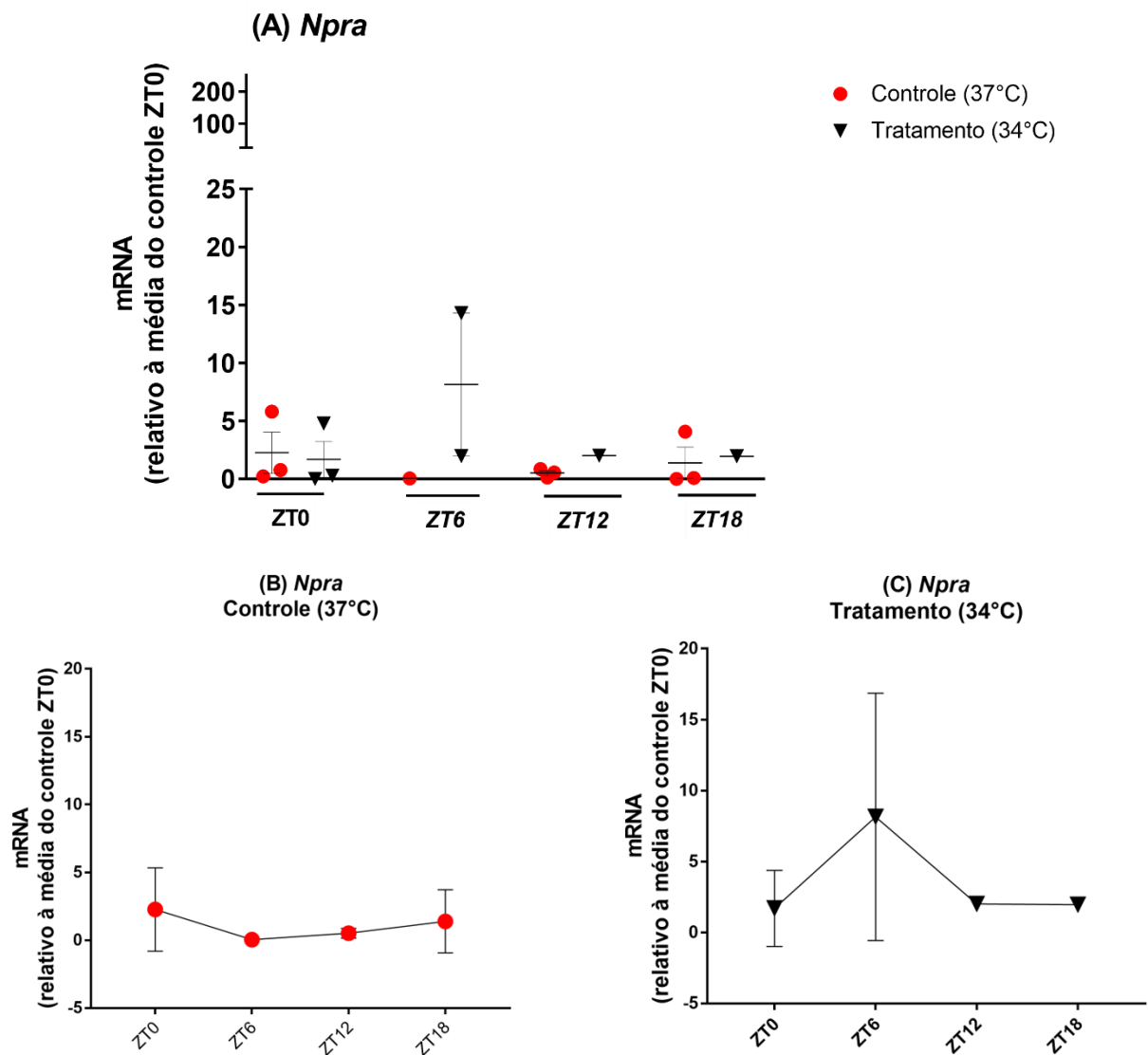


Figura 9. Expressão temporal de *Npra* em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J neonatos expostos a temperatura de 37°C em comparação com cardiomiócitos expostos a

34°C durante duas horas, mantidos em escuridão constante. A análise estatística foi realizada por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. (B) e (C) Comparação entre os ZTs intragrupo foi realizada. A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. Os valores foram normalizados por 18S RNA e expressos relativos à média do controle ZT0. (n= 3)

O perfil de expressão temporal para o gene *Nprb* no grupo que recebeu o pulso de frio foi significativamente maior no ZT12 e ZT18 quando comparados ao controle (Figura 10A). No grupo controle não houve diferença estatisticamente significativa intragrupo (Figura 10B), enquanto no grupo exposto ao frio houve diferença estatisticamente significativa no ZT18 em relação a todos os outros ZTs e entre o ZT0 em relação ao ZT12 (Figura 10C).

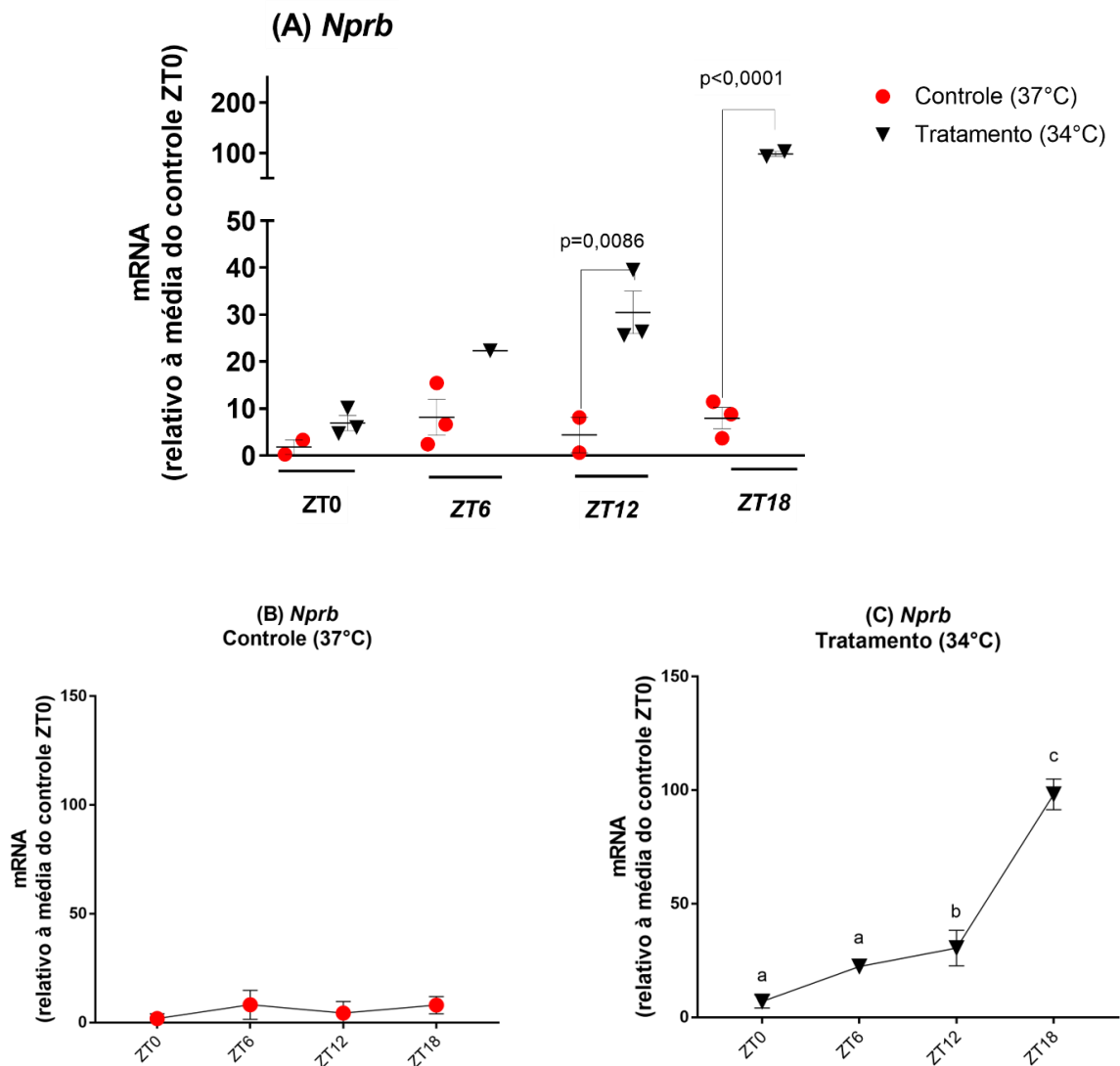


Figura 10. (A) Expressão temporal de *Nprb* em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J neonatos expostos a temperatura de 37°C em comparação com cardiomiócitos expostos a

