

Universidade Federal de Ouro Preto

Escola de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição
PPGSN

Dissertação

**Exposição ao frio e seus
efeitos na expressão gênica
do coração de camundongos
alimentados com *high-fat
diet***

Bianca Iara Campos Coelho

Ouro Preto
2023



UFOP

BIANCA IARA CAMPOS COELHO

**EXPOSIÇÃO AO FRIO E SEUS EFEITOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DO
CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM *HIGH-FAT DIET***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição, da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Nutrição.

Área de Concentração: Bases Experimentais em Saúde, Alimentos e Nutrição.

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

Ouro Preto – MG

2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C672e Coelho, Bianca Lara Campos.
Exposição ao frio e seus efeitos na expressão gênica do coração de camundongos alimentados com high-fat diet. [manuscrito] / Bianca Lara Campos Coelho. - 2023.
72 f.

Orientador: Prof. Dr. Mauro César Isoldi.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição.

Área de Concentração: Saúde e Nutrição.

1. Canais TRP. 2. Coração. 3. Dieta Hiperlipídica. 4. Peptídeos Natriuréticos. I. Isoldi, Mauro César. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 613.2

Bibliotecário(a) Responsável: Sônia Marcelino - CRB6/2247



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE NUTRICAÇÃO
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM SAÚDE E NUTRICAÇÃO



FOLHA DE APROVAÇÃO

Bianca Iara Campos Coelho

Exposição ao frio e seus efeitos na expressão gênica do coração de camundongos alimentados com high-fat diet

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

Aprovada em 17 de agosto de 2023.

Membros da banca

Dr. Mauro César Isoldi - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra. Fernanda Cacilda dos Santos Silva (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra. Maria Cecília Teles (Centro Universitário Santa Rita)

Mauro César Isoldi, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 07 de novembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cesar Isoldi, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 08/11/2023, às 08:25, 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 **0620637** e o código CRC **489E9D96**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me conduzido até aqui, sem Ele nada disso seria possível. Sou imensamente grata por todas as experiências vivenciadas ao longo desses anos.

Sou grata ao meu amado marido Paulo Henrique por sempre me apoiar para ir em busca de meus sonhos. Gratidão aos meus amados pais, Lislei Coelho e Volnei Coelho, por sempre me apoiarem em meus estudos. Ao meu amado irmão Arthur Coelho por sempre acreditar em mim. As minhas amadas avós, Luiza Lima e Maria Coelho, por todo apoio e carinho. Sou grata a todos meus familiares e amigos que sempre torceram por mim.

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Mauro César Isoldi, por abrir as portas de seu laboratório para mim e por sempre acreditar em meu potencial. Sou grata por todos os ensinamentos e experiências adquiridas.

Agradeço a Professora Doutora Ana Maria de Lauro Castrucci por me conceder a honra em contribuir um pouquinho para seu belo temático, e ao seu doutorando Cristhian Sua Cespedes por toda parceria.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Sinalização Celular, por toda parceria, em especial a minha amiga Letícia Resende, Ana Beatriz, Alexandre Portes e Isabela Jardim, pessoas maravilhosas que levarei com muito carinho em meu coração.

Agradeço aos meus amigos do PPGSN por toda parceria de sempre, Larissa, Vanessa, Thais, Alessandro e Yago, vocês contribuíram para toda essa jornada. Tenho muito carinho por vocês.

Agradeço a banca examinadora, por aceitarem o convite e pela participação.

Agradeço a todos os funcionários da UFOP por serem sempre solícitos.

À UFOP, ao PPGSN, à ENUT, ao CCA, por todo auxílio ao desenvolvimento desta pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. À FAPEMIG 11742, à CAPES, ao CNPq, à USP e FAPESP (Processo nº 17/24615-5) pelo auxílio e financiamento que possibilitou a realização desta pesquisa.

“Seja forte e corajoso, porque você conduzirá esse povo para herdar a terra que prometi sob juramento aos seus antepassados. Somente seja forte e muito corajoso! Tenha o cuidado de obedecer a toda a lei que o meu servo Moisés lhe ordenou; não se desvie dela, nem para a direita, nem para a esquerda, para que você seja bem-sucedido por onde quer que andar. Não deixe de falar as palavras deste Livro da Lei e de meditar nelas de dia e de noite, para que você cumpra fielmente tudo o que nele está escrito. Só então os seus caminhos prosperarão e você será bem-sucedido. Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

(Josué 1:6-9)

RESUMO

A melanopsina (OPN4) é um fotorreceptor e termo sensor cuja expressão é observada em vários órgãos e tecidos, sendo o coração altamente expresso. Além disso, a expressão dos canais de potencial receptor transitório (TRP) parece estar associada à expressão de OPN4 na retina e supostamente no coração. Partimos da hipótese que a OPN4, juntamente com os canais TRP no coração, atuam monitorando as variações de temperatura interna através do sangue proveniente dos pulmões, possivelmente promovendo a liberação e expressão de seus principais hormônios, os peptídeos natriuréticos (NPs). Fatores como a temperatura do ambiente e alimentação desequilibrada, prejudicam a homeostase cardíaca, causando efeitos prejudiciais na sua estrutura e função, potencialmente desencadeando doenças cardiovasculares. Portanto, o objetivo do estudo é avaliar os efeitos da exposição ao frio e a ausência do canal TRPA1 sobre a expressão gênica de *Opn4*, *Trpv1*, *Trpa1*, *Trpm8*, *Nppa* e *Nppb*, em átrios e ventrículos do coração de camundongos alimentados com *high-fat diet*. Foram utilizados 24 camundongos machos C57BL/6J e *Trpa1 KO*, divididos em 4 grupos experimentais e expostos a temperaturas de 30°C e 22°C. Os resultados de PCR quantitativo indicaram que a expressão de *Opn4* nos átrios, à 30°C foi reduzida no grupo *Trpa1 KO*, em 22°C houve aumento na expressão do gene no mesmo grupo e, em ventrículos não apresenta diferenças significativas. Quanto aos canais TRP, no gene *Trpv1* não encontramos diferenças significativas. *Trpa1* átrios não houve diferenças significativas, ventrículos à 22°C indicaram redução na expressão. *Trpm8* átrios, à 30°C temos redução da expressão do gene no grupo *Trpa1 KO*, à 22°C resultou em redução na expressão em camundongos C57BL/6J, enquanto, que no grupo *Trpa1 KO*, houve aumento da expressão. Já em ventrículos, à 30°C resultou em aumento na expressão de *Trpm8* no grupo *Trpa1 KO* e, em C57BL/6J aumento na expressão à 22°C. Nos NPs, a expressão de *Nppa* não apresentou diferenças significativas. *Nppb* em átrios, indicou redução na expressão à 22°C, tanto em C57BL/6J como *Trpa1 KO*. Já em ventrículos, *Nppb* não apresentou diferenças significativas. Podemos concluir que a OPN4 e os canais TRP possivelmente possam estar atuando como termo sensores no coração, e as flutuações de temperatura afetam a expressão dos NPs nas câmaras cardíacas.

Palavras-chave: Canais TRP; Coração, Exposição ao frio; *High-fat diet*, Melanopsina; Peptídeos natriuréticos.

ABSTRACT

Melanopsin (OPN4) is a photoreceptor and thermosensor whose expression is observed in various organs and tissues, with the heart being highly expressed. Furthermore, the expression of transient receptor potential (TRP) channels appears to be associated with OPN4 expression in the retina and putatively in the heart. We start from the hypothesis that OPN4, together with TRP channels in the heart, act by monitoring variations in internal temperature through blood from the lungs, possibly promoting the release and expression of its main hormones, natriuretic peptides (NPs). Factors such as environmental temperature and an unbalanced diet impair cardiac homeostasis and have harmful effects on its structure and function, potentially triggering cardiovascular diseases. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of cold exposure and the absence of the TRPA1 channel on the gene expression of *Opn4*, *Trpv1*, *Trpa1*, *Trpm8*, *Nppa*, and *Nppb* in the atria and ventricles of the heart of mice fed a high-fat diet. 24 male C57BL/6J and *Trpa1* KO mice were used, divided into 4 experimental groups, and exposed to temperatures of 30°C and 22°C. The results of quantitative PCR indicated that the expression of *Opn4* in the atria at 30°C was reduced in the *Trpa1* KO group, whereas at 22°C, there was an increase in gene expression in the same group and, in the ventricles, there were no significant differences. As for TRP channels, in the *Trpv1* gene we did not find significant differences. *Trpa1* atria there were no significant differences, ventricles at 22°C indicated a reduction in expression. *Trpm8* atria, at 30°C we have a reduction in gene expression in the *Trpa1* KO group, at 22°C it resulted in a reduction in expression in C57BL/6J mice, while in the *Trpa1* KO group, there was an increase in expression. In the ventricles, 30°C resulted in an increase in *Trpm8* expression in the *Trpa1* KO group and, in C57BL/6J, an increase in expression at 22°C. In NPs, *Nppa* expression did not show significant differences. *Nppb* in the atria indicated reduced expression at 22°C in both C57BL/6J and *Trpa1* KO mice. In the ventricles, *Nppb* levels did not show significant differences. We can conclude that OPN4 and TRP channels may act as thermal sensors in the heart, and temperature fluctuations affect the expression of NPs in the heart chambers.

Keywords: TRP Channels; Heart, Exposure to cold; High-fat diet; Melanopsin; Natriuretic peptides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho experimental.....	34
Figura 2 - Peso do coração de camundongos C57BL/6J e <i>TrpA1</i> KO, expostos às temperaturas de 30°C e 22°C, alimentados com HFD.....	39
Figura 3 - Expressão do gene <i>Opn4</i> em explantes cardíacos de camundongos alimentados com HFD.....	40
Figura 4 - Expressão do gene <i>Trpv1</i> em explantes cardíacos de camundongos alimentados com HFD.....	40
Figura 5 - Expressão do gene <i>Trpa1</i> em explantes cardíacos de camundongos alimentados com HFD.....	41
Figura 6 - Expressão do gene <i>Trpm8</i> em explantes cardíacos de camundongos alimentados com HFD.....	42
Figura 7 - Expressão do gene <i>Nppa</i> em explantes cardíacos de camundongos alimentados com HFD.....	42
Figura 8 - Expressão do gene <i>Nppb</i> em explantes cardíacos de camundongos alimentados com HFD.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de <i>primers</i> para qPCR.....	38
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	Peptídeo natriurético atrial
Akt	Serina-treonina quinase
AVC	Acidente vascular cerebral
BCP	1-bromo-3-cloropropano
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
Ca ²⁺	Cálcio
CCA	Centro de Ciência Animal
CD	Cardiomiopatia diabética
CNP	Peptídeo natriurético tipo C
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DCVs	Doenças cardiovasculares
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
HFD	<i>High-fat diet</i>
IB-USP	Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo
ipRGCs	Células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina
K ⁺	Potássio
Na ⁺	Sódio
NO	Óxido nítrico
NPs	Peptídeos natriuréticos
NSQ	Núcleo supraquiasmático
OPN4	Melanopsina
pFSA	Pó de amoras secas
PGK	<i>Protein kinase G</i>
PLC β 4	Fosfolipase C
proANP	Pró-hormônio de ANP
proBNP	Pró-hormônio de BNP
qPCR	PCR quantitativo

RT-PCR	Reação de transcriptase reversa
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
STAT3	Proteína <i>signal transducers and activators of transcription</i>
TAE	Tecido adiposo epicárdico
TAP	Tecido adiposo paracárdico
TFEB	Fator de transcrição EB
TRPA	Canais de potencial receptor transitório anquirina
TRPC	Canais de potencial receptor transitório canônico ou clássico
TRPM	Canais de potencial receptor transitório melastatina
TRPML	Canais de potencial receptor transitório mucolipina
TRPN	Canais de potencial receptor transitório sem potencial mecanorreceptor
TRPP	Canais de potencial receptor transitório policistina
TRPV	Canais de potencial receptor vaniloide
TRP	Canais de potencial receptor transitório
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	CORAÇÃO	17
2.2	EXPOSIÇÃO AO FRIO E CORAÇÃO	18
2.3	<i>HIGH-FAT DIET</i> E CORAÇÃO	20
2.4	PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS	22
2.5	MELANOPSINA	26
2.6	CANAIS TRP	28
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL	33
4.2	ACLIMATAÇÃO À TERMONEUTRALIDADE	34
4.3	EXPOSIÇÃO ÀS TEMPERATURAS DE 22°C E 30°C	35
4.4	PROTOCOLO DE 8 SEMANAS COM HFD	35
4.5	EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS	35
4.6	PCR QUANTITATIVO	36
4.6.1	Extração do RNA	36
4.6.2	RT-PCR (reação de transcriptase reversa)	36
4.6.3	PCR quantitativo (qPCR)	37
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5	RESULTADOS	39
5.1	PESO DO CORAÇÃO DE ANIMAIS C57BL/6J E <i>TRPA1 KO</i>	39

5.2 NÍVEL DE EXPRESSÃO DO GENE <i>OPN4</i> EM EXPLANTES DAS DIFERENTES CÂMARAS CARDÍACAS EM RELAÇÃO AS TEMPERATURAS	39
5.3 NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS GENES DOS CANAIS <i>TRPV1</i> , <i>TRPA1</i> E <i>TRPM8</i> EM EXPLANTES DAS DIFERENTES CÂMARAS CARDÍACAS EM RELAÇÃO ÀS TEMPERATURAS.....	40
5.4 NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS GENES DOS PRÓ-HORMÔNIOS <i>NPPA</i> E <i>NPPB</i> EM EXPLANTES DAS DIFERENTES CÂMARAS CARDÍACAS EM RELAÇÃO ÀS TEMPERATURAS.....	42
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS	68
ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	68
ANEXO B - VALIDAÇÃO DA GENOTIPAGEM <i>TRPA1</i> KO.....	69
ANEXO C - CURVA DE <i>MELTING</i> REFERENTE A AMPLIFICAÇÃO DO <i>NPPA</i>	70

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) têm despertado uma crescente preocupação no campo da saúde pública devido à sua ampla gama de condições patológicas, como a doença arterial coronariana, o acidente vascular cerebral (AVC) e a insuficiência cardíaca (ALAHMAD *et al.*,2023). Essas enfermidades são amplamente reconhecidas como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em escala global (FAN *et al.*,2023).

Nossa pesquisa aqui apresentada está vinculada ao projeto temático “*Derrubando um paradigma? Melanopsina, um fotorreceptor canônico, atuando como sensor para ajuste do relógio em órgãos não expostos à luz, e sua possível interação com canais TRP: estudo transdisciplinar envolvendo aspectos fisiológicos e patológicos*” sob coordenação da professora Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci (USP) e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob o processo: 2017/24615-5, cujo o professor Dr. Mauro César Isoldi (UFOP) se encontra como professor associado. Resumidamente, a hipótese deste temático é que a melanopsina (OPN4) juntamente com os canais de potencial receptor transitório (TRP), ambos expressos no coração, monitoram entre outros possíveis sinais, a variação da temperatura interna e o metabolismo local, levando à secreção de fatores natriuréticos que atuam estimulando a termogênese nos tecidos adiposos branco e marrom. Pergunta-se, quais os ajustes nesse sistema em extremos metabólicos: obesidade e caquexia por câncer.

Desde a descoberta da OPN4 em 1998 pelo grupo de pesquisa de Ignacio Provencio e Mark Rollag, nos EUA, investigações a respeito do papel dessa opsina vêm sendo realizadas. Dentre as suas funções, temos a canônica de fotorreceptora (PROVENCIO; ROLLAG; CASTRUCCI, 2002), e sua função como um termo sensor (MORAES *et al.*,2017), sendo sua expressão já localizada em diversos órgãos e tecidos. Dentre os órgãos mencionados “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>), apresentando também uma robusta expressão de canais TRP (YUE *et al.*,2015).

Frente a essas analogias, o presente estudo levantou a hipótese de que o coração possa estar atuando como um termo sensor, devido a interação de OPN4 e os canais TRP. Sugerimos que essa interação ocorra devido a recepção de

temperatura do fluxo sanguíneo advindo da circulação sistêmica (periferia) e da circulação pulmonar (trato respiratório). Somado a essas flutuações de temperatura, o coração interpretará levando à liberação e expressão de seus principais hormônios, os peptídeos natriuréticos (NPs), afim de contribuírem para o ajuste do metabolismo local, além de sua ação termogênica. Perguntou-se o quanto esse sistema estaria alterado na ausência do canal TRPA1 em animais no extremo metabólico alimentados por *high-fat diet* (HFD).

Estas investigações foram realizadas no coração de camundongos alimentados com HFD e submetidos a 22°C (desafio ao frio) em comparação com seu controle em termoneutralidade (30°C). A zona de termoneutralidade na qual se insere 30°C (é representada pelo animal não está nem ganhando nem dissipando calor), foi determinada através de análises oriundas do temático por calorimetria indireta. Quanto a temperatura de 22°C, representa-se em desafio ao frio quando comparada a de 30°C, o que poderá causar alterações fisiológicas neste órgão sendo influenciadas pela recepção de temperatura tanto por OPN4 como pelo canal TRPA1.

A literatura evidencia que tanto o frio quanto o consumo de dietas ricas em gorduras apresentam efeitos prejudiciais para o coração e o metabolismo (LIU *et al.*,2023a; KOLLERITSCH *et al.*,2023), resultando em alterações na expressão de genes e hormônios que, por sua vez, afetam a função e a estrutura cardíaca (CHEN *et al.*,2022).

Nesse contexto, por meio deste estudo foi possível investigar os efeitos da exposição ao frio e da ausência do canal TRPA1 sobre a expressão de OPN4, canais TRP e NPs no coração de camundongos alimentados com HFD. Considerando o aumento das DCVs como principal causa de morbidade e mortalidade global, o coração torna-se o órgão central de interesse nessas investigações relacionadas a condições metabólicas. A compreensão de como a exposição ao frio pode modular a expressão gênica do coração em um contexto de dieta pouco saudável pode oferecer *insights* relevantes para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas para DCVs associadas à obesidade e outros fatores de risco.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CORAÇÃO

É de conhecimento geral que o coração é um órgão responsável por bombear o sangue no organismo, fornecendo oxigênio e nutrientes essenciais para os tecidos do corpo (DE OLIVEIRA *et al.*,2020). Anatomicamente, o coração é composto por quatro câmaras distintas: átrio esquerdo, ventrículo esquerdo, átrio direito e ventrículo direito (WANG; HILL, 2010).

Os átrios direito e esquerdo são responsáveis por receber o sangue dos tecidos corporais e dos pulmões respectivamente, atuam como reservatórios temporários, permitindo o acúmulo de sangue antes de ser bombeado para os ventrículos (AIRES, 2018 p.433). Por sua vez, os ventrículos são responsáveis por ejetar o sangue para as artérias. O ventrículo direito impulsiona o sangue com dióxido de carbono para os pulmões para que seja realizada a troca gasosa. Já o ventrículo esquerdo recebe o sangue oxigenado rico em nutrientes, advindo do átrio esquerdo, e o ejeta para a artéria aorta (SILVERTHORN, 2017 p.443-446).

Além das câmaras cardíacas, o coração possui válvulas que se fecham e se abrem devido às mudanças na pressão, que desempenham um papel fundamental na prevenção do retrocesso do sangue durante o processo do ciclo cardíaco (MATHEW; KANMANTHAREDDY, 2022). As válvulas mitral e tricúspide são chamadas de válvulas atrioventriculares devido à sua localização entre os átrios e os ventrículos, cuja principal função é impedir o fluxo sanguíneo retrógrado para os átrios durante a sístole ventricular. Por outro lado, as válvulas aórtica e pulmonar são conhecidas como válvulas semilunares, que se localizam entre os ventrículos e as artérias, cuja função é impedir o fluxo sanguíneo retrógrado para os ventrículos durante a diástole (VACA; BORDONI, 2022).

As diástoles e sístoles podem ser conceituadas como as fases de relaxamento e contração cardíacas, respectivamente, e sabe-se que tais mecanismos se alteram de acordo com as mudanças na pressão recebendo e ejetando o sangue ao longo de todo o ciclo cardíaco (BONNEMAIN, DEL NIDO; ROCHE, 2022). Ainda sobre o contexto da circulação sanguínea do coração, as veias desempenham a função de transporte do sangue em direção ao órgão,

enquanto as artérias possuem a tarefa de distribuí-lo (MOHRMAN; HELLER, 2007 p.21-23).

Deste modo, a coordenação sinérgica entre as quatro câmaras cardíacas desempenha um papel fundamental para assegurar um fluxo sanguíneo apropriado e uma eficiente distribuição de oxigênio e nutrientes em todo o organismo. Assim, a adequada funcionalidade desse órgão ressalta a significância intrínseca dessas estruturas na preservação da saúde cardiovascular e no correto desempenho fisiológico do organismo (SILVERTHORN, 2017 p.437-438).

Visto que a boa funcionalidade cardíaca e a homeostase do organismo são essenciais para a qualidade de vida, como já reconhecido na literatura hábitos prejudiciais à saúde, tais como o sedentarismo, a ingestão de dietas inadequadas, o consumo de álcool e o tabagismo, são fatores de risco significativos associados ao desenvolvimento de DCVs (GRUZDEVA *et al.*, 2022). Essas condições patológicas impactam negativamente o sistema cardiovascular, figurando como importantes causas de morbidade e mortalidade em escala global (TSAO *et al.*, 2023).

Sendo assim, em pesquisas que envolvem metabolismo e DCVs os camundongos C57BL/6J são uma das linhagens mais utilizadas, por se tratarem de um modelo cuja funcionalidade do coração mais se assemelha aos outros mamíferos, incluindo os seres humanos (FUCHS *et al.*, 2018).

O coração é composto por diferentes tipos de células, incluindo cardiomiócitos, células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos cardíacos, cada uma desempenhando um papel específico na contratilidade, condução elétrica e manutenção do tecido cardíaco (GERALD; DORN, 2010; BERS, 2002).

Enfim, o coração é um órgão vital responsável pela circulação sanguínea e pela manutenção da homeostase do organismo (GILSBACH *et al.*, 2014). Para desempenhar suas funções de maneira eficiente, o coração depende de uma complexa rede de genes e hormônios que regulam tanto sua estrutura quanto sua função (ROOIJ; OLSON, 2007).

2.2 EXPOSIÇÃO AO FRIO E CORAÇÃO

A temperatura do ambiente exerce forte influência sobre os organismos vivos, como por exemplo no metabolismo, afetando os processos bioquímicos,

sobrevivência, reprodução, desenvolvimento e taxa de crescimento (HUDA *et al.*, 2022).

Para se adaptarem a variações de temperatura, os organismos vivos utilizam alguns processos, como exemplo: aclimatação e adaptação genética (COLLIER *et al.*, 2018). A aclimatação envolve mudanças reversíveis na expressão de genes ou na atividade enzimática, permitindo que os organismos se ajustem a novas condições térmicas. Por outro lado, organismos nos quais surgem características que aprimoram seu desempenho em determinadas faixas de temperatura, sofrerão a seleção natural (CHAO *et al.*, 2020; SENGUPTA; GARRITY, 2013; FRANKS; HOFFMANN, 2012).

A literatura tem evidenciado que a exposição a ambientes frios provoca uma série de modificações no organismo humano e animal. O estresse causado pelo frio acarreta consequências, incluindo mudanças no metabolismo energético, sistema neuroendócrino, imunidade, sistemas antioxidantes, comportamento e emoção (HU; LIU; LI, 2022). Quando exposto ao frio, o organismo responde com vasoconstrição, uma rápida redução da temperatura periférica e uma intensa contração dos vasos sanguíneos nas extremidades, abrangendo todo o organismo nesse processo, incluindo o coração (CASTELLANI; TIPTON, 2015).

O coração é um órgão que sofre com as variações de temperatura, em condições que é exposto ao desafio de frio, afeta-o negativamente (GIBB; HILL, 2018). Essa condição pode ser identificada por danos em sua estrutura e função, perturbações no metabolismo, aumento do estresse oxidativo, inflamação e apoptose (PORTES *et al.*, 2023).

Como já mencionado, a exposição imediata ao frio pode induzir vasoconstrição que, por sua vez, está associada ao desenvolvimento de hipertensão e hipertrofia cardíaca; no entanto os efeitos específicos desses processos na pressão arterial ainda necessitam de investigação adicional (RUPEREZ *et al.*, 2022). Além disso, estudos têm demonstrado que o frio, além de afetar adversamente a função cardíaca, representa um fator de risco para ocorrência de DCVs, como o infarto do miocárdio, AVC (SHETH *et al.*, 1999), e fibrilação atrial (NGUYEN *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2022). Em países como a Coreia do Sul, Japão, Estados Unidos, Alemanha, dentre outros, estudos epidemiológicos demonstraram que no período de inverno aumenta o risco de AVC (GAO *et al.*, 2019; VAIČIULIS *et al.*, 2023).

A exposição prolongada a temperaturas frias pode resultar em consequências adversas e prejudiciais ao sistema cardiovascular a longo prazo (GIBELIN, 2015). Estudos indicam que indivíduos que residem em regiões caracterizadas por climas frios apresentam uma probabilidade elevada de desenvolver enfermidades cardiovasculares (FAN *et al.*, 2023). Aliás, a exposição a temperaturas extremamente frias pode desencadear a ocorrência de fenômenos como a formação de trombos, aumentando de maneira significativa o risco de complicações cardiovasculares (KEATINGE *et al.*, 1984).

Pesquisadores conduziram um estudo com camundongos C57BL/6J e observaram que a exposição ao frio provoca lesão crônica do miocárdio além de desencadear uma série de respostas patológicas, incluindo estresse oxidativo, apoptose celular, inflamação e piroptose, as quais contribuíram para a ocorrência de lesão cardíaca (LV *et al.*, 2023).

Portanto, é importante destacar que a exposição ao frio, tanto em períodos curtos quanto longos, pode ocasionar modificações significativas nos organismos vivos, especialmente no coração, resultando em remodelamento cardíaco que afeta negativamente a estrutura e a função deste órgão. Além disso, essa exposição pode promover o desenvolvimento de DCVs. Assim, é fundamental compreender e explorar os mecanismos subjacentes a fim de identificar estratégias eficazes para prevenir e tratar tais complicações decorrentes da exposição ao frio.

2.3 HIGH-FAT DIET E CORAÇÃO

O consumo de HFD encontra-se diretamente relacionado ao aumento da incidência de DCVs conforme vem sendo demonstrado pela literatura (CHEN, 2020). Essa ingestão alimentar está associada a diversas DCVs, incluindo, aterosclerose, hipertensão arterial, doença cerebrovascular e doença cardíaca coronária (JAYACHANDRAN; CHUNG; XU, 2019). Logo, o excesso de gordura sobrecarrega o sistema cardiovascular, resultando em elevação da pressão arterial, bem como na propensão à formação de placas nas artérias, o que pode culminar em eventos cardíacos agudos, como infarto do miocárdio ou AVC (WALI *et al.*, 2020).

Levando-se em consideração esses aspectos, as DCVs estão intrinsecamente relacionadas ao estilo de vida das pessoas, constituindo um fator significativo para o desenvolvimento dessas enfermidades (KUNDAPUR *et al.*,

2022). Nesse contexto, a adoção de uma dieta equilibrada, composta por alimentos naturais e nutritivos, tem sido amplamente correlacionada a uma redução do risco de incidência das DCVs e a uma melhora geral na qualidade de vida dos indivíduos (NAWSHERWAN *et al.*, 2022). Chaiwong e colaboradores (2021) constataram que o pó de amoras secas (pFSA) foi capaz de neutralizar patologias no metabolismo e no sistema cardiovascular em camundongos submetidos ao consumo de HFD, incluindo redução do ganho de peso, acúmulo de gordura visceral, níveis de glicose e lipídios no sangue, espessura da parede arterial e cardíaca, além de atenuar a deposição de lipídios no fígado. Sugerem que o pFSA pode ser uma estratégia terapêutica eficaz no tratamento dessas doenças, complementando a adoção de hábitos alimentares saudáveis (CHAIWONG *et al.*, 2021). Portanto, temos que o estilo de vida, em especial a alimentação, desempenha um papel importante na promoção de uma melhor qualidade de vida e na prevenção do surgimento de DCVs.

A ingestão de HFD tem impactos significativos e adversos na saúde cardiovascular, resultando em anomalias cardíacas e obesidade (ZHU *et al.*, 2023). Esses impactos incluem disfunção cardíaca, inflamação e estresse oxidativo, acúmulo de gordura no coração e disfunção endotelial (IZAR *et al.*, 2021). Diante disso, é crucial considerar que o consumo de gorduras constitui um elemento de relevância que requer monitoramento, a fim de possibilitar o controle efetivo e a prevenção no desenvolvimento de DCVs.

O coração pode acumular gordura em três regiões sendo o tecido adiposo epicárdico (TAE), tecido adiposo paracárdico (TAP) e gordura pericárdica (GUTIÉRREZ-CUEVAS *et al.*, 2021). Essas observações estão diretamente relacionadas com o surgimento de DCVs, enfatizando-se a importância do tecido adiposo perivascular, que engloba o TAE adjacente às artérias coronárias, bem como conglomerados de gordura em torno da aorta e das artérias de pequeno e médio calibre (CHISTIAKOV *et al.*, 2017). A proporção de TAE se encontra correlacionada com o fator de obesidade visceral e, conforme a literatura, adipócitos perivasculares apresentam aumento na expressão de diversos vasoconstritores, como resistina, angiotensina II e quemerina (JIA; JIA; SOWERS, 2016). Dentre os efeitos adversos decorrentes do aumento de TAE no tecido cardíaco, podemos mencionar a calcificação coronariana, compressão natural, formação de placas ateromatosas, expressão de hormônios cardioativos e ácidos graxos livres, além da expressão de adipocinas pró-inflamatórias, o que resulta em alterações morfológicas

(como a hipertrofia do ventrículo esquerdo) e disfuncionais mal adaptativas no coração (GUTIÉRREZ-CUEVAS et al., 2021; KOSMALA; SANDERS; MARWICK, 2017).

Com base nas considerações expostas, é possível afirmar que uma dieta caracterizada por alto teor de gorduras acarreta efeitos prejudiciais e adversos ao funcionamento e à estrutura cardíaca. Esses efeitos comprometem a capacidade adequada de desempenho cardíaco e se correlacionam com o surgimento de DCVs, evidenciando assim, a necessidade contínua pela busca de novas pesquisas e métodos que contribuam para a compreensão desse tema.

2.4 PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS

Os NPs são hormônios sintetizados e secretados pelas células cardíacas conhecidas como cardiomiócitos. Esses peptídeos exercem uma variedade de efeitos sistêmicos abrangentes, que vão desde a regulação da pressão arterial até a modulação do metabolismo de glicose e lipídios (SHI *et al.*, 2021). As propriedades cardiometabólicas desses NPs são diversas e incluem a promoção da vasodilatação, aumento da excreção de Na⁺, inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e estímulo à mobilização e oxidação de lipídios. Além disso, também estão associados ao *browning* dos adipócitos brancos e ao aprimoramento da sensibilidade à insulina (SARZANI *et al.*, 2022).

Os NPs possuem a capacidade de exercer atividades parácrinas e autócrinas no tecido cardíaco, desempenhando um papel importante na prevenção de condições adversas, como hipertrofia, fibrose, arritmias e cardiomiopatias (RUBATTU *et al.*, 2019). Portanto, desempenham um papel crucial na preservação da saúde cardiovascular, atuando como agentes protetores contra o desenvolvimento de doenças cardíacas (CALVIERI; RUBATTU; VOLPE, 2011).

Os primeiros estudos envolvendo os NPs foram conduzidos por Bold e colaboradores (1981), nos quais se estabeleceu a primeira ligação endócrina entre o coração e os rins, sendo demonstrado que o homogenato atrial em ratos resultava em diurese e natriurese, revelando assim a existência do primeiro membro da família dos NPs, o peptídeo natriurético atrial (ANP). Em seguida, o segundo membro da família dos NPs, o peptídeo natriurético cerebral (BNP), foi descoberto em pesquisas com cérebro suíno (SUDOH *et al.*, 1988), no entanto, estudos posteriores

identificaram sua expressão no coração, mais especificamente nos ventrículos (MUKOYAMA *et al.*,1990). O terceiro membro da família dos NPs, o peptídeo natriurético tipo C (CNP), foi descoberto em 1991 a partir de extratos de cérebro suíno, com base em sua capacidade de promover relaxamento do músculo liso (SUDOH *et al.*, 1990). Essas observações permitiram o reconhecimento do coração como um órgão endócrino, cuja família de hormônios inclui esses três peptídeos de grande importância para a função cardíaca (PANDEY, 2023).

Os NPs são produzidos a partir de proteínas precursoras contendo pré e pró-hormônios inativos. Posteriormente, ocorrem modificações intracelulares nos pró-hormônios (proANP e proBNP), resultando na clivagem desses precursores em suas formas ativas, ANP e BNP, respectivamente (POTTER *et al.*,2009). O pró-hormônio de ANP (proANP) é predominantemente expresso em resposta ao estiramento das paredes atriais em condições fisiológicas normais (SARZANI *et al.*,2022) e seu armazenamento ocorre em grânulos de secreção presentes nos cardiomiócitos. Quando há um aumento na pressão sanguínea nas aurículas cardíacas devido ao excesso de volume ou pressão, as células atriais são distendidas. A liberação do proANP ocorre em resposta a ativação dos receptores de estiramento nas células atriais. Após a liberação de proANP, a enzima corina desempenha um papel crucial na sua conversão para a forma ativa de ANP. A corina cliva o proANP para gerar o ANP em sua forma ativa, ou seja, circulante na corrente sanguínea (DONG *et al.*, 2010). Por outro lado, o pró-hormônio de BNP (proBNP) é expresso principalmente nas câmaras ventriculares (SUDOH *et al.*,1988). Após estiramento nas paredes ventriculares, proBNP é ativado e liberado. A enzima furina é responsável para o processo de conversão de proBNP em BNP, essa enzima cliva o proBNP e gera o BNP em sua forma ativa (NISHIKIMI *et al.*,2015). Logo, observa-se a presença de ANP e BNP em níveis circulantes, com sua expressão e liberação sendo reguladas em resposta ao estresse mecânico (KUWAHARA; NAKAO, 2010). É fundamental salientar que o CNP não exibe propriedades natriuréticas e é predominantemente sintetizado em células vasculares. Além disso, esse peptídeo desempenha principalmente um papel estimulante no crescimento dos ossos longos, embora também possa exercer funções cuja extensão ainda não é plenamente compreendida. (PANDEY, 2005; SUGA *et al.*,1992).