34°C durante duas horas, mantidos em escuridão constante. A análise estatística foi realizada por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. (B) e (C) Comparação entre os ZTs intragrupo foi realizada. A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. ($a \neq b \neq c$) Indica diferença intragrupo ($p < 0.05$). Os valores foram normalizados por 18S RNA e expressos relativos à média do controle ZT0. ($n = 3$)

O perfil de expressão temporal para o gene *Nprc* no grupo que recebeu o pulso de frio foi significativamente maior no ZT18 quando comparado ao controle (Figura 11A). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas intragrupo tanto no grupo controle quanto no grupo tratado (Figura 11B e 11C).

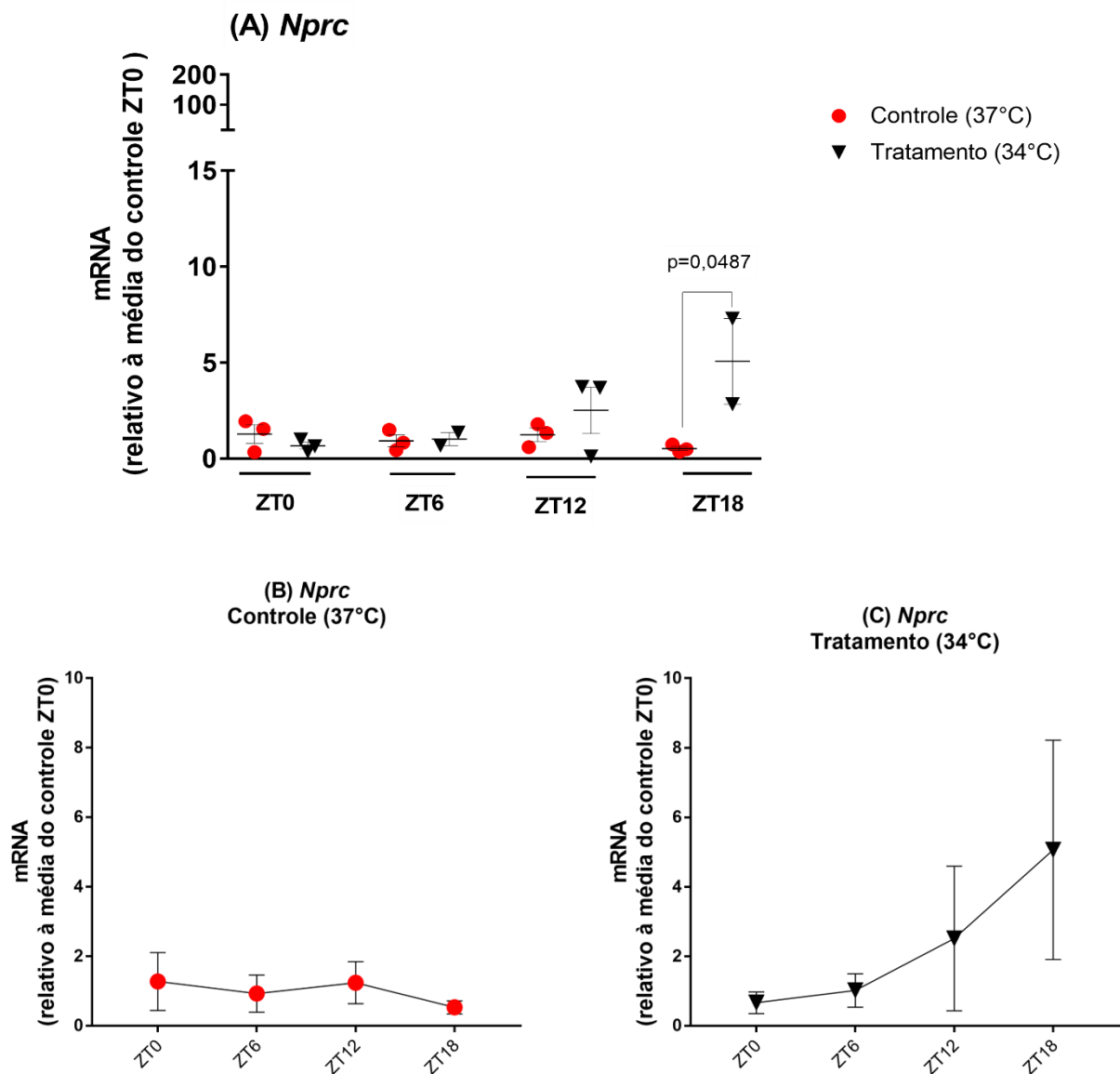


Figura 91. (A) Expressão temporal de *Nprc* em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J neonatos expostos a temperatura de 37°C em comparação com cardiomiócitos expostos a

34°C durante duas horas, mantidos em escuridão constante. A análise estatística foi realizada por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. (B) e (C) Comparação entre os ZTs intragrupo foi realizada. A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. Os valores foram normalizados por 18S RNA e expressos relativos à média do controle ZT0. (n= 3)

Não foi detectada pelo ensaio de qPCR a expressão de RNAm para os genes *Trpa1*, *Trpv1*, *Opn3* e *Opn4* nas culturas de cardiomiócitos tanto no grupo controle a 37°C quanto no grupo tratado com pulso de frio a 34°C.

A Tabela 4 apresenta o $\Delta\Delta CT$ dos genes analisados com as médias e erro padrão da média, destacando-se as diferenças entre controle e tratado e intragrupo para os ZTs analisados e a interação do p-valor.

Tabela 5. $\Delta\Delta$ CT dos genes analisados para cada condição analisada

Variações de expressão dos genes analisados no estudo em quatro tempos para o perfil temporal (ZTs 0, 6, 12 e 18) em temperaturas diferentes (34°C e 36°C)

	ZT0 37°C	ZT0 34°C	ZT6 37°C	ZT6 34°C	ZT12 37°C	ZT12 34°C	ZT18 37°C	ZT18 34°C	Fator ZT p valor	Fator Temp. p valor	Interação p valor
<i>Bmal1</i>	16,7±0,01 5	17,58±0,4 07	15,53±0,2 61	15,75±0,31 1	16,77±0,6 33	15,47±0,5 41	17,22±0,2 57	13,74±0,71 4 ^d	0,0136	0,0090	0,0041
<i>Per1</i>	18,24±1,3 10	17,78±0,6 42	14,58±0,4 07	14,89±0,50 0	17,09±0,5 19	17,75±0,9 51	16,48±0,7 40	12,316±0,8 55 ^d	0,0049	0,0255	0,0052
<i>Opn2</i>	22,56±0,3 15	30,44±0,6 66	19,05±0,1 73	19,91±0,14 3	21,86±1,3 06	21,23±0,5 50	21,38±0,2 93	17,80±0,69 2 ^d	0,0114	ns	0,0081
<i>Npra</i>	12,61±1,3 70	14,62±2,5 25	17,22±0,0 00	10,20±1,42 5	13,93±0,8 00	11,61±0,0 00	15,99±3,0 70	11,65±0,00 0	ns	ns	ns
<i>Nprb</i>	17,31±1,7 49	14,59±0,3 28	14,66±0,7 74	12,83±0,00 0	16,13±1,8 49	12,40±0,2 02 ^c	14,46±0,4 95	10,69±0,07 0 ^d	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>Nprc</i>	15,26±0,7 93	15,97±0,4 18	15,55±0,5 06	15,32±0,50 3	15,1±0,47 9	15,07±1,7 05	16,24±0,2 96	13,08±0,68 3 ^d	ns	0,0281	0,0255
<i>Trpm8</i>	28,18±0,0 00	28,96±0,1 68	23,23±0,0 00	26,88±0,19 8	24,42±0,6 19	23,13±0,5 01	26,85±1,2 51	20,84±0,32 0 ^d	ns	0,0047	0,0007
<i>Trpa1</i>	RNAm não detectado										
<i>Trpv1</i>	RNAm não detectado										
<i>Opn3</i>	RNAm não detectado										
<i>Opn4</i>	RNAm não detectado										

Símbolos: ZT0 – a; ZT6 – b; ZT12 – c e ZT18 – d significam diferença estatística em relação ao controle e ns (não significativo).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho, de forma pioneira, elaborou a hipótese de que a influência da variação de temperatura em tecido cardíaco poderia ser capaz de alterar os níveis de expressão de determinados genes, como os genes do relógio, de opsinas, de receptores de hormônios natriuréticos e de canais TRP. A temperatura, sendo uma pista ambiental importante para o ajuste dos relógios periféricos, dispôs de sua ação em análises em células primárias de cardiomiócitos ventriculares de camundongos neonatos como possíveis termoresponsivas à variação de temperatura. Um pulso de frio (34°C) foi aplicado no início do ensaio e comparado ao controle mantido a 37°C, dentro de um período de 24 h e monitorado a cada 6 h.

Primeiro ponto que devemos considerar é o da sincronização das células de cardiomiócitos. Na tentativa de sincronizarmos os relógios, efetuamos duas trocas de meio, sendo a última duas horas antes da exposição ao frio. A expressão apresentada intragrupo pelo gene do relógio *Bmal1* nas células que sofreram pulso de frio apresentou uma tendência de aumento contínuo de expressão ao longo dos diferentes ZTs, sendo que no ZT18 a expressão foi significativamente maior que no ZT0, e para as células mantidas à 37°C houve maior expressão intragrupo no ZT6 em relação ao ZT18. Para o gene *Per1* observamos um aumento de expressão intragrupo no ZT6 em relação ao ZT0 e ZT12 apenas no grupo controle. Portanto, ao compararmos a expressão gênica de ambos os genes, observamos que não houve diferença significativa entre os ZTs, com exceção do ZT18 para o *Bmal1*, nas células que sofreram pulso de frio em relação as células ditas controle. Devemos salientar aqui que o pulso de frio promoveu em ambos os genes uma tendência de aumento na expressão no ZT18 em relação aos demais pontos do ensaio. E que o pulso de frio acentuou a amplitude de resposta temporal apresentada por *Per1*. Podemos aqui deduzir que provavelmente as trocas de meio não foram capazes de promover sincronização dos genes do relógio, ou pelo menos, haveria a possibilidade de ocorrer no caso de sincronização com choque sérico (meio de cultura 50% / soro de cavalo 50%) (BALSALOBRE; DAMIOLA; SCHIBLER, 1998) ou com *forskolina* (10 µM) (YAGITA; OKAMURA, 2000) ou com dexametasona (100 nM) (BALSALOBRE *et al.*, 2000), levando-se em conta a amplitude da expressão de ambos os genes do relógio testados. Além de possível baixo efeito da troca de meio, parte do encontrado pode ser explicado por se tratar de células cardíacas neonatais de camundongo ou pela variação artificial do normalizador. Essas

são algumas das limitações que nos deparamos ao longo do trabalho, cabendo aqui uma ampliação do mesmo para formulação de melhores conclusões. Contudo, há relatos na literatura que demonstram a ritmicidade circadiana molecular e funcional em cardiomiócitos *in vitro* de ratos Wistar neonatos, porém não encontramos trabalhos que tivessem utilizado camundongos neonatos. Em cardiomiócitos ventriculares de ratos Wistar neonatais sincronizados, Bastian e colaboradores (2017) demonstraram oscilação na expressão de *Bmal1* e que ela é anti-fásica em relação a expressão de *Per2*. Nesse mesmo trabalho, a análise proteica rítmica demonstrou picos que seguiram a expressão gênica com um atraso de 6 - 12 horas, comprovando um relógio circadiano molecular funcional. Um ponto importante a ser considerado neste trabalho citado está no método de sincronização celular utilizado. Os autores utilizaram um choque sérico, com um meio de cultura contendo 50% de soro de cavalo, durante duas horas. A utilização de método de sincronização diferente no nosso protocolo pode explicar em parte a ausência da ritmicidade apresentada em nosso estudo, porém o método de sincronização escolhido para gerar ritmicidade celular depende do estímulo que se objetiva gerar na célula a fim de obtê-la com o mínimo de interferências possíveis e adequada para o desenho do experimento. Por outro lado, ainda em ratos adultos, Durgan e colaboradores (2005) sincronizaram as células também com choque de soro e obtiveram expressão de *Bmal1* e *Per2* com picos durante a fase de claro e durante a fase claro-escuro, em anti-fase. Em um trabalho realizado por Goetze e colaboradores (2010) utilizando miocárdio atrial e ventricular de camundongos adultos expostos a um ciclo de 24 h com 12 h de luz e 12 h de escuro, foram capazes de gerar perfil temporal com um padrão de expressão de *Bmal1* e de *Per1* com oscilações rítmicas semelhantes, corroborando com os achados em ratos Wistar citados acima. Em suma, podemos compreender que a ritmicidade circadiana está presente no tecido periférico de organismos neonatos ou adultos, demonstrando que esse pode ser um controle crucial para a sobrevivência de alguns órgãos críticos do sistema, por exemplo, o coração.

Os níveis de expressão do receptor *Npra* e *Nprc* não apresentaram variação temporal, mas para o gene *Nprb* o pulso de frio foi capaz de alterar os níveis de RNAm, ZT18 com maior expressão que todos os outros pontos e ZT12 com maior expressão que ZT0, com tendência a um aumento em todos os pontos analisados, sugerindo uma resposta tardia ao estímulo de frio. Estes dados somados aos dados dos genes de relógio indicam que os cardiomiócitos são responsivos ao pulso de frio, mesmo que tardio.