Existem três tipos de receptores para NPs, sendo do tipo A, B e C. NPR-A e NPR-B são receptores de membrana com atividade guanilil ciclase, sendo o NPR-A

o receptor responsável em se ligar à ANP e BNP e, o NPR-B possuindo alta afinidade para o CNP (BENNETT *et al.*,1991). A interação dos receptores NPR-A com o ANP e BNP resulta na geração intracelular do segundo mensageiro monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (SARZANI *et al.*, 2022). Em sua cascata de sinalização subsequente, o GMPc ativa múltiplos alvos, incluindo proteínas quinases dependentes de GMPc, canais iônicos controlados por GMPc e fosfodiesterases de GMPc. Tais mediadores estão envolvidos na maioria dos efeitos biológicos dos NPs (GOETZE *et al.*,2020). A expressão do receptor NPR-A é observada em diversos tecidos, principalmente nos vasos sanguíneos cardíacos, tecidos adiposos, pulmões, cérebro, rins, fígado e glândulas adrenais (NAGASE *et al.*,1997). Por outro lado, o receptor NPR-B é predominantemente expresso nos ossos e fibroblastos (SARZANI *et al.*, 2022). O NPR-C é um receptor independente de guanilil ciclase e funciona como um receptor de depuração para os NPs e sua expressão é predominante em células endoteliais, rins e tecidos adiposos (MOYES; HOBBS, 2019; ROSE; GILES, 2008; LEITMAN *et al.*, 1986).

Por conseguinte, ANP e BNP são hormônios de notável relevância no contexto da saúde cardiovascular. A síntese desses dois hormônios é mediada pelos genes *Nppa* e *Nppb*, respectivamente, os quais são predominantemente expressos nas câmaras atriais e ventriculares do coração (MAN; BARNETT; CHRISTOFFELS, 2018). A deficiência na expressão dos NPs está associada a comprometimentos na função e na estrutura cardíaca, como a remodelação estrutural do ventrículo esquerdo e arritmias, contribuindo para o desenvolvimento de DCVs como a insuficiência cardíaca, hipertensão, infarto agudo do miocárdio, dentre outras (HALL *et al.*, 2021).

Conforme evidenciado pela literatura científica, o ANP possui como função reduzir a hipertrofia cardíaca e a pressão arterial em condições fisiológicas normais. Em um estudo conduzido por Forte e colaboradores (2022), foi demonstrado que a autofagia (mecanismo de digestão intracelular responsável por reparar danos citoplasmáticos, funciona como uma reparação celular, sendo sua ativação de grande importância para a homeostase; [LEVINE; KROEMER, 2008]) se encontra envolvida nos efeitos protetores de *Nppa* em cardiomiócitos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Foi observado que *Nppa* exógeno ativa rapidamente a autofagia por meio do receptor NPR-A e da sinalização da proteína quinase G, além de aumentar a autofagia cardíaca em camundongos. O *Nppa* endógeno, secretado pelos próprios

cardiomiócitos em resposta à privação de glicose ou hipóxia, também estimula a autofagia. Essa ativação da autofagia preserva a viabilidade celular, reduzindo a hipertrofia e limitando o tamanho do infarto em modelos de isquemia-reperfusão. Por outro lado, a inibição da autofagia reverte os efeitos protetores de *Nppa*, enquanto a ativação do fator de transcrição EB (TFEB) está envolvida na mediação desses efeitos. Portanto, os autores sugerem que *Nppa* é um modulador extracelular da autofagia no coração (FORTE *et al.*, 2022).

Além disso, o tratamento exógeno com ANP auxilia no processo de restauração da função cardíaca e a fosforilação da serina-treonina quinase (Akt) prejudicada pelo estresse de isquemia-reperfusão em corações com obesidade induzida por HFD. Ademais, é observada melhora da resistência à insulina e esse efeito benéfico é acompanhado por alterações na ultraestrutura mitocondrial, incluindo o acúmulo de lipídios e a preservação das cristas mitocondriais (OI *et al.*, 2022).

Participando também neste sistema protetor dos NPs, encontra-se o BNP, cuja função consiste em atuar na redução de cardiomiopatias e da ocorrência de fibrose no miocárdio ventricular. Bon-Mathier e colaboradores (2022) demonstraram que o tratamento com BNP trouxe melhorias na função cardíaca e reduziu a remodelação do coração. Além disso, o tratamento com BNP resultou em um aumento do número de cardiomiócitos na área afetada pelo infarto. Os corações tratados com BNP mostraram uma menor mortalidade de cardiomiócitos, além de exibir uma maior proporção de células pequenas, indiferenciadas e mononucleadas. Os efeitos do BNP em cardiomiócitos adultos foram mediados pela ligação ao seu receptor NPR-A e ativação da via de sinalização ERK/MAP quinase. De maneira geral, os achados evidenciam os efeitos protetores do BNP ao coração (BON-MATHIER *et al.*, 2022).

Adicionalmente, a literatura demonstra que a hipertrofia e a fibrose cardíacas são características frequentemente encontradas em condições patológicas associadas à cardiomiopatia diabética (CD). Em um estudo realizado por Chang e colaboradores (2023), foi comprovado que o BNP exerce efeitos benéficos na CD em camundongos. Observou-se que, nas fases iniciais de CD houve aumento dos níveis de BNP desempenhando um papel protetor compensatório. Ademais, o BNP parece proteger contra danos oxidativos nas mitocôndrias induzidos pela hiperglicemia e pela CD, ativando o receptor NPR-A e *protein kinase G* (PKG).

Devido a esta ativação resulta-se na fosforilação aumentada da proteína *signal transducers and activators of transcription* (STAT3) e no aumento da expressão do gene *Opa1*, que está envolvido no processo de fusão mitocondrial. Esses levantamentos apontam que o BNP pode ser uma opção promissora para a prevenção de distúrbios cardíacos observados no diabetes, promovendo a fusão mitocondrial (CHANG *et al.*,2023).

Desta maneira, a disfunção na produção ou na expressão dos NPs podem desencadear distúrbios cardiovasculares, contribuindo para o desenvolvimento de doenças cardíacas. Essa disfunção prejudica e compromete o coração de produzir e liberar NPs, resultando em alterações na sua função e estrutura.

2.5 MELANOPSINA

Os ciclos de claro e escuro são delineados por duas fases no planeta que consistem em: períodos com temperaturas mais amenas e baixa incidência de radiação ultravioleta (UV) e períodos com elevadas temperaturas e radiação UV (GUERRERO-VARGAS *et al.*, 2017). Segundo a teoria “Fuga da Luz” de Pittendrigh (1993), temperaturas mais altas são encontradas durante a foto fase do dia e, portanto, temperatura e luz são entidades ambientais que exercem pressões seletivas simultâneas sobre os organismos.

Como exemplo, as opsinas, que são proteínas fotorreceptoras que tornam a membrana plasmática de neurônios sensível à luz. Estão ligadas a proteínas G e um cromóforo derivado da vitamina A, permitindo a transdução da luz (LAMMEL; DÖLEN; MALENKA, 2016). Somado a isso, a OPN4 (uma opsina não visual) é uma das mais estudadas pela literatura em relação à processos de fotorrecepção. Sua expressão tem sido objeto de investigação em pesquisas desde a sua descoberta (PROVENCIO; ROLLAG; CASTRUCCI, 2002), devido à sua capacidade de detectar tanto a luz (sem a formação de imagem) e temperatura (MORAES *et al.*,2017). Esta propriedade fascinante tem implicações significativas em diversos campos, desde a regulação do ritmo circadiano até o controle do comportamento térmico dos organismos (YUE *et al.*,2015).

Sabe-se que a OPN4 é uma proteína fotossensível à luz, ligada covalentemente ao cromóforo 11-cis-retinal (DOYLE *et al.*,2006). A luz estimula o cromóforo, que sofre isomerização em all-trans-retinaldeído, causando uma

mudança conformacional da OPN4, desencadeando uma cascata de fototransdução (WONG, 2009). A cascata de fototransdução foi descoberta por Isoldi e colaboradores (2005), membros do projeto temático no qual este estudo se encontra vinculado.

Neste processo de fototransdução, a presença de OPN4 está localizada principalmente nas células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina (ipRGCs) (HUGHES *et al.*, 2016). Essas células desempenham um papel importante na regulação do ritmo circadiano, que controla os ciclos de sono-vigília, além de outros processos fisiológicos relacionados à luz (TAM *et al.*, 2021). A presença da OPN4 permite que essas células transmitam informações sobre a intensidade e o espectro da luz para o núcleo supraquiasmático (NSQ) no cérebro, que é responsável pela manutenção do ritmo circadiano (MURE, 2021). O NSQ integra esses sinais luminosos e os transmite para o relógio central e para outros centros nervosos e deles para os sistemas periféricos do corpo, a fim de sincronizar e coordenar os ritmos circadianos em todo o organismo (GOPALAKRISHNAN; KANNAN, 2021).

A literatura apresenta evidências que indicam uma associação entre a desregulação dos ritmos circadianos e a ocorrência de complicações de natureza genética, fisiológica e psicológica. Essas complicações incluem, entre outras, o desenvolvimento de câncer, distúrbios do sono, DCVs e metabólicas (MULLER; GUIMARÃES, 2007).

Estudos recentes têm demonstrado que a expressão de OPN4 é encontrada não apenas na retina, mas também em outros tecidos e órgãos, incluindo a pele, tais descobertas sugerem que a função de OPN4 vai além de fotorreceptor (SUA-CESPEDES *et al.*, 2023).

Com base na literatura, é possível inferir que a expressão de OPN4 na pele é influenciada por fatores oscilatórios, tais como luz e temperatura (DE ASSIS; MORAES; CASTRUCCI, 2017). A pele é considerada o maior órgão do corpo, contém OPN4 em células específicas, como melanócitos e queratinócitos, que produzem melanina e queratina, tais considerações indicam uma interação entre pele, luz ambiente e temperatura, independentemente da transmissão através do sistema visual (KUSUMOTO *et al.*, 2020; DE ASSIS *et al.*, 2020). Além disso, estudos conduzidos por de Assis e colaboradores (2021) apontam que a

estimulação cutânea de OPN4 pode modular a produção de melanina e até mesmo influenciar na resposta imune da pele.

Em mamíferos, essa descoberta de que a OPN4, além de ser um fotorreceptor sensível a luz, é também sensível a temperatura (PÉREZ-CEREZALES *et al.*, 2015), encontrada em diversos órgãos e tecidos, ampliou as possibilidades relacionadas a sua função.

Como mencionado inicialmente, a expressão de OPN4 no coração, é nossa principal ferramenta para investigação neste estudo. Devido este órgão ser classificado como um “órgão cego”, ou seja, em que não há presença de luz, acreditamos que essa proteína esteja exercendo sua função de termo sensor neste órgão, em interação com os canais TRP que são canais ativados por diversas faixas de temperaturas e se encontram expressos também no coração (POLETINI *et al.*, 2015).

2.6 CANAIS TRP

A sobrevivência dos organismos vivos é condicionada à habilidade de perceber e reagir de forma precisa e ágil ao ambiente que o circunda (KASHIO; TOMINAGA, 2022). A adaptação desses organismos às mudanças ambientais é mediada pelos canais TRP, uma classe de proteínas de membrana integral, que desempenham um papel essencial na interpretação dos estímulos ambientais (FREICHEL *et al.*, 2017). Os canais TRP são membros de uma família de canais iônicos presentes em células de organismos multicelulares, incluindo mamíferos (SAMANTA; HUGHES; MOISEENKOVA-BELL, 2018), onde desempenham papéis importantes em diversos processos fisiológicos. Esses canais atuam como transdutores de sinal nas células, modulando o potencial de membrana e a concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}). Eles são ativados em resposta a uma ampla gama de estímulos, como variações de temperatura, estímulos químicos, estresse mecânico e campos elétricos (SPEKKER; KÖRTÉSI; VÉCSEI, 2022).

Os canais TRP de mamíferos são divididos em sete subfamílias com base em sua homologia de sequências de aminoácidos, sendo, TRPC (canônico ou clássico), TRPV (vanilóide), TRPM (melastatina), TRPN (sem potencial mecanorreceptor C), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina) e TRPA (anquirina) (POLETINI *et al.*, 2015).

A maioria desses canais são permeáveis ao Ca^{2+} com exceção à TRPM4 e M5 que são permeáveis a cátions monovalentes (YUE *et al.*, 2015).

Foi observada a presença de canais TRP atuando como receptores de estímulos térmicos, apresentando diversas faixas de resposta ao seu perfil de ativação pela temperatura (LIU *et al.*, 2023b). Especificamente, os canais TRPV1-4, TRPM2 e TRPM4-5 são ativados por estímulos térmicos elevados, enquanto TRPM8, TRPA1 e TRPC5 são ativados por estímulos térmicos frios (FOWLER; MONTELL, 2013).

O canal TRPV1, pertencente à subfamília *vanilóide* dos TRPs, foi inicialmente identificado no final da década de 1990 como um receptor responsável pela detecção de dor e calor em seres humanos e alguns animais (CATERINA *et al.*, 1997). Este canal é expresso em diversos tipos de tecidos e células, como em fibras aferentes cardíacas, células cancerígenas de diferentes tipos, espermatozoides, entre outros (GAO *et al.*, 2023). A ativação do canal TRPV1 ocorre mediante estímulos químicos, físicos, prótons, baixo pH, capsaicina, elevadas temperaturas ($>43^{\circ}\text{C}$), toxinas, mediadores inflamatórios, magnésio (Mg^{2+}), Ca^{2+} , dentre outros (KASHIO; TOMINAGA, 2022). Devido a sua capacidade de ser ativado por uma ampla gama de estímulos, o canal TRPV1 é considerado um receptor polimodal, cuja ativação é potencializada quando exposto a uma presença maior desses estímulos (BENÍTEZ-ANGELES *et al.*, 2020). Wang e colaboradores (2022) demonstraram que camundongos com hipertrofia miocárdica induzida por sobrecarga de pressão ativaram o canal TRPV1 como um fator de proteção para o coração. TRPV1 aliviou os danos causados pela hipertrofia do miocárdio levando à diminuição do diâmetro interno do ventrículo esquerdo ao fim das fases de sístole e diástole, redução da área dos cardiomiócitos e melhora da função mitocondrial.

O canal TRPA1, pertence à subfamília *anquirina* dos canais TRP (JAQUEMAR; SCHENKER; TRUEB, 1999), sendo um canal catiônico não seletivo permeável ao Ca^{2+} e, conseqüentemente, Na^{+} e potássio (K^{+}) em função ao tamanho dos íons (ZYGUNT; HÖGESTÄTT, 2014). É considerado um receptor polimodal devido sua ativação mediada por estímulos químicos irritantes, frio, dentre outros. Este canal é expresso em neurônios sensíveis a dor e outros tecidos, como o cardíaco (MEENTS; CIOTU; FISCHER, 2019). Aubdool e colaboradores (2014) demonstraram que camundongos expostos ao frio agudo expressaram *TrpA1* como um sensor primário de frio vascular. Isso ocorreu devido a vasoconstrição inicial

decorrente do frio mediada pela geração de superóxido, dependente da ativação de TRPA1, o qual estimula os α_2 C-adrenoceptores e promove a fosforilação da cadeia leve de miosina por meio da Rho-quinase, subsequentemente à ativação de TRPA1. Além disso, o componente subsequente de restauração do fluxo sanguíneo também dependeu da ativação de TRPA1 e foi mediado pelos neuropeptídeos vasodilatadores (CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) e substância P, derivados do nervo sensorial, bem como pelo óxido nítrico (NO), derivado da NO sintase neuronal, nNOS. Enfim, constatando que este canal foi essencial para a melhoria da resposta vascular durante esta exposição.

Recentemente, tem havido um debate em relação à função do canal TRPA1 como sensor de frio, levantando a possibilidade de sua ativação também em resposta ao calor em algumas espécies, como é demonstrado no estudo de Zhang e colaboradores (2022). Além disso, o limiar de ativação por determinadas temperaturas deste canal pode variar de acordo com a espécie (WANG *et al.*, 2023a; ZHANG *et al.*, 2022), situando em humanos (17 à 20°C aproximadamente) e em camundongos (aproximadamente 16°C) ambas as espécies apresentando ser sensíveis ao frio. No entanto, mais estudos são necessários para aprofundar nosso conhecimento nesse campo e investigar os mecanismos subjacentes à ativação do canal TRPA1 em diferentes condições térmicas.

O canal TRPM8, pertence à subfamília *melastatina* dos TRPs, demonstrando ser permeável ao Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , entre outros, sendo sua permeabilidade principal o Ca^{2+} (PEIER *et al.*, 2002). Esse canal está expresso em uma variedade de tecidos, incluindo neurônios sensoriais, epitélios, músculos e células imunes (MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002). Sua função está intimamente ligada à detecção e transdução de estímulos relacionados ao frio (YIN *et al.*, 2022). A ativação do canal TRPM8 ocorre em resposta a diferentes estímulos, tais como temperaturas frias (<27°C) e compostos químicos que evocam uma sensação de frescor, como o mentol e a icilina, caracterizando-o como um canal polimodal (PLAZA-CAYÓN; GONZÁLEZ-MUÑIZ; MARTÍN-MARTÍNEZ, 2022). Além disso, Huang e colaboradores (2022) apresentam evidências de que a administração de mentol em camundongos portadores de AVC isquêmico resulta na ativação do canal TRPM8. Esta ativação demonstrou ser correlacionada com uma redução significativa dos danos causados pelo AVC isquêmico nesses animais. Somado a isso, Thapa e colaboradores (2021) constataram que camundongos expostos a condições de frio

manifestam uma elevada expressão do canal TRPM8. Esta expressão desempenha um papel direto na resposta de termorregulação em resposta à exposição ao frio no corpo inteiro do camundongo. Ademais, o aumento dos níveis de TRPM8 após a exposição ao frio parecem representar uma resposta de natureza protetora, com vistas a ativar a elevação da temperatura corporal central afim de combater o ambiente frio.

Em síntese, TRPV1, TRPA1 e TRPM8 são expressos no coração e considerados canais polimodais podendo ser ativados por diversas maneiras (KASHIO; TOMINAGA, 2022). É importante ressaltar que as funções e os mecanismos de ativação dos canais TRP ainda não estão completamente esclarecidos, o que indica que esse sistema é mais complexo do que se imagina (WANG *et al.*, 2023b).

Diante do exposto, alterações na expressão dos canais TRP desempenham um papel significativo no desenvolvimento de doenças cardiometabólicas, como diabetes e obesidade (MORAES; WEBB; SILVA, 2021). Essas condições estão frequentemente associadas à disfunção vascular, a qual, por sua vez, pode afetar negativamente a função cardíaca.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da exposição ao frio e da ausência do canal TRPA1 sobre a expressão de OPN4, canais TRP e NPs no coração de camundongos alimentados com HFD.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Analisar em expressão os genes *Opn4*, *Trpv1*, *Trpa1*, *Trpm8*, *Nppa* e *Nppb* em explantes de átrio e ventrículo cardíacos oriundos de camundongos C57BL/6J e nocautes para o gene *Trpa1* (*TrpA1* KO) submetidos ao desafio de frio e alimentados com HFD.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

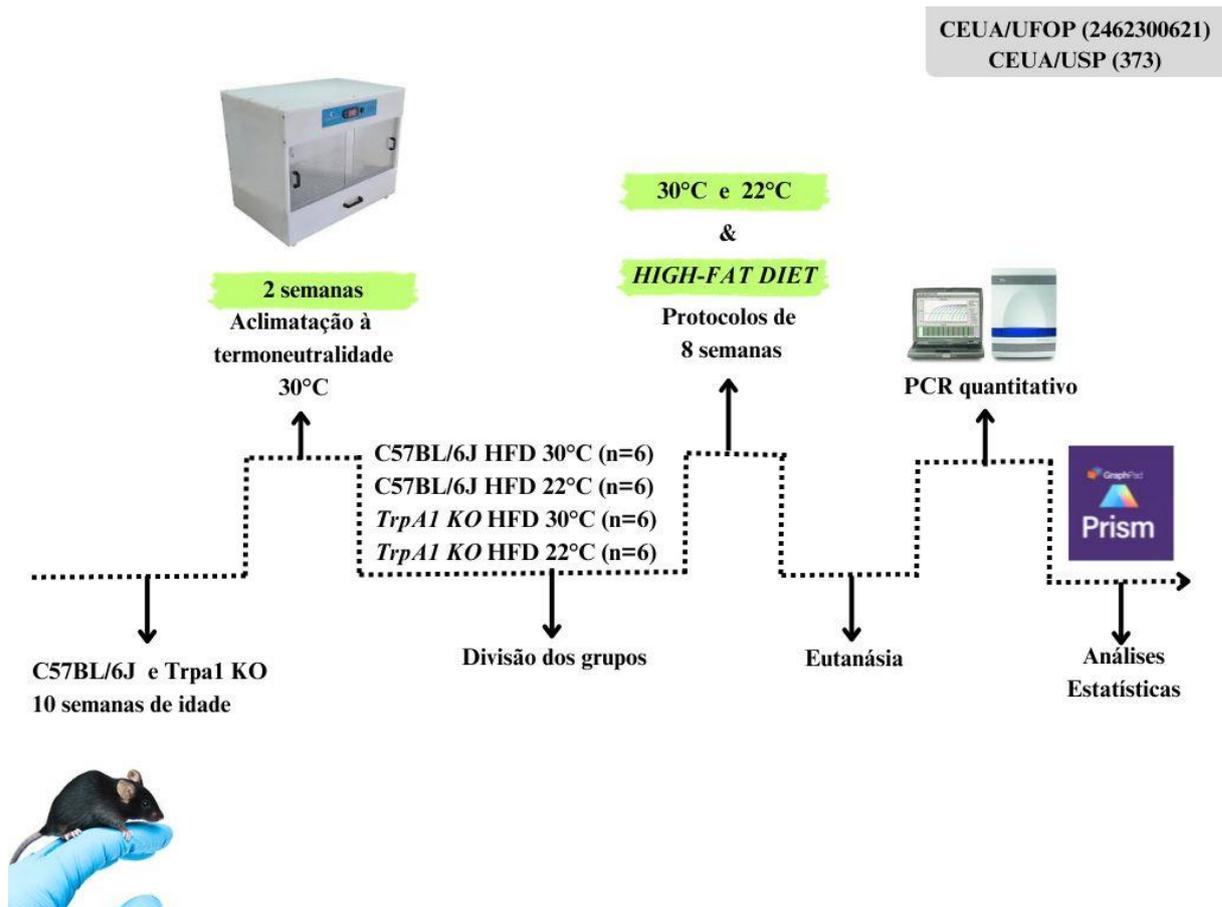
4.1 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Este projeto foi conduzido conforme os Princípios Éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e recebeu aprovação dos comitês de ética da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob o protocolo nº 2462300621 (ANEXO A), bem como do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), sob o protocolo nº 373.

Foram utilizados 24 animais com 10 semanas de idade, sendo camundongos machos isogênicos da linhagem C57BL/6J e camundongos *TrpA1* KO (ANEXO B). Os animais foram obtidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto e pelo biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os experimentos envolvendo os animais cedidos pela USP foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Comparada do Instituto de Biociências até o momento da eutanásia. Subsequentemente, os corações desses camundongos foram encaminhados ao Laboratório de Sinalização Celular da UFOP, onde foram submetidos às análises.

A sequência temporal dos experimentos é apresentada na FIG. 1. O desenho experimental é apresentado em fases que abrangem desde a chegada dos animais até a execução das análises estatísticas.

Figura 1 – Desenho experimental



Fonte: Elaborado pela autora

4.2 ACLIMATAÇÃO À TERMONEUTRALIDADE

Inicialmente, todos os animais foram submetidos ao processo de aclimação à termoneutralidade (30°C), em estufa ventilada (Alesco, Brasil), por um período de 2 semanas pois vinham de biotério a 23°C. Durante este período, os animais foram alojados em caixas de polietileno (3 animais por caixa), em regime de luminosidade claro/escuro (12 h/12 h), com ração normal fornecida pelo biotério e água *ad libitum*. Após a aclimação, os animais foram individualizados e randomizados aleatoriamente em 4 grupos experimentais: HFD em termoneutralidade (C57BL/6J HFD 30°C), HFD em exposição ao frio (C57BL/6J HFD 22°C), HFD em termoneutralidade (*TrpA1 KO* HFD 30°C) e HFD em exposição ao frio (*TrpA1 KO* HFD 22°C).

4.3 EXPOSIÇÃO ÀS TEMPERATURAS DE 22°C E 30°C

O desafio ao frio consistiu na manutenção dos animais em estante ventilada com temperatura constante de 22°C (Alesco, Brasil), por um período de 8 semanas. Os animais mantidos em termoneutralidade foram expostos à temperatura de 30°C, habitando em uma estante ventilada, pelo mesmo período. Todos os animais foram individualizados para evitar qualquer viés relacionado a parâmetros comportamentais que afetem a exposição às temperaturas.

4.4 PROTOCOLO DE 8 SEMANAS COM HFD

Os animais foram alimentados diariamente com 5 gramas de HFD em paralelo a exposição às respectivas temperaturas, por um período de 8 semanas. A água foi ofertada em regime *ad libitum* por todo período experimental.

A HFD era constituída por 60% kcal lipídios sendo (17,99% proteína, 36,44% carboidratos, 45,57% gordura) RH19572C, Rhoster, (Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brasil). Sua composição é: amido de milho, caseína, amido dextrinizado, banha de porco, celulose MC-101, L-cistina, bitartarato de colina, óleo de soja, achocolatado, mix mineral AIN-93G, mix vitamínico AIN-93, sacarose, TBHQ.

4.5 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS

Ao final da oitava semana de experimento todos os animais foram submetidos à eutanásia via decapitação, sem o uso de anestesia prévia. Em seguida, o coração foi removido por meio de incisão torácica, lavado com solução tampão PBS, secos por absorção em papel filtro, posteriormente pesados por uma balança de precisão (Gehaka model BK300, precision 0,01 g), seguido de separação dos átrios e ventrículos. Todas as amostras foram armazenadas em freezer -80°C para uso posterior.

4.6 PCR QUANTITATIVO

4.6.1 Extração do RNA

Após as amostras serem retiradas do freezer em -80°C , os fragmentos dos tecidos foram homogeneizados em 600 μL de Trizol®*Reagent* (*Invitrogen*™), com o auxílio de um homogeneizador tipo *Politron* (Ultra 80®), com cinco pulsos de 60 segundos cada em banho de gelo, seguido de cinco minutos de incubação à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 160 μL de 1-bromo-3-cloropropano (BCP), homogeneizados em agitador tipo vórtex durante 15 segundos, seguido por período de incubação de dez minutos à temperatura ambiente. O homogeneizado foi centrifugado (12000 x g, 15 minutos, 4°C), com a recuperação da fase aquosa e transferida para um novo microtubo.

No processo de purificação do RNA foi adicionado 400 μL de isopropanol 100%, em seguida homogeneizado com o auxílio do vórtex e armazenado a -20°C em overnight. No dia seguinte foi centrifugado a (12000 x g, 15 minutos, 4°C). O sobrenadante foi removido e na fase aquosa foi adicionado 800 μL de etanol, vórtexado em seguida e centrifugado a (12000 x g, 15 minutos, 4°C). Esse processo foi repetido por 2 vezes. Em seguida o sobrenadante foi descartado e os microtubos foram invertidos em lencinho de papel na bancada para secagem. Por fim, o RNA foi ressuscitado com um volume de 10 μL de água DEPC e homogeneizado com o auxílio de um pipetador, pipetando para cima e para baixo até que o *pellet* desaparecesse.

A concentração de RNA foi determinada fazendo a leitura no equipamento Nanodrop 1000 (ND-1000). A razão de $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ foi considerada boa acima de 1,6.

4.6.2 RT-PCR (reação de transcriptase reversa)

A reação de RT-PCR foi realizada com 1 μg de RNA total, utilizando 1 μL de *Random Primers* 100ng/ μL e 1 μL de dNTPs Mix 10mM (*Invitrogen*, EUA), em reação com volume final de 13 μL ajustado com água DEPC. As amostras foram aquecidas por 5 min a 65°C (termociclador Eppendorf) e, em seguida, transferidas para cuba com gelo, adicionando-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), 0,5 μL da enzima *Superscript III Reverse Transcriptase* (200 U/ μL , Life Technologies, EUA) e 0,5 μL de água DEPC para um volume final de 20 μL] em cada tubo. A mistura foi homogeneizada, gentilmente, e, após breve centrifugação, incubada por 5 min a 25°C, seguido por 50 min a 50°C. A reação foi inativada por incubação a 70°C por 15 min (termociclador Eppendorf). O cDNA sintetizado foi usado nas subseqüentes reações de PCR quantitativo.

4.6.3 PCR quantitativo (qPCR)

Foi utilizado SYBR™ Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems, EUA) e, em reações separadas, um par de *primers*, específicos para cada um dos genes, *Opn4*, *Trpa1*, *Trpv1*, *Trpm8*, *Nppa*, *Nppb* (TAB. 1) e H₂O *DNase/RNase-free*. β -*actina* foi utilizado como normalizador do experimento de explantes cardíacos (ZHENG *et al.*, 2021; DVORAKOVA *et al.*, 2018; SCHWARZ *et al.*, 2020).

Os *primers* foram diluídos em H₂O *DNase/RNase-free* para se obter a solução estoque de concentração igual a 10⁻⁴M. Os *primers* de cada gene de interesse foram diluídos 10X (10 μL em 90 μL de H₂O *DNase/RNase-free*), dando uma solução intermediária de 10⁻⁵M. A concentração final foi de 300nM para *primers* dos genes, e de 300nM para *primers* do normalizador β -*actina* (TAB. 1). Nas reações de qPCR utilizamos 1 μL cDNA para uma reação de 10 μL /poço.

As reações foram executadas no equipamento ABI 7500 (*Applied Biosystems*), configurado a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, *Melting curve* (ANEXO C).

Os resultados de qPCR foram analisados através do método de $\Delta\Delta\text{C}_T$. Os valores de C_T foram extraídos a partir do ajuste do *threshold*, para encontrar o ΔC_T é calculada a diferença entre o valor do C_T para o gene de interesse e o valor de C_T para β -*actina* da mesma amostra de cDNA (ambos correspondendo à média de poços duplicados do mesmo cDNA). A seguir, obtém-se o $\Delta\Delta\text{C}_T$ subtraindo a média do grupo átrio e/ou ventrículo C57BL/6J (30°C) dos valores encontrados para cada amostra dos grupos átrios e ventrículos de todos os genótipos, sendo colocado como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$) e esse valor foi utilizado nas análises estatísticas no *software* GraphPad Prism.

As respectivas seqüências de *primers* são apresentadas no TABELA 1.

Tabela 1 - Sequência de *primers* para qPCR

Primer	Sequência	Concentração final
<i>Opn4</i>	Forward: 5'-ACATCTTCATCTTCAGGGCCA-3'	300nM
	Reverse: 5'-ACTCACCGCAGCCCTCAC-3'	
<i>Trpv1</i>	Forward: 5'-CAGAGACCTGTGTTCGGTTTATG-3'	300nM
	Reverse: 5'-CATGTTGAGCAGGAGGATGTAG-3'	
<i>Trpa1</i>	Forward: 5'-GGTCCAACATAACCGCATAGA-3'	300nM
	Reverse: 5'-AGGGCAACACGAAGATGATAC-3'	
<i>Trpm8</i>	Forward: 5'-TACGCTTGTCTGTGACACC-3'	300nM
	Reverse: 5'-TCCAGTGAGAATCCACGCAC-3'	
<i>Nppa</i>	Forward: 5'-GCTTCGGGGGTAGGATTGAC-3'	300nM
	Reverse: 5'-CACACCACAAGGGCTTAGGA-3'	
<i>Nppb</i>	Forward: 5'-GAGTCCTTCGGTCTCAAGGC-3'	300nM
	Reverse: 5'-ACTTCAGTGCGTTACAGCCC-3'	
β -actina	Forward: 5'-GATCAAGATCATTGCTCCTCCTG-3'	300nM
	Reverse: 5'-AGGGTGTAACGCAGCTCA-3'	

Fonte: Elaborado pela autora

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

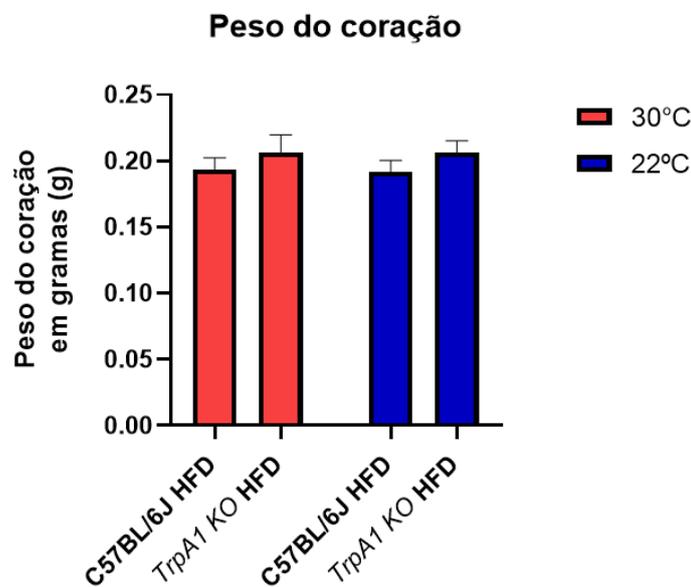
Todos os resultados foram apresentados como média \pm EPM. Para comparações entre os grupos, foi utilizada a ANOVA *Two-Way*, seguida de pós teste de Bonferroni. Para análise da expressão do gene *Trpa1* sob as temperaturas, foi realizado teste t não pareado. O nível de significância para todos os testes foi estabelecido para $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas usando o *software* GraphPad Prism (versão 8.0.1).

5 RESULTADOS

5.1 PESO DO CORAÇÃO DE ANIMAIS C57BL/6J E *TRPA1 KO*

Em relação ao peso do coração dos 24 camundongos utilizados neste estudo, não foi observada significância das diferenças entre os grupos, como pode ser observado na FIG. 2.