Apesar da não significância estatística para o gene *Npra* e *Nprc*, houve uma tendência para um aumento da expressão tanto de *Npra* (a partir do ZT6) quanto de *Nprc* (a partir do ZT12). Corroborando os nossos dados de *Npra*, Goetze e colaboradores (2010), identificaram que o *Npra* não se apresenta rítmico tanto no átrio quanto no ventrículo de camundongos adultos, mas que o ANP se comporta ritmicamente no átrio e o BNP no ventrículo. Além disso, existem poucos relatos na literatura ligando a ação do frio com relógio biológico e receptores de peptídeo natriurético em cardiomiócitos e, de fato, o nosso trabalho foi o primeiro a analisar essa associação. Mais estudos são necessários para uma melhor interpretação da atuação dos receptores de NPs em tecido cardíaco dependente da ação de temperaturas frias. No entanto, foi demonstrado que em tecido adiposo de camundongo foi encontrada variação na razão de expressão entre os receptores NPRA e NPRC em resposta à exposição ao frio (COLLINS, 2014), fato também observado em músculo esquelético em resposta ao treinamento de exercício (ENGELI *et al.*, 2012). Smith e colaboradores (2015) relataram que a expressão de ANP, BNP e o receptor NPRA ocorrem em ritmo circadiano nas câmaras cardíacas e que a expressão de BNP ventricular apresenta um padrão circadiano observado apenas em animais mantidos em escuridão constante. Esse mesmo grupo de pesquisadores analisou o tecido adiposo branco de camundongos para traçar o perfil da expressão temporal dos receptores dos NPs e dos genes *Per1* e *Bmal1*. A expressão dos genes NPRA e NPRC foi associada à expressão dos genes *Per1* e *Bmal1* no tecido adiposo branco, fato decisivo para regular a lipólise diurna (SMITH *et al.*, 2015). Segundo Lafontan e colaboradores (2008), os receptores de NPs também são expressos no tecido adiposo humano onde se descobriu que o ANP aumenta a lipólise. NPs aumentam a lipólise via proteína quinase dependente de GMPc e PKG, fosforilando os mesmos alvos que da ativação dos receptores β -adrenérgicos por agonistas β , por meio da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). Essa via foi muito bem demonstrada no trabalho de Bordicchia e colaboradores (2012) que expuseram camundongos adultos a uma temperatura de 4°C por 6 horas e os comparou com camundongos mantidos a 25°C por 6 horas. Suas descobertas demonstraram que NPs eram capazes de ativar a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (p38 α MAPK) para aumentar a biogênese mitocondrial e, conseqüentemente, atuar na termogênese através da formação de adipócitos marrom com concomitante aumento do gasto energético. Em adipócitos de camundongo *Nprc*^{-/-}, observou-se que ANP aumenta a expressão de UCP1 e o conteúdo mitocondrial por meio de NPRA usando a cascata de sinalização de PKG para ativação

de p38 α MAPK, que é capaz de promover a termogênese no organismo; demonstrando dessa forma uma via de sinalização paralela à via das catecolaminas, que são conhecidas por utilizar a via β -adrenérgica e PKA para a mesma função. Além disso, foi relatado nesse mesmo trabalho que camundongos *Nprc*^{-/-} são mais termogenicamente ativos do que os camundongos *Nprc*^{+/+}, demonstrando que os NPs podem ser capazes de ativar de maneira mais geral o programa transcricional característico do adipócito marrom, dependendo da razão relativa de NPRA e NPRC nos adipócitos (BORDICCHIA *et al.*, 2012).

A expressão gênica de canais iônicos no coração também foi analisada. Observamos que para o gene *Trpm8* houve maior expressão no ZT18 em relação ao ZT0, ZT6 e ZT12 no grupo exposto ao pulso de frio, além de uma maior expressão gênica no ZT18 do grupo tratado em relação ao grupo controle, enquanto para *Trpa1* e *Trpv1* não houve detecção da expressão desses canais em cardiomiócitos ventriculares de neonatos analisados por PCR. Segundo um estudo realizado por Moraes e colaboradores (2017b) em camundongos adultos selvagens e nocautes para *Trpm8*, sob ciclo de claro e escuro o tecido adiposo marrom (TAM) mostrou nos camundongos selvagens a oscilação circadiana, enquanto na ausência de *Trpm8* a expressão foi reduzida em amplitude e a oscilação temporal abolida. Provavelmente, a regulação dos genes do relógio pelo canal *Trpm8* presente-se também em outros tecidos periféricos em resposta ao frio, algo que traria mais esclarecimentos sobre as interrelações dos canais TRPs e os genes do relógio. Contudo, uma análise criteriosa sobre os canais TRPs e suas funcionalidades específicas em órgãos e tecidos são fundamentais, pois dois ou mais canais podem operar em conjunto em resposta ao mesmo estímulo podendo ou não serem todos funcionais no tecido analisado. Por exemplo, recentemente foi descoberto que os canais TRPA1 e TRPM8 operam de forma conjunta e, a ativação do canal TRPA1 aumenta principalmente a segunda fase da resposta metabólica ao frio com aumento de tremores nos processos de manutenção da homeostase da temperatura (KOZYREVA; KHRAMOVA; KOZARUK, 2019). Outro importante exemplo de operação conjunta de canais TRPs foi relatado para os canais TRPA1 e TRPV1, estando funcionalmente e possivelmente estruturalmente interligados (PATIL *et al.*, 2020). Contudo, nenhuma evidência de expressão funcional de *Trpa1* ou *Trpv1* em cardiomiócitos primários de camundongos foi encontrada, nem quando estimulados eletricamente ou com agonistas específicos de cardiomiócitos (HOEBART *et al.*, 2021),

corroborando com a não determinação do RNAm para esses canais analisados em nossos experimentos.

Quanto ao perfil temporal para *Opn2*, embora não tenha apresentado variação temporal da expressão, houve maior expressão no ZT18 do grupo tratado em relação ao grupo controle, além de aumento da expressão intragrupo no ZT6 em relação ao ZT0, ZT12 e ZT18 no grupo controle, e maior expressão no ZT18 em relação ao controle. Não detectamos expressão para *Opn3* ou *Opn4*. Nossos resultados corroboram em parte um trabalho realizado por de Assis, Moraes e Castrucci (2017) em linhagens de melanócitos normais (Melan-a) e malignos (B16-F10) de camundongos, que receberam choque térmico de calor e/ou posterior exposição à radiação ultravioleta para investigação dos efeitos sinérgicos desses na modulação de genes do relógio, opsinas e no conteúdo de melanina em células da pele. O choque de calor, especificamente nas células Melan-a mantidas em escuridão constante, não induziu oscilação dependente do tempo, além de não afetar a expressão temporal de *Per1*, *Clock* ou *Bmal1*. Porém, comparando com os dados aqui apresentados em cardiomiócitos, o pulso de frio também não foi capaz de induzir oscilação dependente do tempo para os genes do relógio, mas capaz de alterar os níveis de expressão similarmente entre os genes *Trpm8* e *Nprb* na análise intragrupo no grupo tratado. Além disso, foi observado na análise entre os grupos, um aumento da expressão gênica no ZT18 para os genes *Bmal1*, *Per1*, *Opn2*, *Trpm8* e *Nprc* para o grupo tratado, assim como um aumento de expressão para o gene *Nprb* a partir do ZT12 em relação ao controle. Somados, nossos dados indicam uma resposta dos cardiomiócitos frente ao pulso de frio, mesmo que tardia.

Contudo, entre as opsinas testadas nesse estudo, *Opn2*, *Opn3* e *Opn4*, apenas encontramos expressão da *Opn2* em cardiomiócitos. Devemos novamente ressaltar que nossos achados foram obtidos em culturas primárias de cardiomiócitos neonatos de camundongo e que essas culturas foram obtidas de porções ventriculares. A expressão de *Opn2* mantida a 37°C não apresentou variação temporal. Porém a expressão de *Opn2* das células que receberam o pulso de frio apresentaram um aumento de expressão já a partir do ZT6 mantendo esse quadro até o ZT18.

São poucos os trabalhos na literatura que tenham investigado a expressão de opsinas em corações murinos (NISSILA *et al.*, 2012). Nas linhagens celulares B16 F10 e Melan a, onde foram estudados os efeitos de pulsos de luz branca e a expressão de

genes do relógio por de Assis e colaboradores (2016), foi demonstrado de forma pioneira a expressão da opsina *Opn4* em ambas as linhagens, assim como a expressão das opsinas *Opn1* e *Opn2*, onde *Opn2* e a *Opn4* se destacaram por apresentarem maior expressão. Quando a expressão dessas opsinas foi comparada entre essas linhagens celulares ficou demonstrado que B16-F10 contém 30 vezes menos *Opn2* e 6 vezes menos *Opn4* em relação a linhagem Melan a. Os autores concluíram que o processo carcinogênico pode estar atuando, entre outros mecanismos, pelo aumento da sensibilidade do sistema fotossensível e com possível participação da *Opn4* (de Assis *et al.*, 2016). No entanto, um melanócito expressar OPN4 ou qualquer outra opsina não nos parece tão estranho uma vez que essas células recebem luz proveniente do ambiente. No entanto o que poderia estar fazendo uma opsina no coração, um órgão reconhecidamente “cego” pelo fato do mesmo não receber luz? Acreditamos que a resposta para essa pergunta esteja vinculada a descobertas recentes em relação a novas formas de ativação de opsinas, como iremos expor abaixo.