Figura 2 – Peso do coração de camundongos C57BL/6J e *Trpa1 KO*, expostos às temperaturas de 30°C e 22°C, alimentados com HDF

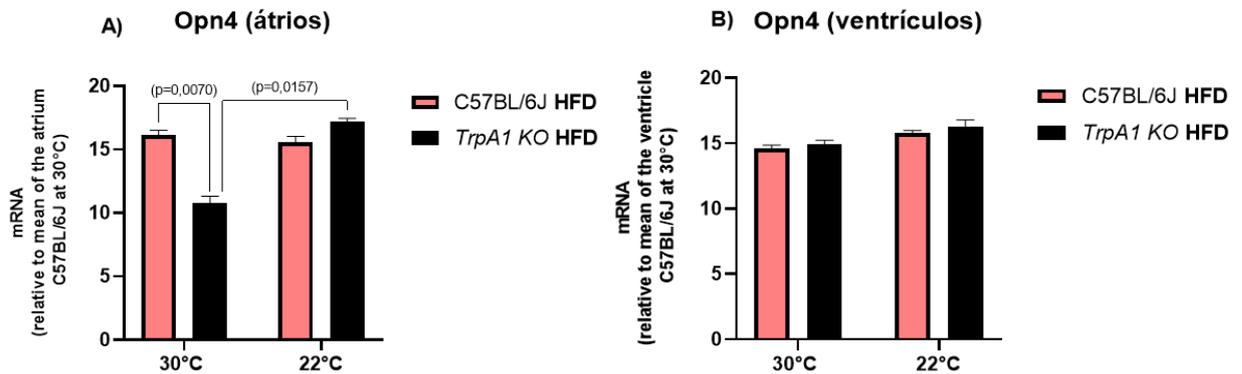


Análises estatísticas realizadas por ANOVA *Two-Way*, seguida por pós teste de Bonferroni. Valores em média \pm EPM. Significância foi estabelecida para $p < 0,05$.

5.2 NÍVEL DE EXPRESSÃO DO GENE *OPN4* EM EXPLANTES DAS DIFERENTES CÂMARAS CARDÍACAS EM RELAÇÃO AS TEMPERATURAS

Os átrios, sob a temperatura termoneutra (30°C), houve redução da expressão gênica de *Opn4* no grupo *Trpa1 KO* (FIG. 3A). Contudo, a exposição ao frio (22°C) aumentou a expressão deste gene neste grupo (FIG. 3A). Os ventrículos, não apresentam diferenças significativas entre os grupos na expressão deste gene (FIG. 3B).

Figura 3 - Expressão do gene *Opn4* em explantes cardíacos de camundongos alimentados com HFD

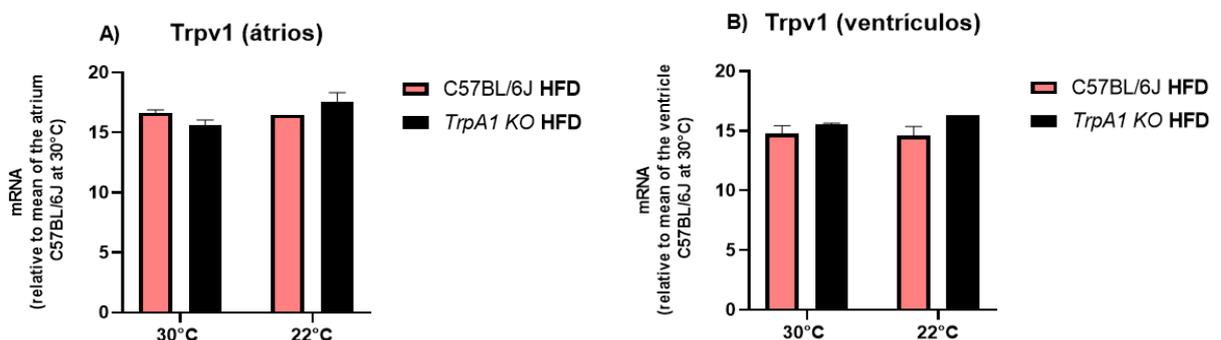


Expressão gênica realizada por qPCR. Análises estatísticas realizadas por ANOVA *Two-Way*, seguida por pós teste de Bonferroni. Valores em média \pm EPM. Significância foi estabelecida para $p < 0,05$.

5.3 NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS GENES DOS CANAIS *TRPV1*, *TRPA1* E *TRPM8* EM EXPLANTES DAS DIFERENTES CÂMARAS CARDÍACAS EM RELAÇÃO ÀS TEMPERATURAS

A FIG. 4 representa a expressão do gene *Trpv1* no coração. Como pode ser observado não houve diferenças significativas entre os grupos na expressão deste gene.

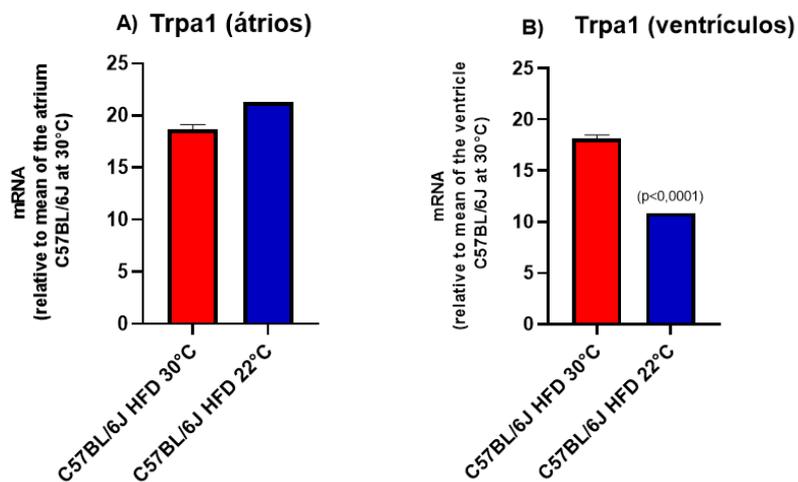
Figura 4 - Expressão do gene *Trpv1* em explantes cardíacos de camundongos alimentados com HFD



Expressão gênica realizada por qPCR. Análises estatísticas realizadas por ANOVA *Two-way*, seguida por pós teste de Bonferroni. Valores em média \pm EPM. Significância foi estabelecida para $p < 0,05$.

A FIG. 5 representa a expressão do gene *Trpa1* no coração. Os átrios não apresentam diferenças significativas entre as temperaturas na expressão deste gene (FIG. 5A). Contudo, quando comparado em ventrículos temperaturas termoneutra e exposição ao frio, houve redução da expressão de *Trpa1* em exposição ao frio (FIG. 5B).

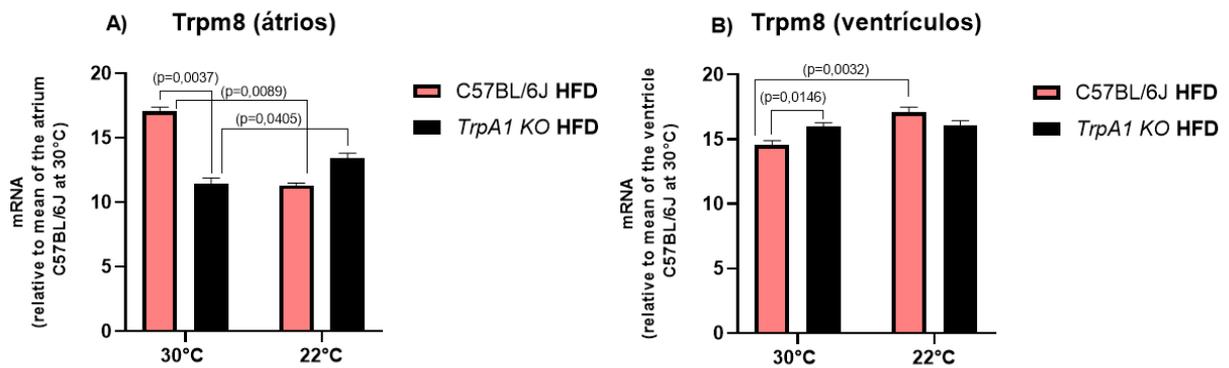
Figura 5 - Expressão do gene *Trpa1* em explantes cardíacos de camundongos alimentados com HFD. Expressão gênica realizada por qPCR.



Análises estatísticas realizadas por teste T não pareado. Valores em média \pm EPM. Significância foi estabelecida para $p < 0,05$.

A FIG. 6 representa a expressão do gene *Trpm8* no coração. Os átrios, sob a temperatura termoneutra (30°C), houve redução da expressão gênica de *Trpm8* no grupo *Trpa1* KO (FIG. 6A). Contudo, a exposição ao frio (22°C) reduziu a expressão deste gene, em camundongos C57BL/6J (FIG. 6A), porém, em camundongos *Trpa1* KO houve aumento da expressão de *Trpm8* em exposição ao frio quando comparado ao grupo termoneutro (FIG. 6A). Os ventrículos, sob a temperatura termoneutra (30°C), houve aumento na expressão de *Trpm8* no grupo *Trpa1* KO (FIG. 6B). A exposição ao frio (22°C) aumentou a expressão deste gene, quando comparado em camundongos C57BL/6J (FIG. 6B).

Figura 6 - Expressão do gene *Trpm8* em explantes cardíacos de camundongos alimentados com HFD

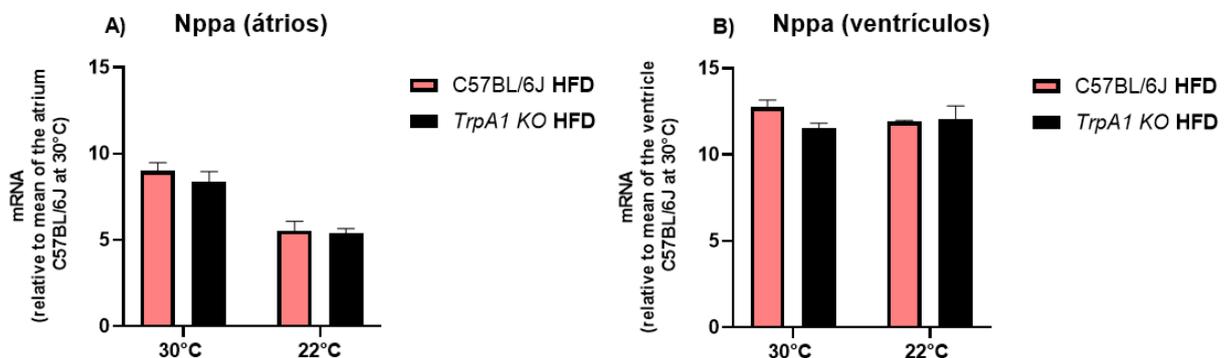


Expressão gênica realizada por qPCR. Análises estatísticas realizadas por ANOVA *Two-Way*, seguida por pós teste de Bonferroni. Valores em média \pm EPM. Significância foi estabelecida para $p < 0,05$.

5.4 NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS GENES DOS PRÓ-HORMÔNIOS *NPPA* E *NPPB* EM EXPLANTES DAS DIFERENTES CÂMARAS CARDÍACAS EM RELAÇÃO ÀS TEMPERATURAS

A FIG. 7 representa a expressão do gene *Nppa* no coração. Como pode ser observado não houve diferenças significativas entre os grupos na expressão deste gene.

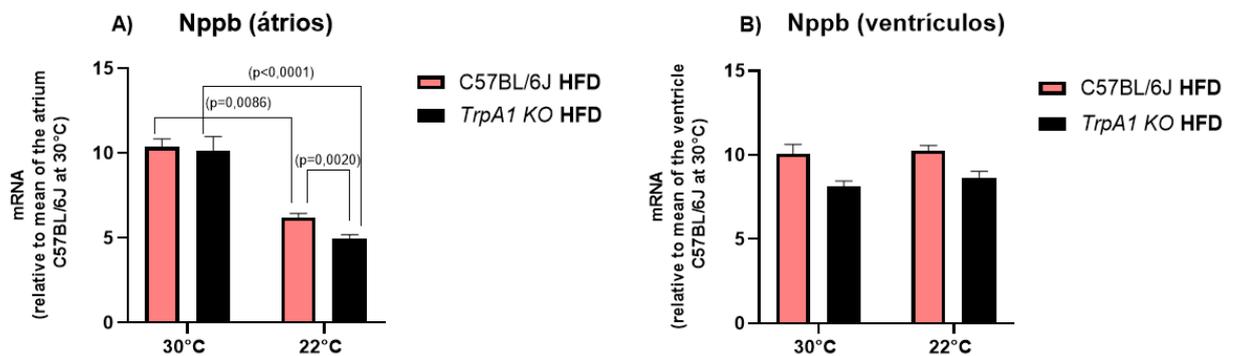
Figura 7 - Expressão do gene *Nppa* em explantes cardíacos de camundongos alimentados com HFD



Expressão gênica realizada por qPCR. Análises estatísticas realizadas por ANOVA *Two-Way*, seguida por pós teste de Bonferroni. Valores em média \pm EPM. Significância foi estabelecida para $p < 0,05$.

A FIG. 8 representa a expressão do gene *Nppb* no coração. Os átrios de camundongos C57BL/6J e *TrpA1* KO, quando comparado as temperaturas termoneutra e exposição ao frio, apresentam redução na expressão de *Nppb* em exposição ao frio (FIG. 8A). Contudo, a expressão deste gene em exposição ao frio (22°C) é menor em camundongos *TrpA1* KO quando comparado aos C57BL/6J (FIG. 8A). Os ventrículos, não apresentam diferenças significativas entre os grupos na expressão deste gene (FIG. 8B).

Figura 8 - Expressão do gene *Nppb* em explantes cardíacos de camundongos alimentados com HFD



Expressão gênica realizada por qPCR. Análises estatísticas realizadas por ANOVA *Two-Way*, seguida por pós teste de Bonferroni. Valores em média \pm EPM. Significância foi estabelecida para $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou, em uma condição de extremo metabólico (camundongos alimentados por HFD), a expressão gênica de OPN4, canais TRP e NPs no coração, frente a variação de temperatura (30°C e 22°C) e a ausência do canal TRPA1.

É elucidado pela literatura que o consumo de HFD pode desencadear diversos efeitos prejudiciais ao coração e no metabolismo, como por exemplo, inflamação, disfunção cardíaca, estresse oxidativo, hipertensão, obesidade, dislipidemia, resistência à insulina, disfunção endotelial e remodelamento cardíaco (DELLE *et al.*, 2023). Além disso, em uma revisão sistemática sobre os efeitos da utilização de dietas HFD em camundongos, conduzida por membros de nosso laboratório, foi possível observar que a exposição à HFD por períodos curtos (2 semanas) e longos (11 meses) desencadeia efeitos prejudiciais ao organismo. Um dos efeitos em comum observado durante esses dois períodos de exposição foi a alteração no relógio biológico que, por consequência, impacta na expressão de genes, modificando as expressões e podendo assim comprometer processos metabólicos (PAULA *et al.*, 2020a). Os achados apontam que, independentemente do tempo de exposição à HFD, como observado na revisão de Paula e colaboradores (2020a), ocorrem alterações significantes no organismo dos camundongos.

Somado a isso, Pan e colaboradores (2023) conduziram um estudo com camundongos C57BL/6 alimentados por 12 semanas com HFD e analisaram os efeitos da dieta na expressão de proteínas cardíacas. Os autores relataram que a exposição a HFD aumentou o estresse oxidativo, peso corporal e a peroxidação lipídica. Em relação as proteínas do coração, devido a condição pela qual os camundongos foram expostos, foi observada redução em sua expressão, fator que contribuiu para o surgimento das demais alterações.

Recentemente, em uma revisão sistemática realizada por nosso grupo de pesquisa, foi investigado o efeito das dietas no relógio cardíaco em modelos de camundongos. Paula e colaboradores (2022) observaram que os estudos realizados com o consumo de HFD apresentaram que esta dieta estimula marcadores relacionados a hipertrofia cardíaca e fibrose cardíaca, além de, aumento do peso

corporal, alterações dos ritmos circadianos, aumento do estresse oxidativo, deficiências na expressão de genes no coração, dentre outros.

Desta maneira, constata-se que o consumo exacerbado de HFD está associado a efeitos prejudiciais ao sistema cardiovascular contribuindo para aumento do índice de DCVs (WALI *et al.*, 2020), comprometendo a integridade e a funcionalidade do coração, resultando em uma inadequada capacidade de desempenho desse órgão (CHEN *et al.*, 2020).

Em relação ao peso do coração dos camundongos alimentados com HFD, nossos achados apontam que não houve diferença significativa entre os grupos. Pakiet e colaboradores (2020) avaliaram o efeito da HFD na composição de ácidos graxos, bem como nas várias frações lipídicas no coração e na função cardíaca de camundongos C57BL/6. Os resultados demonstraram que o peso do coração dos animais ($\pm 26g$) não apresentavam diferença significativa. Tais considerações apontam que por mais que o consumo de HFD possa ser prejudicial ao coração, não necessariamente influencia significativamente no peso deste órgão.

Com base na descoberta de que a OPN4, além de ser um fotorreceptor, também atua como um termo sensor (PÉREZ-CEREZALES *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2017;), há uma ampliação significativa de sua função. No coração de mamíferos, incluindo camundongos e seres humanos, é notável a elevada expressão do gene *Opn4*, juntamente com a presença de canais TRP sensíveis a diversos estímulos, sendo as variações de temperatura um desses estímulos (FREICHEL *et al.*, 2017).