Em um estudo desenvolvido por Shen e colaboradores (2011), observou-se que larvas de drosófilas *Opn2^{-/-}* mantidas em escuridão demonstravam perda da capacidade de discriminar temperaturas, porém restaurada após transfecção de OPN4. Moraes e colaboradores (2017a) demonstraram de forma pioneira o envolvimento da OPN4 em respostas termossensoras em células de mamíferos, trazendo a discussão sobre as opsinas para além de uma atuação como fotopigmento. Neste estudo, demonstrou-se que melanócitos de camundongo em cultura, sincronizados por trocas de meio e expostos a um pulso de calor a 39,5°C por 1 h, apresentaram aumento nos níveis de expressão de *Per1* imediatamente após o estímulo em relação ao controle mantido a 37°C. A inibição com antagonista para OPN4 foi realizada sob as mesmas condições revertendo assim o aumento de expressão de *Per1* observado anteriormente. O mesmo ocorreu em células de melanoma em condições de escuridão constante. Essas descobertas abriram a porta para uma nova função das opsinas que agora além de fotorreceptores podem também ser consideradas termoreceptores. Recentemente, a hipótese de que adipócitos de camundongos poderiam responder a uma exposição local de luz azul e que seria dependente de OPN3, comprovou-se como um mecanismo de regulação da homeostase energética, por meio da promoção da lipólise via fosforilação dependente de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e consequentemente aumento da termogênese (NAYAK *et al.*, 2019). Aliás, o mecanismo envolvendo a lipólise

parece bem mais complexo, pois além da participação conhecida de mecanismo adrenérgicos e dessa participação local orquestrada pela OPN3, existe ainda importantes participações centrais também envolvendo outras opsinas no processo como veremos. Segundo recentes relatos de Zhang e colaboradores (2020) a estimulação quimiogênica de *Opn5* em neurônios da área pré-óptica hipotalâmica diminui imediatamente a temperatura do tecido adiposo branco, desempenhando um papel inibitório para a termogênese. Camundongos sem expressão de *Opn5* demonstraram marcante aumento na termogênese e na atividade do TAM. Para mais, o conhecimento de que a OPN4 pode também ser ativada por variação de temperatura abre novas possibilidades, que devem ser agora exploradas.

Ademais, inter-relacionando os dados aqui apresentados e os já obtidos pela equipe (dados não publicados) demonstramos que existem pontuais diferenças de expressão gênica entre átrios e ventrículos, em que há uma maior expressão de *Trpa1*, *Trpv1*, *Opn1* e *Opn2* nos átrios em relação ao ventrículo (PAULA, 2020). Possivelmente, o átrio por ser a cavidade cardíaca inicialmente responsável por receber o sangue periférico, seria provavelmente mais sensível a variações de temperatura, podendo inclusive expressar os canais *Trpa1* e *Trpv1*, diferentemente do ventrículo que não expressam. Apesar disso, cardiomiócitos ventriculares também expressam *Opn2* assim como o *Trpm8*, que já foram documentados na literatura como responsivos a mudanças de temperatura, sugerindo que os cardiomiócitos ventriculares possuem sensibilidade à temperatura. Portanto, mais trabalhos nessa vertente são necessários, em especial para compreensão das vias de sinalização envolvidas tanto para átrios como para ventrículos, assim como para os tecidos periféricos que não percebem luz ou temperatura direta do ambiente para que mais evidências possam auxiliar na compreensão desses mecanismos que aparentemente atuam em conjunto.

7. CONCLUSÃO

A análise da expressão temporal medida em um período de 24h de genes do relógio, receptores natriuréticos, canais TRP e opsinas em cultura primária de cardiomiócitos de camundongos neonatos C57BL/6J, mantidas em escuridão constante demonstrou-se ser responsiva a um pulso de frio (34°C em relação ao controle 37°C) com duração de duas horas, no início do ensaio. Esse fato demonstra que os cardiomiócitos ventriculares apresentam a capacidade de perceberem e alterarem a expressão de determinados genes em resposta a uma variação de temperatura. Dados ainda não publicados de nosso grupo revelam que essa percepção possa ser ainda mais acentuada nos átrios.

De fato, não detectamos a expressão de *TrpA1*, *TrpV1*, *Opn3* e *Opn4* nos cardiomiócitos aqui analisados, mas identificamos a expressão dos genes *TrpM8* e *Opn2* que são relacionados a respostas de variação de temperatura. Portanto, buscar compreender mais a fundo como átrios e ventrículos respondem à percepção de variação de temperatura nos traz outras hipóteses que necessitam de análise, como as vias de sinalização, por exemplo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBEY, S. E.; POTTER, L. R. Vasopressin-dependent Inhibition of the C-type Natriuretic Peptide Receptor, NPR-B / GC-B, Requires Elevated Intracellular Calcium Concentrations. **The journal of biological chemistry**, v. 277, n. 45, p. 42423–42430, 2002.

ABRAMOWITZ, J.; BIRNBAUMER, L. Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 2, p. 297–328, 2009.

AGUETTAZ, E. *et al.* Axial stretch-dependent cation entry in dystrophic cardiomyopathy: Involvement of several TRPs channels. **Cell Calcium**, v. 59, n. 4, p. 145–155, 1 abr. 2016.

ANDRÉS-DELGADO, L.; MERCADER, N. Interplay between cardiac function and heart development. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 7, p. 1707–1716, 1 jul. 2016.

ANTLE, M. C.; SILVER, R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. **Trends in neurosciences**, v. 28, n. 3, p. 145–151, 2005.

ASHER, G.; SCHIBLER, U. Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals. **Cell metabolism**, v. 13, n. 2, p. 125-137, 2011.

ASSIS, L. V. M. de. **Mechanisms of clock gene modulation by UVA radiation and visible light in normal (Melan-a) and transformed (B16-F10) melanocytes**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2019.

ASTIZ, M.; HEYDE, I.; OSTER, H. Mechanisms of communication in the Mammalian Circadian timing system. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 2, p. 343–357, 2019.

BALSALOBRE, A.; DAMIOLA, F.; SCHIBLER, U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. **Cell**, v. 93, n. 6, p. 929-937, 1998.

BALSALOBRE, A. *et al.* Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. **Science**, v. 289, n. 5488, p. 2344-2347, 2000.

BAŞ, E.; NAZIROĞLU, M.; PECZE, L. ADP-Ribose and oxidative stress activate TRPM8 channel in prostate cancer and kidney cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

BASTIAAN, C. et al. Neonatal rat cardiomyocytes as an in vitro model for circadian rhythms in the heart. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 112, p. 58-63, 2017.

BERSON, D. M.; CASTRUCCI, A. M.; PROVENCIO, I. Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice. **Journal of comparative neurology**, v. 13, n. 518, p. 24052422, 2010.

BHADRA, U. *et al.* Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human. **Sleep medicine**, v. 35, p. 49-61, 2017.

BORDICCHIA, M. *et al.* Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 3, p. 1022–1036, 2012.

BRENNER, M. *et al.* Diverse Biological Actions of Atrial Natriuretic. **Physiological reviews**, v. 70, n. 3, p. 665–699, 1990.

BROWN, A. J.; PENDERGAST, J. S.; YAMAZAKI, S. Peripheral Circadian Oscillators. **Yale journal of biology and medicine**, v. 92, p. 327–335, 2019.

BROWN, S. A. *et al.* Rhythms of Mammalian Body Temperature Can Sustain Peripheral Circadian Clocks. **Current biology**, v. 12, n. 18, p. 1574–1583, 2002.

BROWN, S. A.; AZZI, A. Peripheral circadian oscillators in mammals. **Circadian clocks**, p. 45-66, 2013.

BROWN, S. A.; KOWALSKA, E.; DALLMANN, R. (Re)inventing the Circadian Feedback Loop. **Developmental cell**, v. 22, n. 3, p. 477–487, 2012.

BUHR, E. D. *et al.* Neuropsin (OPN5) mediates local light-dependent induction of circadian clock genes and circadian photoentrainment in exposed murine skin. **Current biology**, v. 29, n. 20, p. 3478–3487, 2019.

BUHR, E. D.; YOO, S.-H.; TAKAHASHI, J. S. Temperature as a Universal Resetting Cue for Mammalian Circadian Oscillators. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 379–385, 2010.

BUIJS, F. N. *et al.* Suprachiasmatic nucleus interaction with the arcuate nucleus; Essential for organizing physiological rhythms. **Eneuro**, v. 4, n. 2, p. 1–14, 2017.

BUSSIÈRE, E. MS.; UNDERHILL, L. G.; ALTWEGG, R. Patterns of bird migration phenology in South Africa suggest northern hemisphere climate as the most consistent driver of change. **Global change biology**, v. 21, n. 6, p. 2179-2190, 2015.

CATERINA, M. J. *et al.* A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. **Nature**, v. 398, n. 6726, p. 436–441, 1999.

CHAURASIA, S. S. *et al.* Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (Opn4): Differential regulation of expression in pineal and retinal cell types. **Journal of neurochemistry**, v. 92, n. 1, p. 158–170, 2005.

CHEN, W. *et al.* Atrial natriuretic peptide enhances microvascular albumin permeability by the caveolae-mediated transcellular pathway. **Cardiovascular research**, v. 93, n. 1, p. 141–151, 2012.

CHENG, Q. *et al.* Reduced cardiac ischemia/reperfusion injury by hypothermic reperfusion via activation of transient receptor potential M8 channel. **Life sciences**, v. 232, p. 116658, 2019.

CHOWDHURY, D. *et al.* Understanding quantitative circadian regulations are crucial towards advancing chronotherapy. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 883, 2019.

CLERICO, A.; VITTORINI, S.; PASSINO, C. Circulating forms of the b-type natriuretic peptide prohormone: pathophysiologic and clinical considerations. **Advances in clinical chemistry**, v. 58, p. 31, 2012.

COLLINS, S. A heart-adipose tissue connection in the regulation of energy metabolism. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 3, p. 157–163, 2014.

CRNKO, S. *et al.* Circadian rhythms and the molecular clock in cardiovascular biology and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 7, p. 437-447, 2019.

DAMIOLA, F. *et al.* Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. **Genes and development**, v. 14, n. 23, p. 2950–2961, 2000.

DAVIES, W. I. L. *et al.* Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 24, p. 4115–4132, 2011.

DE ASSIS, L. V. M. *et al.* The effect of white light on normal and malignant murine melanocytes: A link between opsins, clock genes, and melanogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 6, p. 1119–1133, 2016.

DE ASSIS, L. V. M.; MORAES, M. N.; CASTRUCCI, A. M. D. L. Heat shock antagonizes UVA-induced responses in murine melanocytes and melanoma cells: An unexpected interaction. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 16, n. 5, p. 633–648, 2017.

DE ASSIS, L. V. M.; OSTER, H. The circadian clock and metabolic homeostasis: entangled networks. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-25, 2021.

DE BOLD, A. J. *et al.* A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life sciences**, v. 28, n. 1, p. 89–94, 1981.

DIBNER, C.; SCHIBLER, U.; ALBRECHT, U. The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 517–549, 2010.

DOYLE, S. E. *et al.* Nonvisual light responses in the Rpe65 knockout mouse: Rod loss restores sensitivity to the melanopsin system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 27, p. 10432–10437, 2006.

DURGAN, D. J. *et al.* The intrinsic circadian clock within the cardiomyocyte. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 4, p. H1530-H1541, 2005.

DURGAN, D. J. *et al.* Evidence Suggesting that the Cardiomyocyte Circadian Clock Modulates Responsiveness of the Heart to Hypertrophic Stimuli in Mice. **Chronobiology international**, v. 28, n. 3, p. 187–203, 2011a.

DURGAN, D. J. *et al.* O-glcNacylation, novel post-translational modification linking myocardial metabolism and cardiomyocyte circadian clock. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 52, p. 44606–44619, 30 dez. 2011b.

ECKEL-MAHAN, K.; SASSONE-CORSI, P. Metabolism and the circadian clock converge. **Physiological reviews**, v. 93, n. 1, p. 107–135, 2013.

EHLER, Elisabeth; MOORE-MORRIS, Thomas; LANGE, Stephan. Isolation and culture of neonatal mouse cardiomyocytes. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 79, p. e50154, 2013.

ENGELI, S. *et al.* The Journal of Clinical Investigation Natriuretic peptides enhance the oxidative capacity of human skeletal muscle. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 12, p. 4675–4679, 2012.

FLOCKERZI, V.; NILIUS, B. TRPs: Truly Remarkable Proteins. In: **Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels**. Berlin: Springer, 2014. v. 222p. 1–12.

FU, S. *et al.* Synthesis, secretion, function, metabolism and application of natriuretic peptides in heart failure. **Journal of biological engineering**, v. 12, n. 1, p. 1–21, 2018.

GARAMI, M.; GARDNER, D. G. An E-box motif conveys inhibitory activity on the atrial natriuretic peptide gene. **Hypertension**, v. 28, n. 2, p. 315–319, 1996.

GARAULET, M.; GÓMEZ-ABELLÁN, P. Timing of food intake and obesity: A novel association. **Physiology and behavior**, v. 134, p. 44–50, 2014.

GLEZEVA, N. *et al.* Attenuation of monocyte chemotaxis—a novel anti-inflammatory mechanism of action for the cardio-protective hormone B-type natriuretic peptide. **Journal of cardiovascular translational research**, v. 6, n. 4, p. 545–557, 2013.

GOETZE, J. P. *et al.* Chamber-dependent circadian expression of cardiac natriuretic peptides. **Regulatory peptides**, v. 160, n. 1–3, p. 140–145, 2010.

HARMER, S. L.; PANDA, S.; KAY, S. A. Molecular bases of circadian rhythms. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 17, n. 1, p. 215–253, 2001.

HASTINGS, M. H.; MAYWOOD, E. S.; BRANCACCIO, M. The mammalian circadian timing system and the suprachiasmatic nucleus as its pacemaker. **Biology**, v. 8, n. 1, p. 13, 2019.

HIRAYAMA, M.; MURE, L. S.; PANDA, S. Circadian regulation of energy intake in mammals. **Current opinion in physiology**, v. 5, p. 141–148, 2018.

HOEBART, C. *et al.* No functional TRPA1 in cardiomyocytes. **Acta Physiologica**, p. e13659, 2021.

HSIEH, P. N.; ZHANG, L.; JAIN, M. K. Coordination of cardiac rhythmic output and circadian metabolic regulation in the heart. **Cellular and molecular life sciences**, v. 75, n. 3, p. 403–416, 2017.

HUGHES, S. *et al.* Signalling by melanopsin (OPN4) expressing expressing photosensitive retinal ganglion cells. **Nature**, v. 30, n. 2, p. 247–254, 2016.

HUSSE, J.; EICHELE, G.; OSTER, H. Synchronization of the mammalian circadian timing system: light can control peripheral clocks independently of the SCN clock: alternate routes of entrainment optimize the alignment of the body's circadian clock network with external time. **BioEssays**, v. 37, n. 10, p. 1119-1128, 2015.

HUSSEIN, L. E. C.; MOLLARD, P.; BONNEFONT, X. Molecular and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 8, p. 2052, 2019.

ISOLDI, M. C. *et al.* Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 4, p. 1217–1221, 2005.