Nossas premissas são baseadas na possibilidade de o coração atuar como um termo sensor, o que ocorreria devido à interação entre OPN4 e os canais TRP. Essa interação permite a percepção da temperatura do fluxo sanguíneo advindo do trato respiratório e da periferia. Com essas flutuações de temperatura, o coração interpreta gerando sinais que levam à expressão de seus principais hormônios, os NPs.

As opsinas, incluindo a rodopsina, historicamente consideradas responsáveis exclusivamente pela detecção de luz (SHEN *et al.*, 2011), têm sido objeto de estudos que sugerem sua atuação adicional em outras funções sensoriais. Evidências indicam que mamíferos podem detectar luz não apenas pelos olhos, mas também na pele (OLINSKI; LIN; OANCEA, 2020), cérebro (NISSILÄ *et al.*, 2012) e vasos sanguíneos (ORTIZ *et al.*, 2017). Além disso, estudos em *Drosophila* (moscas das frutas) revelaram que as opsinas, incluindo a rodopsina e a OPN4, podem

desempenhar papéis como termo sensores, em associação com canais TRP, mesmo na ausência de luz (LEE; MONTELL, 2013). Em um estudo com o peixe *zebrafish* (*Danio rerio*), foi observado que essas opsinas apresentam níveis moderados a altos de expressão no coração. No entanto, o estudo não especificou em qual câmara cardíaca essas opsinas foram mais expressas (átrios ou ventrículo), analisando a expressão do coração como um todo (DAVIES *et al.*, 2015).

Nossos achados apontam que a expressão de *Opn4* nos átrios, à 30°C foi reduzida no grupo *TrpA1 KO*, já em 22°C houve aumento na expressão de *Opn4* no mesmo grupo e, em ventrículos não apresenta diferenças significativas. Esses achados representam que a expressão de *Opn4* é significativa nas câmaras atriais. Essas descobertas corroboram para dados do nosso grupo de pesquisa ainda não publicados (Paula, 2020b; em processo de preparação para publicação), que se encontra vinculado ao projeto temático. Os estudos de Paula (2020b) foram realizados com camundongos C57BL/6J selvagens, *TrpA1 KO* e *TrpV1 KO* expostos a termoneutralidade (30°C) por duas semanas. Os resultados do qPCR indicaram uma maior expressão de *Opn4* nos átrios em relação aos ventrículos, tanto em animais selvagens quanto em *TrpA1 KO*, embora sem diferença estatisticamente significativa (PAULA, 2020b).

Levando-se em conta o que foi observado, mesmo com toda a escassez de informação na literatura, a respeito da expressão de *Opn4* no coração, em nosso estudo, observamos que a expressão desse gene ocorre tanto nos átrios quanto nos ventrículos, sendo significante nos átrios. Essa descoberta fortalece nossa hipótese de que OPN4 desempenha sua função sensível à temperatura e possivelmente esteja interagindo com os canais TRP para a percepção dessa temperatura. Essa interação é particularmente relevante nos átrios, que são as câmaras cardíacas responsáveis por receber o fluxo sanguíneo provenientes da periferia e do trato respiratório. Entre as diferentes funções atualmente atribuídas aos átrios, a função de “sensor” não é novidade. Já é bem elucidado na literatura a existência de receptores denominados mecanorreceptores, localizados nas paredes atriais, que são conhecidos por serem de baixa pressão. Estes mecanorreceptores, quando ativados, desencadeiam respostas reflexas imediatas com o objetivo de ajustar a pressão arterial (BISHOP; MALLIANI; THORÉN, 1983). Além disso, outro importante mecanismo fisiológico que tem origem no átrio é o batimento cardíaco, sendo

iniciado pela geração de um potencial de ação no nodo sinusal, localizado na parede lateral superior do átrio direito (CHEN *et al.*, 2022).

Resumidamente, a OPN4 pode ser ativada por luz ou temperatura (MORAES *et al.*, 2017). Somado a isso, o processo de fototransdução de OPN4 nas ipRGCs, desencadeia uma cascata de sinalização dependente de proteína G tipo Gq/11. Logo a fosfolipase C (PLC β 4) é ativada, proporcionando a abertura dos canais TRP por PIP₂ permitindo assim a entrada de Ca²⁺ intracelular. Esse influxo iônico desencadeia eventos intracelulares, gerando potenciais de ação nas ipRGCs. Esses potenciais de ação são transmitidos ao NSQ no hipotálamo culminando com a liberação de glutamato, onde o principal relógio biológico do corpo regula o ritmo circadiano. Dessa maneira, essa interação é importante para a transdução do sinal de luz em um sinal elétrico que pode afetar diversas funções biológicas (ISOLDI *et al.*, 2005; POLETINI *et al.*, 2015).

Dado essa interação entre OPN4 com os canais TRP, uma vez que estimulada a OPN4, canais TRP são ativados, promovendo o influxo de Ca²⁺ celular (YUE *et al.*, 2015). Os canais TRP encontram-se presentes em alguns órgãos e tecidos, como por exemplo no coração.

Logo, como já descrito pela literatura, uma das maneiras de ativação do canal TRPV1 é a elevação da temperatura (KASHIO; TOMINAGA, 2022). Em relação a expressão de *Trpv1* observada em nosso estudo, não encontramos valores significativos entre os grupos, tanto para as temperaturas expostas, como para os genótipos, o que está em consonância com sua função como um sensor de calor. Embora esses resultados não tenham mostrado diferenças significativas, é essencial continuar investigando esse canal, já que sua ativação pode ocorrer por outros mecanismos além da temperatura (BENÍTEZ-ANGELES *et al.*, 2020), mecanismos estes que não foram explorados por esse estudo. Por este canal estar expresso em processos patológicos, esses mecanismos desempenham papel de proteção para o coração atenuando estes processos (WANG *et al.*, 2022; GAO *et al.*, 2014). Novas pesquisas nesse campo contribuirão para uma melhor compreensão de seu papel no contexto cardiovascular.

Opostamente ao canal TRPV1, a ativação do canal TRPA1 é o frio (MEENTS; CIOTU; FISCHER, 2019). Em nosso estudo, a expressão gênica de *Trpa1* em átrios não apresentou diferenças significativas, mas, em ventrículos à 22°C observou-se uma redução na expressão deste gene. Ma e Wang (2022) investigaram o papel do

TRPA1 na fibrose cardíaca relacionada à idade. Foram utilizados no estudo camundongos C57BL/6 selvagens e *TrpA1 KO*, com 12 e 52 semanas de idade. Os resultados apontam que camundongos *TrpA1 KO* com 52 semanas de idade apresentaram aumento da fibrose cardíaca, dilatação ventricular e disfunção cardíaca, em comparação a camundongos selvagens da mesma idade que expressavam o canal. Além disso, a expressão de genes relacionados à fibrose foi afetada nos camundongos *TrpA1 KO* de 52 semanas de idade. Dadas essas informações é possível concluir que o canal TRPA1 exerce um papel cardioprotetor frente a decorrentes do processo de envelhecimento, e que sua ausência contribui para piora do quadro.

Ressaltando o potencial do canal TRPA1 como um mecanismo promissor para proteção cardíaca em situações de estresse isquêmico, com base nos estudos de Andrei e colaboradores (2019) realizados com camundongos machos selvagens e nocautes para *Trpa1*, foi constatado que a ativação do canal TRPA1 demonstrou efeito protetor, promovendo a sobrevivência e viabilidade dos cardiomiócitos, além de atenuar a morte celular induzida pela isquemia. Observou-se uma correlação semelhante no estudo realizado por Wang e colaboradores (2023), no qual a ausência de *Trpa1* exacerbou a disfunção cardíaca, bem como as lesões cardíacas e a remodelação do ventrículo esquerdo em camundongos com cardiomiopatia dilatada.

Nota-se que a expressão de *Trpa1*, em nosso estudo, se encontra presente nas câmaras cardíacas (atriais e ventriculares), em especial nos átrios em desafio de frio. Esta presença corrobora tanto para a veracidade deste canal ser ativado por estímulos frios, quanto para auxiliar a fortalecer nossa hipótese, em relação da possível interação deste canal com a OPN4 para a percepção de temperatura.

É elucidado que a expressão do canal TRPM8 é induzida por diversas maneiras, dentre elas, estímulos de frio (YIN et al.,2022). Em nosso estudo, a expressão de *Trpm8* no coração ocorreu tanto em câmaras atriais quanto ventriculares. Em átrios, a expressão gênica de *Trpm8*, à 30°C temos redução da expressão do gene no grupo *TrpA1 KO*, à 22°C resultou em redução na expressão em camundongos C57BL/6J, enquanto, que no grupo *TrpA1 KO*, houve aumento da expressão. Já em ventrículos, à 30°C resultou em aumento na expressão de *Trpm8* no grupo *TrpA1 KO* e, em C57BL/6J aumento na expressão à 22°C.

Cheng e colaboradores (2019) conduziram um estudo utilizando corações de ratos perfundidos por *Langendorff* para investigar os efeitos cardioprotetores da reperfusão hipotérmica e o papel do canal TRPM8 nesse processo. As temperaturas utilizadas foram de 37°C (normotérmica) e 25°C (hipotérmica). Para monitorar a expressão de *Trpm8* no miocárdio, análises de qPCR e Western blot foram realizadas e revelaram sua presença nos corações dos ratos. Na reperfusão hipotérmica houve redução do tamanho do infarto, a atividade de lactato desidrogenase, o conteúdo de malondialdeído e a apoptose em comparação com a reperfusão normotérmica. Além disso, a expressão de Bax, caspase-3 clivada, RhoA e ROCK2 foi diminuída com a reperfusão hipotérmica. Esses efeitos foram associados a uma melhor recuperação da função contrátil do ventrículo esquerdo e foram reduzidos devido ao uso de um antagonista do canal TRPM8. Somado a isso, um agonista do TRPM8 reduziu a lesão de isquemia/reperfusão e a expressão aumentada de Bax, caspase-3, RhoA e ROCK2 durante a reperfusão normotérmica. Em suma, a reperfusão hipotérmica a 25°C demonstrou proteger o miocárdio contra a lesão de isquemia/reperfusão, através da ativação do canal TRPM8 e inibição da via de sinal RhoA/ROCK2 relacionada ao estresse oxidativo.

Além disso, Xiong e colaboradores (2017) realizaram um tratamento com mentol a longo prazo em camundongos C57BL/6J selvagens e nocautes para *Trpm8*, e concluíram que o canal TRPM8 ameniza a hipertensão induzida pelo frio melhorando a disfunção vascular das mitocôndrias. Logo, esses achados contribuem para que esse canal esteja envolvido em mecanismos protetores do sistema cardiovascular.

Compreende-se assim, por nosso estudo, que o canal TRPM8 se encontra expresso em átrios e ventrículos. Nossos resultados indicam que a expressão de *Trpm8* nas câmaras atriais sofre uma inversão entre camundongos C57BL/6J e camundongos *TrpA1* KO, sendo que, durante o desafio de frio, os camundongos nocautes apresentaram maior expressão de *Trpm8*, enquanto nos camundongos C57BL/6J essa expressão foi maior em condições de termoneutralidade. Nossos dados corroboram para estudos que sugerem que (MULLER; MORALES; REGGIO, 2019; KUDSI *et al.*, 2022) canais TRP, particularmente TRPA1 e TRPM8, podem atuar como canais de compensação quando a atividade de um deles está inativa. Tais mecanismos são fundamentais para a manutenção da homeostase celular e fisiológica, permitindo que as células e os organismos se adaptem a mudanças e

preservem sua funcionalidade adequada mesmo diante de perturbações ou mutações. É importante ressaltar que esse canal também desempenha um papel protetor para o coração, quando este órgão está exposto a condições desfavoráveis (IZQUIERDO *et al.*, 2021).

Dessa forma, observamos em nossos achados, que a expressão dos genes dos canais TRPV1, TRPA1 e TRPM8 ocorreu tanto em átrios quanto em ventrículos. Sendo em câmaras atriais com maior expressão, com exceção do canal TRPV1 para o qual não foi detectada diferença entre as câmaras cardíacas. A expressão destes canais corrobora a nossa hipótese de que possivelmente os mesmos estejam interagindo com a OPN4 para percepção da temperatura presente no fluxo sanguíneo.

Os NPs são os principais hormônios do coração e desempenham um papel importante na regulação da pressão arterial e do volume sanguíneo, bem como na função cardíaca (CORTE *et al.*, 2023). Um dos fatores que podem influenciar a expressão de NPs é a temperatura. Como podemos observar no estudo de Bordicchia e colaboradores (2012) em que camundongos expostos às temperaturas frias apresentaram níveis elevados de NPs circulantes. Dado que a expressão de pró-hormônios dos NPs também pode ser afetada devido a temperatura ambiente, identificamos as expressões desses genes (*Nppa* e *Nppb*) em câmaras atriais e ventriculares em termoneutralidade e desafio de frio.

Em nossos achados, a expressão de precursores de NPs indicou que *Nppa* é expresso em átrios e ventrículos, mas, não apresentou diferenças significativas. A expressão *Nppb* em átrios, indicou redução na expressão à 22°C, tanto em C57BL/6J como *TrpA1* KO. Em exposição ao frio, houve redução na expressão deste gene no grupo *TrpA1* KO. Já em ventrículos, *Nppb* não apresentou diferenças significativas. Demonstrando que a expressão varia significativamente conforme a temperatura ambiente à qual os camundongos foram expostos, observa-se que ela é mais pronunciada em determinadas câmaras cardíacas.

O estudo realizado por Öztop e colaboradores (2019) investigou os efeitos dos NPs na função cardíaca durante a hibernação de esquilos terrestres da Anatólia (*Spermophilus xanthoprimum*). Os resultados demonstraram que os esquilos hibernadores reduzem a temperatura corporal, os batimentos cardíacos e o consumo de oxigênio, mas não sofrem problemas cardiovasculares. Os NPs foram encontrados em diferentes câmaras cardíacas, e seus níveis foram menores durante

a hibernação. Sugere-se que os achados contribuem para nossa hipótese de o coração possivelmente estar atuando como um órgão de monitoramento da temperatura.

Nossos achados demonstram que *Nppb*, em termoneutralidade, apresenta maior expressão nos átrios, enquanto que, em desafio de frio, essa expressão é reduzida. Resumidamente, nossos achados sugerem que possivelmente, devido à exposição destes camundongos a HFD, acredita-se que essa dieta possa estar modulando o metabolismo destes camundongos e, devido a isso, foi possível observar essa menor expressão nos átrios em desafio de frio.

Jin e colaboradores (2019) conduziram um estudo com camundongos C57BL/6J alimentados por HFD a longo prazo. Os camundongos alimentados por HFD apresentaram aumento nos níveis de glicose, peso corporal, colesterol total, triglicerídeos, hemoglobina glicada, insulina e BNP, além de alterações nos biomarcadores do sistema renina-angiotensina. Os dados apontam que a dieta HFD de longo prazo resultou em remodelação cardíaca e desregulação do sistema renina-angiotensina, afetando a expressão de proteínas no coração dos camundongos estudados.

A expressão de *Nppa* e *Nppb* no coração é uma resposta fisiológica que traz benefícios ao órgão cardíaco, ajudando a manter a homeostase e protegendo o organismo contra desequilíbrios nos fluidos e na pressão arterial. Um exemplo disso é a expressão de *Nppb* em situações de estresse cardíaco, onde o coração desempenha um papel crucial na preservação da homeostase e na prevenção desses desequilíbrios, que podem ocorrer na insuficiência cardíaca ou em outras DCVs (NAKAGAWA; NISHIKIMI; KUWAHARA, 2019).

Evidenciando o papel protetor de *Nppa* no coração, Hamano e colaboradores (2021) conduziram um estudo realizado com cardiomiócitos de camundongos C57BL/6, utilizando uma abordagem transômica para investigar a insuficiência cardíaca, uma doença complexa com vários fatores de risco e mecanismos fisiopatológicos distintos. Foram utilizados diferentes tipos de dados ômicos, como RNA-seq de células individuais, ChIP-seq e informações de interatoma de genes, e foram identificados marcadores genéticos que podem distinguir diferentes fenótipos da doença. Os resultados do estudo revelaram que a expressão de *Nppa* apresentou aumento significativo devido a resposta da carga de estresse. Cardiomiócitos com alta expressão de *Nppa* apresentaram padrões de expressão

gênica específicos, e a família de complexos de NADH ubiquinona, associada ao sistema de transporte de elétrons mitocondrial, foi inversamente correlacionada à expressão de *Nppa* durante os estágios iniciais da hipertrofia cardíaca. Além disso, a análise dos dados ChIP-seq revelou que *Nkx2-5* e *Gtf2b* eram fatores de transcrição característicos dos cardiomiócitos com alta expressão de *Nppa*. Assim sendo, os achados do estudo apontam a expressão de *Nppa* no coração como um fator de proteção frente a condição patológica exposta, sugerindo ainda que essa expressão pode servir como um importante marcador para diagnóstico de insuficiência cardíaca.

Tendo em vista que *Nppa* e *Nppb* têm como função a proteção do coração e o auxílio na manutenção da homeostase cardíaca (SARZANI *et al.*,2022), os NPs surgem como alvos de interesse significativo no contexto do desenvolvimento de fármacos, oferecendo potencial para promover benefícios significativos no tratamento de DCVs.