KECSKÉS, M. *et al.* The Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 is a negative regulator of angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. **Basic Research in Cardiology**, v. 110, n. 4, 8 jul. 2015.

KERKELÄ, R.; ULVILA, J.; MAGGA, J. Natriuretic peptides in the regulation of cardiovascular physiology and metabolic events. **Journal of the american heart association**, v. 4, n. 10, p. 1–13, 2015.

KOCKSKÄMPER, J. *et al.* Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 45, n. 2, p. 128–147, 2008.

KOFUJI, P. *et al.* Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) are necessary for light entrainment of peripheral clocks. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0168651, 2016.

KOHSAKA, A. *et al.* Integration of metabolic and cardiovascular diurnal rhythms by circadian clock. **Endocrine journal**, v. 59, n. 6, p. 447–456, 2012.

KONOPKA, R. J.; BENZER, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 9, p. 2112–2116, 1971.

KOZYREVA, T. V.; KOZARUK, V. P.; MEYTA, E. S. Skin TRPA1 ion channel participates in thermoregulatory response to cold. Comparison with the effect of TRPM8. **Journal of thermal biology**, v. 84, p. 208-213, 2019.

LAFONTAN, M. *et al.* Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP. **Trends in endocrinology and metabolism**, v. 19, n. 4, p. 130–137, 2008.

LAMMEL, S.; DÖLEN, G.; MALENKA, R. Optogenetic approaches to neural circuit analysis in the mammalian brain. In: **Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry**. Academic Press, 2016. p. 221-231.

LEE, Y.; MONTELL, C. *Drosophila* TRPA1 Functions in Temperature Control of Circadian Rhythm in Pacemaker Neurons. **The Journal of neuroscience**, v. 33, n. 16, p. 6716–6725, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOWREY, P. L.; TAKAHASHI, J. S. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 5, n. 1, p. 407–441, 2004.

MANGIAFICO, S. *et al.* Neutral endopeptidase inhibition and the natriuretic peptide system: An evolving strategy in cardiovascular therapeutics. **European heart journal**, v. 34, n. 12, p. 886–893, 2013.

MORAES, M. N. *et al.* TRPV1 participates in the activation of clock molecular machinery in the brown adipose tissue in response to light-dark cycle. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 2, p. 324–335, 2016.

MORAES, M. N. *et al.* Melanopsin, a Canonical Light Receptor, Mediates Thermal Activation of Clock Genes. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017a.

MORAES, M. N. *et al.* Cold-sensing TRPM8 channel participates in circadian control of the brown adipose tissue. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 12, p. 2415–2417, 2017b.

MORAES, Maria Nathalia *et al.* Opsins outside the eye and the skin: a more complex scenario than originally thought for a classical light sensor. **Cell and Tissue Research**, p. 1-20, 2021.

NAYAK, G. *et al.* Adaptive thermogenesis in mice requires adipocyte light-sensing via Opsin 3. **bioRxiv**, p. 721381- undefined, 1 ago. 2019.

NISHIKIMI, T. *et al.* Diversity of molecular forms of plasma brain natriuretic peptide in heart failure - different proBNP-108 to BNP-32 ratios in atrial and ventricular overload. **Heart failure and cardiomyopathy**, n. 96, p. 432–439, 2009.

NISSILÄ, J. *et al.* Enkephalopsin (OPN3) protein abundance in the adult mouse brain. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 198, n. 11, p. 833–839, 2012.

OLIVER, P. M. *et al.* Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 26, p. 14730–14735, 1997.

ORTIZ, S. B. *et al.* Opsin 3 and 4 mediate light-induced pulmonary vasorelaxation that is potentiated by G protein-coupled receptor kinase 2 inhibition. **American Journal of**

Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, v. 314, n. 1, p. L93–L106, 2018.

PADMANABHAN, K. *et al.* Feedback regulation of transcriptional termination by the mammalian circadian clock PERIOD complex. **Science**, v. 337, n. 6094, p. 599–602, 2012.

PANDA, S. *et al.* Illumination of the Melanopsin Signaling Pathway. **Science**, v. 307, n. 5709, p. 600–604, 2005.

PANDA, S. Circadian physiology of metabolism. **Science**, v. 354, n. 6315, p. 1008–1015, 2016.

PARTCH C. L., GREEN C. B., AND T. J. S. Molecular Architecture of the Mammalian Circadian Clock. **Trends in cell biology**, v. 24, n. 2, p. 90–99, 2014.

PATIL, M. J. *et al.* Sensitization of small-diameter sensory neurons is controlled by TRPV1 and TRPA1 association. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 1, p. 287-302, 2020.

PAULA, A. B. R. **O coração do camundongo como um possível termosensor? Implicações do ácido palmítico nos osciladores circadianos do coração** Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, p. 84. 2020.

PICOT, M. *et al.* A role for blind DN2 clock neurons in temperature entrainment of the *Drosophila* larval brain. **Journal of neuroscience**, v. 29, n. 26, p. 8312–8320, 2009.

POBLETE, I. M. *et al.* Anandamide elicits an acute release of nitric oxide through endothelial TRPV1 receptor activation in the rat arterial mesenteric bed. **The journal of physiology**, v. 568, n. 2, p. 539–551, 2005.

PODOBED, P. *et al.* The day/night proteome in the murine heart. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 307, n. 2, p. R121–R137, 2014.

POLETINI, M. O. *et al.* Nonvisual Opsins and the Regulation of Peripheral Clocks by Light and Hormones. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 5, p. 1046–1055, 1 set. 2015a.

POLETINI, M. O. *et al.* TRP channels: a missing bond in the entrainment mechanism of peripheral clocks throughout evolution. **Temperature**, v. 2, n. 4, p. 522–534, 2 out. 2015b.

POTTER, L. R. Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. **Frontiers in bioscience**, v. 10, n. 1, p. 1205–1220, 2005.

POTTER, L. R. *et al.* Natriuretic Peptides: Their Structures, Receptors, Physiologic Functions and Therapeutic Applications. **Handbook of experimental pharmacology**, n. 191, p. 341–366, 2009.

PREITNER, N. *et al.* The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 251–260, 2002.

PROVENCIO, I. *et al.* Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 1, p. 340–345, 1998.

RALPH, M. R. *et al.* Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. **Science**, v. 247, n. 4945, p. 975–978, 1990.

REFINETTI, R.; MENAKER, M. The circadian rhythm of body temperature. **Physiology & behavior**, v. 51, n. 3, p. 613–637, 1992.

REINKE, H.; ASHER, G. Crosstalk between metabolism and circadian clocks. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 4, p. 227–241, 2019.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**, v. 418, n. 6901, p. 935–941, 2002.

RICHARDS, J.; GUMZ, M. L. Advances in understanding the peripheral circadian clocks. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 9, p. 3602–3613, 2012.

ROENNEBERG, T.; MERROW, M. The circadian clock and human health. **Current biology**, v. 26, n. 10, p. R432–R443, 2016.

ROLLAG, M.; BERSON, D.; PROVENCIO, I. Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. **Journal of biological rhythms**, v. 18, n. 3, p. 227–234, 2003.

ROY, D. et al. Rhodopsin and melanopsin coexist in mammalian sperm cells and activate different signaling pathways for thermotaxis. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020.

RUBATTU, S. *et al.* Association of Atrial Natriuretic Peptide and Type A Natriuretic Peptide Receptor Gene Polymorphisms With Left Ventricular Mass in Human Essential Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, n. 3, p. 499–505, 2006.

RUBATTU, S. *et al.* Molecular Implications of Natriuretic Peptides in the Protection from Hypertension and Target Organ Damage Development. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 4, p. 798, 2019.

RUBY, N. F. Rethinking temperature sensitivity of the suprachiasmatic nucleus. **Journal of biological rhythms**, v. 26, n. 4, p. 368–370, 2011.

SAITO, S.; TOMINAGA, M. Functional diversity and evolutionary dynamics of thermoTRP channels. **Cell Calcium**, v. 57, n. 3, p. 214–221, 2015.

SANGARALINGHAM, S. J. *et al.* The Aging Heart, Myocardial Fibrosis and its Relationship to Circulating C-Type Natriuretic Peptide. **Hypertension**, v. 57, n. 2, p. 201–207, 2011.

SAPER, C. B. *et al.* The hypothalamic integrator for circadian rhythms. **Trends in neurosciences**, v. 28, n. 3, p. 152–157, 2005.

SASSE, P. *et al.* Intracellular Ca²⁺ Oscillations, a Potential Pacemaking Mechanism in Early Embryonic Heart Cells. **The journal of general physiology**, v. 130, n. 2, p. 133–144, 2007.

SCHEER, F. A. J. L. *et al.* Impact of the human circadian system, exercise, and their interaction on cardiovascular function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 47, p. 20541–20546, 2010.

SCHWACHTGEN, L. *et al.* Reference values of NT-proBNP serum concentrations in the umbilical cord blood and in healthy neonates and children. **Zeitschrift für Kardiologie**, v. 94, n. 6, p. 399–404, 2005.

SCOTLAND, R. S. *et al.* C-type natriuretic peptide inhibits leukocyte recruitment and platelet – leukocyte interactions via suppression of P-selectin expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 40, p. 14452–14457, 2005.

SHEN, W. L. *et al.* Function of Rhodopsin in Temperature Discrimination in *Drosophila*. **Science**, v. 331, n. 6022, p. 1333–1336, 2011.

SHINOHARA, Y. *et al.* Temperature-Sensitive Substrate and Product Binding Underlie Temperature-Compensated Phosphorylation in the Clock. **Molecular Cell**, v. 67, n. 5, p. 783- 798. e20, 2017.

SMITH, J. *et al.* Diurnal gene expression of lipolytic natriuretic peptide receptors in white adipose tissue. **Endocrine connections**, v. 4, n. 4, p. 206, 2015.

SONG, W.; WANG, H.; WU, Q. Atrial Natriuretic Peptide in Cardiovascular Biology and Disease (NPPA). **Gene**, v. 569, n. 1, p. 1–6, 2015.

SONODA, T. *et al.* Melanopsin phototransduction is repurposed by ipRGC subtypes to shape the function of distinct visual circuits. **Neuron**, v. 99, n. 4, p. 754- 767. e4, 2019.

SUH, B. C.; HILLE, B. PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: How and why? **Annual Review of Biophysics**, v. 37, p. 175–195, 2008.

SULLIVAN, M. N.; EARLEY, S. TRP channel Ca²⁺ sparklets: Fundamental signals underlying endothelium-dependent hyperpolarization. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 305, n. 10, p. C999–C1008, 2013.

TAKAHASHI, J. S. Finding new clock components: Past and future. **Journal of biological rhythms**, v. 19, n. 5, p. 339–347, 2004.

TAKAHASHI, J. S. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 3, p. 164-179, 2017.

TAMURA, N. *et al.* Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 8, p. 4239–4244, 2000.

THEILIG, F.; WU, Q. ANP-induced signalling cascade and its implications in renal pathophysiology. **American journal of physiology-renal physiology**, v. 308, n. 10, p. F1047–F1055, 2015.

TSAI, J. W. *et al.* Melanopsin as a sleep modulator: circadian gating of the direct effects of light on sleep and altered sleep homeostasis in *Opn4^{-/-}* mice. **PLoS biology**, v. 7, n. 6, p. e1000125, 2009.

TSUTSUMI, M. *et al.* Expressions of rod and cone photoreceptor-like proteins in human epidermis. **Experimental dermatology**, v. 18, n. 6, p. 567–570, 2009.

VERSTEVEN, M.; ERNST, K.; STANEWSKY, R. A robust and self-sustained peripheral circadian oscillator reveals differences in temperature compensation properties with central brain clocks. **IScience**, v. 23, n. 8, p. 101388, 2020.

VOLPE, M.; RUBATTU, S.; BURNETT, J. Natriuretic peptides in cardiovascular diseases: current use and perspectives. **European heart journal**, v. 35, n. 7, p. 419-425, 2014.

VRIENS, J. *et al.* Opening of an alternative ion permeation pathway in a nociceptor TRP channel. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 3, p. 188–195, 2014.

WANG, L.; WANG, D. H. TRPV1 Gene Knockout Impairs Postischemic Recovery in Isolated Perfused Heart in Mice. **Circulation**, v. 1, n. 23, p. 3617–3623, 2005.

WELSH, D. K.; TAKAHASHI, J. S.; KAY, S. A. Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 551–577, 2009.

WEST, A. C.; BECHTOLD, D. A. The cost of circadian desynchrony: Evidence, insights and open questions. **Bioessays**, v. 37, n. 7, p. 777-788, 2015.

WONG, P. C. Y.; GUO, J.; ZHANG, A. The renal and cardiovascular effects of natriuretic peptides. **Advances in physiology education**, v. 41, n. 2, p. 179–185, 2017.

WU, L.; OUYANG, Q.; WANG, H. Robust network topologies for generating oscillations with temperature-independent periods. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. 1–19, 2017.

XUE, T. *et al.* Melanopsin Signaling in Mammalian Iris and Retina. **Nature**, v. 479, n. 7371, p. 67–73, 2011.

YAGITA, K.; OKAMURA, H. Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. **FEBS letters**, v. 465, n. 1, p. 79-82, 2000.

YAN, W. *et al.* Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 15, p. 8525–8529, 2000.

YASODA, A. *et al.* Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias. **Endocrinology**, v. 150, n. 7, p. 3138–3144, 2009.

YAU, K.; HARDIE, R. C. Phototransduction motifs and variations. **Cell**, v. 2, n. 139, p. 246–264, 2009.

YOUNG, M. E. *et al.* Intrinsic Diurnal Variations in Cardiac Metabolism and Contractile Function. **Circulation research**, v. 89, n. 12, p. 1199–1208, 2001.

YUE, Z. *et al.* Role of trp channels in the cardiovascular system. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, n. 3, p. H157–H182, 2015.

ZHANG, E. E.; KAY, S. A. Clocks not winding down: unravelling circadian networks. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 11, p. 764-776, 2010.

ZHANG, K. X. *et al.* Violet-light suppression of thermogenesis by opsin 5 hypothalamic neurons. **Nature**, v. 585, n. 7825, p. 420–425, 17 set. 2020.

ZHONG, B. *et al.* Genetic ablation of TRPV1 exacerbates pressure overload-induced cardiac hypertrophy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 99, p. 261-270, 2018.

9. ANEXO

ANEXO A: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Comissão de Ética
no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Os efeitos do meio hiperglicêmico sobre os genes do relógio em cultura de cardiomiócitos submetidos ao ciclo claro/escuro", protocolada sob o CEUA nº 9621230419 (ID 000185), sob a responsabilidade de **Mauro César Isoldi e equipe; Franciane Toledo Nogueira ; Denise Coutinho de Miranda; Ana Beatriz Rezende Paula** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 26/04/2019.

We certify that the proposal "The effects of the hyperglycogenic medium on the clock genes in culture of cardiomyocytes submitted to the light / dark cycle", utilizing 280 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 9621230419 (ID 000185), under the responsibility of **Mauro César Isoldi and team; Franciane Toledo Nogueira ; Denise Coutinho de Miranda; Ana Beatriz Rezende Paula** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 04/26/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**
(Acadêmica)

Vigência da Proposta: de **05/2019** a
05/2023

Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Centro de Ciência**

Animal Espécie:

sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **1 a 3 dias** N: **280**

Camundongos

isogênicos

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **1 a 5 g**

Local do experimento: **Laboratório de Sinalização Celular, ICEB II, UFOP.**

Ouro Preto, 08 de abril de 2020

Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso Coordenadora da
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