Diante das evidências apresentadas, sugerimos que a OPN4, em conjunto com os canais TRP significativamente expressos nas câmaras atriais do coração, possam estar detectando oscilações de temperatura presentes na corrente sanguínea. Essa detecção, por sua vez, poderia desencadear a liberação dos NPs neste órgão, culminando na modulação do metabolismo local. Tais conjecturas reforçam a suposição de que o coração desempenhe a função como um órgão monitorador da temperatura corporal. Estes achados constituem uma importante contribuição para o campo da fisiologia cardiovascular, potencialmente abrindo novas perspectivas de pesquisa e compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos no controle térmico em nível sistêmico. Ressalta-se, contudo, a necessidade de estudos adicionais para validar e aprofundar os mecanismos subjacentes a essa interação.

7 CONCLUSÃO

Os dados dessa pesquisa sugerem que a ausência do canal TRPA1 em camundongos alimentados com HFD exerceu influência na regulação da expressão do canal TRPM8, dada a natureza desses canais como sensores de temperaturas frias. É plausível supor que a ausência do canal TRPA1 tenha desencadeado uma reorganização adaptativa no organismo desses animais, possivelmente atuando como um mecanismo compensatório na modulação da expressão do canal TRPM8. Em contrapartida, o canal TRPV1 não demonstrou um efeito significativo sobre a ausência de TRPA1, o que está em consonância com sua função como um sensor de calor. Essas observações fomentam a compreensão de uma possível interação entre esses canais, que na ausência de um, o outro pode assumir as demandas requeridas.

A expressão dos genes deste estudo fornece evidências que contribuem para nossa hipótese de uma potencial interação entre o fotorreceptor e termo sensor OPN4, juntamente com os canais TRP, como sensores de temperatura no coração. Esses mecanismos sensoriais podem desempenhar um papel significativo na detecção e resposta às flutuações térmicas presentes no fluxo sanguíneo advindo do trato respiratório e proveniente da periferia, visto que a expressão desses sensores ocorre significativamente nos átrios, influenciando, assim, a expressão dos NPs nas câmaras cardíacas. Portanto, são necessárias mais análises para que se possa compreender como essas câmaras cardíacas respondem a tais flutuações de temperatura, o que nos leva em direção a investigar os mecanismos envolvidos nessas vias de sinalização.

Por fim, em paralelo a esta pesquisa, foram avaliados também todos esses protocolos em camundongos submetidos a uma dieta normal (dados ainda não publicados), no qual, posteriormente, em conjunto, será analisada a diferença de expressão gênica observada em animais alimentados por HFD e por dieta normal.

REFERÊNCIAS

- ANDREI, S. R., *et al.* Stimulation of TRPA1 attenuates ischemia-induced cardiomyocyte cell death through an eNOS-mediated mechanism. **Channels**, v. 13, n. 1, p. 192-206, 1 jan. 2019.
- ALAHMAD, B., *et al.* Associations Between Extreme Temperatures and Cardiovascular Cause-Specific Mortality: Results From 27 Countries. **Circulation**, v. 147, n. 1, p. 35-46, 3 jan. 2023.
- AUBDOOL, A. A., *et al.* TRPA1 is essential for the vascular response to environmental cold exposure. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 11 dez. 2014.
- AIRES, M. de M. **Fisiologia**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
- BENÍTEZ-ANGELES, M., *et al.* TRPV1: structure, endogenous agonists, and mechanisms. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3421, 12 maio 2020.
- BENNETT, B. D., *et al.* Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 34, p. 23060–23067, 1991.
- BERS, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198-205, jan. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/415198a>
- BISHOP, V. S.; MALLIANI, A.; THORÉN, P. Cardiac Mechanoreceptors. **Comprehensive Physiology**, p. 497-555, dez. 1983. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.cp020315>.
- 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, 5 jan. 1981.
- BONNEMAIN, J.; DEL NIDO, P. J.; ROCHE, E. T. Direct Cardiac Compression Devices to Augment Heart Biomechanics and Function. **Annual Review Of Biomedical Engineering**, v. 24, n. 1, p. 137-156, 6 jun. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-bioeng-110220-025309>.
- BON-MATHIER, A. C., *et al.* Brain Natriuretic Peptide Protects Cardiomyocytes from Apoptosis and Stimulates Their Cell Cycle Re-Entry in Mouse Infarcted Hearts. **Cells**, v. 12, n. 1, p. 7, 20 dez. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/cells12010007>.
- BORDICCHIA, M., *et al.* Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p.1022-1036, 1 mar. 2012.

CALVIERI, C.; RUBATTU, S.; VOLPE, M. Molecular mechanisms underlying cardiac antihypertrophic and antifibrotic effects of natriuretic peptides. **Journal Of Molecular Medicine**, v. 90, n. 1, p. 5-13, 9 ago. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-011-0801-z>.

CASTELLANI, J. W.; TIPTON, M. J. Cold Stress Effects on Exposure Tolerance and Exercise Performance. **Comprehensive Physiology**, p. 443-469, 15 dez. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c140081>.

CATERINA, M. J., *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816-824, out. 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/39807>.

CHAIWONG, S., *et al.* Dried mulberry fruit ameliorates cardiovascular and liver histopathological changes in high-fat diet-induced hyperlipidemic mice. **Journal Of Traditional And Complementary Medicine**, v. 11, n. 4, p. 356-368, jul. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcme.2021.02.006>.

CHANG, P., *et al.* BNP protects against diabetic cardiomyopathy by promoting Opa1-mediated mitochondrial fusion via activating the PKG-STAT3 pathway. **Redox Biology**, v. 62, p. 102702, jun. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2023.102702>.

CHAO, Y. C., *et al.* High-throughput quantification of protein structural change reveals potential mechanisms of temperature adaptation in *Mytilus* mussels. **Bmc Evolutionary Biology**, v. 20, n. 1, p. 1-28, 13 fev. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12862-020-1593-y>.

CHEN, P. **Gut Microbiota and Pathogenesis of Organ Injury**. Singapore: Springer Singapore, 2020. 202 p.

CHEN, X., *et al.* An assessment of thermoneutral housing conditions on murine cardiometabolic function. **American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology**, v. 322, n. 2, p. 234-245, 1 fev. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00461.2021>.

CHENG, Q. Y., *et al.* Reduced cardiac ischemia/reperfusion injury by hypothermic reperfusion via activation of transient receptor potential M8 channel. **Life Sciences**, v. 232, p. 116658, set. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116658>.

CHISTIYAKOV, D. A., *et al.* Impact of the cardiovascular system-associated adipose tissue on atherosclerotic pathology. **Atherosclerosis**, v. 263, p. 361-368, ago. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.017>.

COLLIER, R. J., *et al.* Heat stress: physiology of acclimation and adaptation. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 1, p. 12-19, 29 out. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/af/vfy031>.

CORTE, V. D., *et al.* The Natriuretic Peptide System: a single entity, pleiotropic effects. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9642, 1 jun. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24119642>.

DAVIES, W. I. L., *et al.* An extended family of novel vertebrate photopigments is widely expressed and displays a diversity of function. **Genome Research**, v. 25, n. 11, p. 1666-1679, 8 out. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.189886.115>.

DE ASSIS, L. V. M., *et al.* Loss of Melanopsin (OPN4) Leads to a Faster Cell Cycle Progression and Growth in Murine Melanocytes. **Current Issues In Molecular Biology**, v. 43, n. 3, p. 1436-1450, 4 out. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/cimb43030101>.

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

DE ASSIS, L. V. M., *et al.* Melanopsin mediates UVA-dependent modulation of proliferation, pigmentation, apoptosis, and molecular clock in normal and malignant melanocytes. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Cell Research**, v. 1867, n. 10, p. 118789, out. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118789>.

DELLE, C., *et al.* Long-term high-fat diet increases glymphatic activity in the hypothalamus in mice. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1-4137, 13 mar. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-30630-y>.

DE OLIVEIRA, G. M. M., *et al.* The Top 10 Original Articles Published in the Arquivos Brasileiros de Cardiologia and in the Revista Portuguesa de Cardiologia in 2019. **Arq Bras Cardiol**, v. 114, n. 3, p. 564-570, 2020.

DONG, N., *et al.* Plasma Soluble Corin in Patients With Heart Failure. **Circulation: Heart Failure**, v. 3, n. 2, p. 207-211, mar. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/circheartfailure.109.903849>.

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.

DVORAKOVA, M. C., *et al.* Substance P Receptor in the Rat Heart and Regulation of Its Expression in Long-Term Diabetes. **Frontiers In Physiology**, v. 9, p. 1-918, 13 jul. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2018.00918>.

ENCODE project.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=30044>.
 Acessado em 05 de maio de 2023.

FAN, J. F., *et al.* A systematic review and meta-analysis of cold exposure and cardiovascular disease outcomes. **Frontiers In Cardiovascular Medicine**, v. 10, p.1084611, 27 mar. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2023.1084611>.

FOWLER, M. A.; MONTELL, C. Drosophila TRP channels and animal behavior. **Life Sciences**, v. 92, n. 8-9, p. 394-403, mar. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.07.029>.

FORTE, M., *et al.* NPPA/atrial natriuretic peptide is an extracellular modulator of autophagy in the heart. **Autophagy**, v. 19, n. 4, p. 1087-1099, 6 set. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2022.2115675>.

FRANKS, S. J.; HOFFMANN, A. A. Genetics of Climate Change Adaptation. **Annual Review Of Genetics**, v. 46, n. 1, p. 185-208, 15 dez. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155511>.

FREICHEL, M., *et al.* TRP Channels in the Heart. **Neurobiology of TRP Channels**, p. 149–185, 9 ago. 2017.

FUCHS, T., *et al.* Modelos animais na síndrome metabólica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 45, n. 5, p. e1975, 29 out. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-6991e-20181975>.

GAO, F., *et al.* TRPV1 Activation Attenuates High-Salt Diet-Induced Cardiac Hypertrophy and Fibrosis through PPAR- δ Upregulation. **Ppar Research**, v. 2014, p. 1-12, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/491963>.

GAO, J., *et al.* The association between cold spells and admissions of ischemic stroke in Hefei, China: modified by gender and age. **Science Of The Total Environment**, v. 669, p. 140-147, jun. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.452>.

GAO, N., *et al.* A bibliometrics analysis and visualization study of TRPV1 channel. **Frontiers In Pharmacology**, v. 14, p. 1-1076921, 21 mar. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2023.1076921>.

GERALD, W.; DORN, I. I. Adrenergic Signaling Polymorphisms and Their Impact on Cardiovascular Disease. **American Physiological Society**, v. 90, n. 3, p. 1013-1062, 2010.

GIBB, A. A.; HILL, B. G. Metabolic Coordination of Physiological and Pathological Cardiac Remodeling. **Circulation Research**, v. 123, n. 1, p. 107-128, 22 jun. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.118.312017>.

GIBELIN, P. Météo et saisons influencent-elles notre cœur ? **La Presse Médicale**, v. 44, n. 7-8, p. 821-827, jul. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lpm.2015.07.004>.

GILSBACH, R., *et al.* Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development, maturation and disease. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 5288, 22 out. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6288>.

GOETZE, J. P., *et al.* Cardiac natriuretic peptides. **Nature Reviews Cardiology**, v. 17, n. 11, p. 698-717, 22 maio 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-020-0381-0>.

GOPALAKRISHNAN, S.; KANNAN, N. N. Only time will tell: The interplay between circadian clock and metabolism. **Chronobiology International**, v. 38, n. 2, p. 149-167, 2021.

GRUZDEVA, O. V., *et al.* Characteristics of adipocytokine expression by local fat depots of the heart: relationship with the main risk factors for cardio-vascular diseases. **Frontiers In Endocrinology**, v. 13, p. 1-991902, 8 set. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2022.991902>.

GUERRERO-VARGAS, N. N., *et al.* Circadian disruption promotes tumor growth by anabolic host metabolism; experimental evidence in a rat model. **BMC Cancer**, v. 17, n.1, 2017.

GUTIÉRREZ-CUEVAS, J., *et al.* Molecular Mechanisms of Obesity-Linked Cardiac Dysfunction: an up-date on current knowledge. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 629, 12 mar. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10030629>.

HALL, E. J., *et al.* Cardiac natriuretic peptide deficiency sensitizes the heart to stress-induced ventricular arrhythmias via impaired CREB signalling. **Cardiovascular Research**, v. 118, n. 9, p. 2124-2138, 30 jul. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvab257>.

HAMANO, M., *et al.* Prediction of single-cell mechanisms for disease progression in hypertrophic remodelling by a trans-omics approach. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-8112, 14 abr. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-86821-y>.

HU, Y.; LIU, Y.; LI., S. Effect of Acute Cold Stress on Neuroethology in Mice and Establishment of Its Model. **Animals**, v. 12, n. 19, p. 2671, 4 out. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ani12192671>.

HUANG, S. S., *et al.* Activation of peripheral TRPM8 mitigates ischemic stroke by topically applied menthol. **Journal Of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 1-192, 27 jul. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-022-02553-4>.

HUDA, A., *et al.* Responses of different Drosophila species to temperature changes. **Journal Of Experimental Biology**, v. 225, n. 11, p. 1-243708, 31 maio 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.243708>.

HUGHES, S., *et al.* Signalling by melanopsin (OPN4) expressing photosensitive retinal ganglion cells. **Eye**, v. 30, n. 2, p.247-254, 15 jan. 2016.

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, 14 jan. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409252102>.

IZAR, M. C. O., *et al.* Posicionamento sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular – 2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, n. 1, p. 160-212, jan. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.36660/abc.20201340>

IZQUIERDO, C., *et al.* TRPM8 Channels: advances in structural studies and pharmacological modulation. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8502, 7 ago. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22168502>.

JAUQUEMAR, D.; SCHENKER, T.; TRUEB, B. An Ankyrin-like Protein with Transmembrane Domains Is Specifically Lost after Oncogenic Transformation of Human Fibroblasts. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 274, n. 11, p. 7325-7333, mar. 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.11.7325>.

JAYACHANDRAN, M.; CHUNG, S. S. M.; XU, B. A critical review on diet-induced microbiota changes and cardiovascular diseases. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 60, n. 17, p. 2914-2925, 25 set. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2019.1666792>.

JIA, G.; JIA, Y.; SOWERS, J. R. Contribution of Maladaptive Adipose Tissue Expansion to Development of Cardiovascular Disease. **Comprehensive Physiology**, p. 253-262, 6 dez. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c160014>.

JIN, N., *et al.* Dysregulation of the Renin-Angiotensin System and Cardiometabolic Status in Mice Fed a Long-Term High-Fat Diet. **Medical Science Monitor**, v. 25, p. 6605-6614, 3 set. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.12659/msm.914877>.

KASHIO, M.; TOMINAGA, M. TRP channels in thermosensation. **Current Opinion In Neurobiology**, v. 75, p. 102591, ago. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2022.102591>.

KEATINGE, W. R., *et al.* Increases in platelet and red cell counts, blood viscosity, and arterial pressure during mild surface cooling: factors in mortality from coronary and cerebral thrombosis in winter. **Bmj**, v. 289, n. 6456, p. 1405-1408, 24 nov. 1984. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.289.6456.1405>.

KOLLERITSCH, S., *et al.* Adverse cardiac remodeling augments adipose tissue β -adrenergic signaling and lipolysis counteracting diet-induced obesity. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 299, n. 6, p. 104788, jun. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104788>.

KOSMALA, W.; SANDERS, P.; MARWICK, T. H. Subclinical Myocardial Impairment in Metabolic Diseases. **Jacc: Cardiovascular Imaging**, v. 10, n. 6, p. 692-703, jun. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcmg.2017.04.001>.

KUDSI, S. Q., *et al.* Transcriptional landscape of TRPV1, TRPA1, TRPV4, and TRPM8 channels throughout human tissues. **Life Sciences**, v. 308, p. 120977, nov. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120977>.

KUNDAPUR, R., *et al.* A community-level educational intervention trail to study the impact of life style modification in control of hypertension and diabetes- A non-randomized trial (Before and after intervention study without control). **Journal Of Family Medicine And Primary Care**, v. 11, n. 11, p. 6759, 2022. Disponível em: http://dx.doi.org/10.4103/jfmipc.jfmipc_2174_21.

KUSUMOTO, J., *et al.* OPN4 belongs to the photosensitive system of the human skin. **Genes To Cells**, v. 25, n. 3, p. 215-225, 6 fev. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/gtc.12751>.

KUWAHARA, K.; NAKAO, K. Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. **Endocrine Journal**, v. 57, n. 7, p. 555-565, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.k10e-150>.

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. DrosophilaTRPA1 Functions in Temperature Control of Circadian Rhythm in Pacemaker Neurons. **The Journal Of Neuroscience**, v. 33, n. 16, p. 6716-6725, 17 abr. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.4237-12.2013>.

LEITMAN, D. C., *et al.* Identification of multiple binding sites for atrial natriuretic factor by affinity cross-linking in cultured endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 25, p. 11650–11655, 1986.

LEVINE, B.; KROEMER, G.. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27-42, jan. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>.

LIU, H., *et al.* Inflammatory Macrophage Interleukin-1 β Mediates High-Fat Diet-Induced Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. **Jacc: Basic to Translational Science**, v. 8, n. 2, p. 174-185, fev. 2023a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacbts.2022.08.003>.

LIU, J., *et al.* Alleviation of thermal nociception depends on heat-sensitive neurons and a TRP channel in the brain. **Current Biology**, v. 33, n. 12, p. 2397-2406, jun. 2023b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2023.04.055>.

LV, H., *et al.* Chronic cold stress-induced myocardial injury: effects on oxidative stress, inflammation and pyroptosis. **Journal Of Veterinary Science**, v. 24, n. 1, p. e2, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4142/jvs.22185>.

LUO, Y., *et al.* Akkermansia muciniphila prevents cold-related atrial fibrillation in rats by modulation of TMAO induced cardiac pyroptosis. **Ebiomedicine**, v. 82, p. 104087, ago. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104087>.

MA, S.; WANG, D. H. Knockout of Trpa1 accelerates age-related cardiac fibrosis and dysfunction. **Plos One**, v. 17, n. 9, p. 0274618, 14 set. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0274618>.

MAN, J.; BARNETT, P.; CHRISTOFFELS, V. M. Structure and function of the Nppa–Nppb cluster locus during heart development and disease. **Cellular And Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 8, p. 1435-1444, 4 jan. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-017-2737-0>.

MATHEW, P.; KANMANTHAREDDY, A. **Prosthetic Heart Valve**. [Updated 2022 Jul 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536987/>

MCKEMY, D. D.; NEUHAUSSER, W. M.; JULIUS, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, v. 416, n. 6876, p. 52-58, 10 fev. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature719>.

MEENTS, J. E.; CIOTU, C. I.; FISCHER, M. J. M. TRPA1: a molecular view. **Journal Of Neurophysiology**, v. 121, n. 2, p. 427-443, 1 fev. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00524.2018>.

MOHRMAN, D. E.; HELLER, L. J. **Fisiologia Cardiovascular (Lange)**. 6ª ed. São Paulo: The McGraw-Hill Companies, 2007.

MORAES, M. N, *et al.* Melanopsin, a canonical light receptor, mediates thermal activation of clock genes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 13977, 25 oct. 2017.

MORAES, R. D. A; WEBB, R. C; SILVA, D, F. Vascular Dysfunction in Diabetes and Obesity: Focus on TRP Channels. **Frontiers Physiology**, v. 12, n. 645109, 26 fev. 2021.

MOYES, A. J.; HOBBS, A. J. C-Type Natriuretic Peptide: a multifaceted paracrine regulator in the heart and vasculature. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2281, 8 maio 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20092281>.

MUKOYAMA, M, *et al.* Increased Human Brain Natriuretic Peptide in Congestive Heart Failure. **New England Journal Of Medicine**, v. 323, n. 11, p. 757-758, 13 set. 1990. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199009133231114>.

MULLER, M. R.; GUIMARÃES, S. S. Sleep disorders impact on daily functioning and life quality. **Estudos de Psicologia**, v. 24, n. 4, p. 519-528, 2007.

MULLER, C.; MORALES, P.; REGGIO, P. H. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. **Frontiers In Molecular Neuroscience**, v. 11, p. 1-487, 15 jan. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2018.00487>.

MURE, L. S. Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells of the Human Retina. **Frontiers In Neurology**, v. 12, p. 1-636330, 25 mar. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2021.636330>.

NAGASE, M., *et al.* Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Journal Of Hypertension**, v. 15, n. 11, p. 1235-1243, nov. 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/00004872-199715110-00007>.

NAKAGAWA, Y.; NISHIKIMI, T.; KUWAHARA, K. Atrial and brain natriuretic peptides: hormones secreted from the heart. **Peptides**, v. 111, p. 18-25, jan. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2018.05.012>.

NAWSHERWAN, J. L., *et al.* Prediction of cardiovascular diseases mortality- and disability-adjusted life-years attributed to modifiable dietary risk factors from 1990 to 2030 among East Asian countries and the world. **Frontiers In Nutrition**, v. 9, p. 898978, 17 out. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2022.898978>.

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, 19 set. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00359-012-0754-x>.

NISHIKIMI, T., *et al.* Pro-B-type natriuretic peptide is cleaved intracellularly: impact of distance between o-glycosylation and cleavage sites. **American Journal Of Physiology-Regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, v. 309, n. 6, p. 639-649, 15 set. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00074.2015>.

NGUYEN, J. L., *et al.* Drier air, lower temperatures, and triggering of paroxysmal atrial fibrillation. **Epidemiology**, v. 26, n. 3, p. 374-380, mai. 2015.

OI, Y., *et al.* Exogenous ANP Treatment Ameliorates Myocardial Insulin Resistance and Protects against Ischemia-Reperfusion Injury in Diet-Induced Obesity. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8373, 29 jul. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23158373>.

OLINSKI, L. E.; LIN, E. M.; OANCEA, E. Illuminating insights into opsin 3 function in the skin. **Advances In Biological Regulation**, v. 75, p. 100668, jan. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbior.2019.100668>.

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. 93-106, 1 jan. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00091.2017>.

ÖZTOP, M., *et al.* Localization profiles of natriuretic peptides in hearts of pre-hibernating and hibernating Anatolian ground squirrels (*Spermophilus xanthoprimum*). **Veterinary Research Communications**, v. 43, n. 2, p. 45-65, 28 jan. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-019-9745-5>.

PAKIET, A., *et al.* The Effect of a High-Fat Diet on the Fatty Acid Composition in the Hearts of Mice. **Nutrients**, v. 12, n. 3, 2020. Disponível em: doi:10.3390/nu12030824

PAN, X., *et al.* Effects of High-Fat Diet on Cardiovascular Protein Expression in Mice Based on Proteomics. **Diabetes, Metabolic Syndrome And Obesity**, v. 16, p. 873-882, mar. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2147/dmso.s405327>.

PANDEY, K. N. Biology of natriuretic peptides and their receptors. **Peptides**, v. 26, n. 6, p. 901-932, jun. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2004.09.024>.

PANDEY, K. N. Guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A: identification, molecular characterization, and physiological genomics. **Frontiers In Molecular Neuroscience**, v. 15, p. 1076799, 4 jan. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2022.1076799>.

PAULA, A. B. R., *et al.* Does a high-fat diet affect the circadian clock, or is it the other way around? A systematic review. **Nutrition Research**, v. 84, p. 1-13, dez. 2020a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2020.10.003>.

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

PAULA, A. B. R., *et al.* The Effect of Diet on the Cardiac Circadian Clock in Mice: a systematic review. **Metabolites**, v. 12, n. 12, p. 1273, 15 dez. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo12121273>.

PEIER, A. M., *et al.* A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 705–715, mar. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00652-9)

PLAZA-CAYÓN, A.; GONZÁLEZ-MUÑIZ, R.; MARTÍN-MARTÍNEZ, M. Mutations of TRPM8 channels: unraveling the molecular basis of activation by cold and ligands. **Medicinal Research Reviews**, v. 42, n. 6, p. 2168-2203, 17 ago. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/med.21920>.

PÉREZ-CEREZALES, S., *et al.* Involvement of opsins in mammalian sperm thermotaxis. **Scientific Reports**, v. 5, n. 16146, nov. 2015.

PITTENDRIGH, C. S. Temporal Organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. **Annual Review of Physiology**, v. 55, n. 1, p.17-54, out. 1993.

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, 30 dec. 2015.

PORTES, A. M. O, *et al.* A systematic review of the effects of cold exposure on pathological cardiac remodeling in mice. **Journal of Thermal Biology**, v. 114, p. 103598, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103598>.

POTTER, L. R., *et al.* Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.191, p. 341–366, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-540-68964-5_15

PROVENCIO, I.; ROLLAG, M. D.; CASTRUCCI, A. M. Photoreceptive net in the mammalian retina. **Nature**, v. 415, n. 6871, p.493-493, jan. 2002.

ROOIJ, E.; OLSON, E. N. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 177, n. 9, p. 2369–2376, 2007.

ROSE, R. A; GILES, W. R. Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 2, p. 353–366, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.144253>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20040798>

RUPEREZ, C., *et al.* Autophagy is Involved in Cardiac Remodeling in Response to Environmental Temperature Change. **Frontiers in Physiology**, v. 13, n. 864427, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.864427>

SAMANTA, A.; HUGHES, T. E. T.; MOISEENKOVA-BELL, V. Y. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 87, p. 141–165, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_6

SARZANI, R., *et al.* Role of Cardiac Natriuretic Peptides in Heart Structure and Function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 14415, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms232214415>

SHEN, W. L., *et al.* Function of rhodopsin in temperature discrimination in *Drosophila*. **Science**, v. 331, n. 6022, p. 1333–1336, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1198904>

SHETH, T., *et al.* Increased winter mortality from acute myocardial infarction and stroke: the effect of age. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 33, n. 7, p. 1916–1919, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(99\)00137-0](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(99)00137-0)

SHI, F., *et al.* Diet-dependent natriuretic peptide receptor C expression in adipose tissue is mediated by PPAR γ via long-range distal enhancers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 297, n. 2, aug. 2021.

SENGUPTA, P., GARRITY, P. Sensing temperature. **Current Biology**, v. 23, n. 8, p. R304–R307, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.009>

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 7^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SPEKKER, E.; KÖRTÉSI, T.; VÉCSEI, L. TRP Channels: Recent Development in Translational Research and Potential Therapeutic Targets in Migraine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 700, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24010700>

SUA-CESPEDES, C., *et al.* Melanopsin (OPN4) is a novel player in skin homeostasis and attenuates UVA-induced effects. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 242, 2023. Disponível em: [10.1016/j.jphotobiol.2023.112702](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2023.112702)

SUDOH, T., *et al.* A new natriuretic peptide in porcine brain. **Nature**, v. 332, n. 6159, p. 78–81, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/332078a0>

SUDOH, T., *et al.* C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 168, n. 2, p. 863–870, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)92401-k](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)92401-k)

SUGA, S., *et al.* Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". **The Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 3, p. 1145–1149, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI115933>

SCHWARZ, A. P., *et al.* Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples. **Molecular and cellular probes**, v. 53, p. 101611, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101611>

TAM, S. K. E., *et al.* Dim light in the evening causes coordinated realignment of circadian rhythms, sleep, and short-term memory. **PNAS**, v. 118, n. 39, 28 sep. 2021.

THAPA, D., *et al.* Influence of Cold-TRP Receptors on Cold-Influenced Behaviour. **Pharmaceuticals** (Basel, Switzerland), v. 15, n. 1, p. 42, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph15010042>

TSAO, C. W., *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2023 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 147, p. e93–e621, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001123>

VACA, F. S.; BORDONI, B. **Anatomy, Thorax, Mitral Valve**. PMID: 31751074, Bookshelf ID: NBK549884, 2022. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549884/#_article-37651_s1_ (accessed 10 may 2023).

VAIČIULIS, V., *et al.* Risk of ischemic and hemorrhagic stroke in relation to cold spells in four seasons. **BMC Public Health**, v. 23, n. 1, p. 554, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12889-023-15459-4>

WALI, J. A., *et al.* Cardio-Metabolic Effects of High-Fat Diets and Their Underlying Mechanisms-A Narrative Review. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1505, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12051505>

WANG, Y; HILL, J. A. Electrophysiological Remodeling in Heart Failure. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 48, n. 4, p. 619–632, 2010

WANG, Y., *et al.* Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Protects Against Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy by Promoting Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 80, n. 3, p. 430–441, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000001301>

WANG, M., *et al.* TRPA1 deficiency aggravates dilated cardiomyopathy by promoting S100A8 expression to induce M1 macrophage polarization in rats. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 37, n. 6, p. e22982, 2023a. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.202202079RR>

WANG, X., *et al.* Molecular architecture and gating mechanisms of the Drosophila TRPA1 channel. **Cell Discovery**, v. 9, n. 1, p. 36, 2023b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41421-023-00527-1>

WONG, K.Y. Non-Photoreceptor Photoreception. **Encyclopedia Of Neuroscience**, p. 1205-1211, 2009. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-008045046-9.00907-4>

XIONG, S., *et al.* Activation of Transient Receptor Potential Melastatin Subtype 8 Attenuates Cold-Induced Hypertension Through Ameliorating Vascular Mitochondrial Dysfunction. **Journal Of The American Heart Association**, v. 6, n. 8, 2 ago. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/jaha.117.005495>.

YIN, Y., *et al.* Activation mechanism of the mouse cold-sensing TRPM8 channel by cooling agonist and PIP 2. **Science**, v. 378, n. 6616, p. 1, 14 out. 2022. American Association for the Advancement of Science (AAAS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.add1268>.

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, 1 fev. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00457.2014>.

ZHANG, H., *et al.* The role of TRPA1 channels in thermosensation. **Cell Insight**, v. 1, n. 6, p. 100059, dez. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellin.2022.100059>.

ZHENG, H., *et al.* CircSnx12 Is Involved in Ferroptosis During Heart Failure by Targeting miR-224-5p. **Frontiers In Cardiovascular Medicine**, v. 8, p. 1-13, 21 abr. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2021.656093>.

ZHU, M., *et al.* STAT3 signaling promotes cardiac injury by upregulating NCOA4-mediated ferritinophagy and ferroptosis in high-fat-diet fed mice. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 201, p. 111-125, maio 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.03.003>.

ZYGMUNT, P. M., HÖGESTÄTT, E. D. TRPA1. **Handbook Of Experimental Pharmacology**, p. 583-630, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_23.

ANEXOS

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 "EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO FRIO AMBIENTAL SOBRE A EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS NOS ÁTRIOS DIREITO E ESQUERDO EM CAMUNDONGOS OBESOS: PAPEL DA MELANOPSINA E DOS CANAIS TRPs NA TERMORRECEPÇÃO", protocolada sob o CEUA nº 2462300621 (ID 000649), sob a responsabilidade de **Mauro Cesar Isoldi** e equipe; *Bianca Iara Campos Coelho* - 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 15/10/2021.

We certify that the proposal "EFFECTS OF ENVIRONMENTAL COLD EXPOSURE ON THE EXPRESSION OF NATRIURETRIC PEPTIDES IN THE RIGHT AND LEFT ATRIAS IN OBESE MICE: ROLE OF MELANOPHSIN AND TRP CHANNELS IN THERMORRECEPTION", utilizing 64 Isogenics mice (64 males), protocol number CEUA 2462300621 (ID 000649), under the responsibility of **Mauro Cesar Isoldi** and team; *Bianca Iara Campos Coelho* - 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 10/15/2021.

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

Vigência da Proposta: de **10/2021 a 07/2022** Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Centro de Ciência Animal**
 Espécie: **Camundongos isogênicos** sexo: **Machos** idade: **8 a 10 semanas** N: **64**
 Linhagem: **C57BL/6** Peso: **15 a 20 g**

Local do experimento: A estufa UTA encontra-se presente em nosso laboratório (Laboratório de Sinalização Celular _LSC), e, posteriormente, será encaminhada ao Centro de Ciência Animal (CCA), local onde serão realizados os experimentos.

Ouro Preto, 15 de outubro de 2021

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

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

ANEXO B - VALIDAÇÃO DA GENOTIPAGEM *TRPA1* KO

22/08/2019

Master Protocol Details


[Return to Protocol Search](#)

Stock Number: 006401

Strain Name: B6.129P-Trpa1^{tm1Kyk}/JAllele: *Trpa1*^{tm1Kyk}Protocol Name: *Trpa1*^{tm1Kyk}

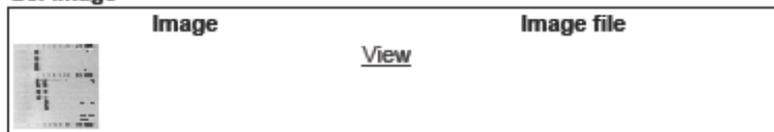
Method: Standard PCR

Version: 1.3

Created: 19-May -2017 Updated: 19-May -2017

Expected Results: Mutant = 184 bp
 Heterozygote = 184 bp and 317 bp
 Wild type = 317 bp

Gel Image



Separated by gel electrophoresis on a 1.5% agarose gel.

Protocol Primers

Primer	5' Label	Sequence 5' → 3'	3' Label	Primer Type	Note
oIMR8645		CCT CGA ATC GTG GAT CCA CTA GTT CTA GAT		Mutant Forward	Reaction A
oIMR8646		GAG CAT TAC TTA CTA GCA TCC TGC CGT GCC		Mutant Reverse	Reaction A Trpa1
oIMR9179		TCC TGC AAG GGT GAT TGC GTT GTC TA		Wild type Forward	Reaction A
oIMR9180		TCA TCT GGG CAA CAA TGT CAC CTG CT		Wild type Reverse	Reaction A

Reaction A

Reaction Component	Final Concentration	Unit
ddH ₂ O	up to final volume	
Kapa 2G HS buffer	1.3	X
MgCl ₂	2.6	mM
dNTP KAPA	.26	mM
oIMR8645	.5	uM
oIMR8646	.5	uM
oIMR9179	.5	uM
oIMR9180	.5	uM
Glycerol	6.5	%
Dye	1	X
Kapa 2G HS taq polymerase	.03	U/ul
DNA	50-200	ng

Cycling

Step #	Temp °C	Time	Note
1	94	2 min	
2	94	20sec	
3	65	15sec	-0.5 C per cycle decrease
4	68	10sec	
5			repeat steps 2-4 for 10 cycles (Touchdown)
6	94	15sec	
7	60	15sec	
8	72	10sec	
9			repeat steps 6-8 for 28 cycles
10	72	2 min	
11	10	hold	

ANEXO C - CURVA DE MELTING REFERENTE A AMPLIFICAÇÃO DO NPPA