

Universidade Federal de Ouro Preto

Escola de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição
PPGSN

Dissertação

**O coração do camundongo
como um possível termo-
sensor?
Implicações do ácido
palmítico nos osciladores
circadianos do coração**

Ana Beatriz Rezende Paula

Ouro Preto
2020



ANA BEATRIZ REZENDE PAULA

**O CORAÇÃO DO CAMUNDONGO COMO UM POSSÍVEL
TERMO-SENSOR?
IMPLICAÇÕES DO ÁCIDO PALMÍTICO NOS
OSCILADORES CIRCADIANOS DO CORAÇÃO**

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: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição.

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

Ouro Preto – MG

2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P324o Paula, Ana Beatriz Rezende .
O coração do camundongo como um possível termo-sensor?
Implicações do ácido palmítico nos osciladores circadianos do coração.
[manuscrito] / Ana Beatriz Rezende Paula. - 2020.
80 f.: il.: color., gráf., tab..

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. Coração - Ácidos graxos. 2. Osciladores - Ritmos circadianos. 3. Cronobiologia. I. Isoldi, Mauro César. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 612.17

Bibliotecário(a) Responsável: Sonia Marcelino - CRB6 - 2247



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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Beatriz Rezende Paula

O coração do camundongo como um possível termosensor? Implicações do ácido palmítico nos osciladores circadianos do coração

Membros da banca

Prof. Victor Neiva Lovarato (Unifagoc)
Prof. Guilherme de Paula Costa (UFOP)
Prof. Mauro César Isoldi (UFOP) - Orientador

Versão final
Aprovado em 28 de fevereiro de 2020

De acordo

Professor Orientador
Mauro César Isoldi - UFOP



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cesar Isoldi, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/09/2020, às 09:53, 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 **0085110** e o código CRC **F7338F13**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.006838/2020-56

SEI nº 0085110

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: - www.ufop.br

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Sinalização Celular – ICEB/UFOP e no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Pigmentação – IB/USP, com auxílio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

“Uso a palavra para compor meus silêncios.
Não gosto das palavras
fatigadas de informar.
Dou mais respeito
às que vivem de barriga no chão
tipo água pedra sapo.
Entendo bem o sotaque das águas.
Dou respeito às coisas desimportantes
e aos seres desimportantes.
Prezo insetos mais que aviões.
Prezo a velocidade
das tartarugas mais que a dos mísseis.
Tenho em mim esse atraso de nascença.
Eu fui aparelhado
Para gostar de passarinhos.
Tenho abundância de ser feliz por isso.
Meu quintal é maior do que o mundo.
Sou um apanhador de desperdícios:
Amo os restos
como as boas moscas.
Queria que a minha voz tivesse um formato de canto.
Porque eu não sou da informática:
eu sou da invencionática.
Só uso a palavra para compor meus silêncios.”

(Manoel de Barros, O Apanhador de Desperdícios do livro Memórias Inventadas)

AGRADECIMENTO

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pelo dom da vida.

Ao meu orientador, Professor Doutor Mauro Isoldi, por toda a paciência, empenho e sentido prático que tivestes comigo durante este tempo. Muito obrigada por ter me corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar.

A Professora e Doutora Ana Maria Castrucci e ao Doutor Leonardo de Assis, que gentilmente me acolheram em seu laboratório e colaboraram comigo na execução dos meus experimentos. Não posso deixar de falar o meu muito obrigada a Prof^a.Dra. Ana Maria Castrucci pela acolhida em sua residência.

A minha família que sempre me deu apoio em todos momentos.

A Dona Aparecida que me recebeu carinhosamente em sua pensão, aos amigos Paulo, Erik, Matheus e demais amigos que lá moram.

Aos amigos de laboratório, que vivemos momentos felizes e me ajudaram a superar os obstáculos durante este período. Em especial, a Denise que sempre esteve comigo, me incentivando e salvando quando mais precisei. Eternamente obrigada!!

A minha amiga (mana) Paula, companheira de lar, que sempre esteve ao meu lado na alegria e na tristeza, na saúde e na doença.

Agradeço a Professora de Português, Fernanda, pela contribuição.

A querida tia Teca, Professora e Doutora em Linguística, agradeço carinhosamente pela contribuição na correção do meu trabalho.

Agradeço aos funcionários das bibliotecas do ICEB, Escola de Nutrição, DEMUS/DEART e Escola de Minas, que foram sempre prestáveis, e as meninas da limpeza, por deixar o nosso laboratório sempre bem limpo e arrumado.

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

RESUMO

Visto que os ritmos biológicos são gerados por uma maquinaria circadiana, e que a fisiologia cardiovascular sabidamente possui osciladores, a análise de genes de relógio no coração trará avanços no conhecimento desse relógio periférico. Somado a isso, sabe-se que o coração é um órgão que expressa diversos membros da família de canais de potencial receptor transitório (TRP), além de algumas opsinas. Possivelmente, o coração atua monitorando variações de temperatura interna, através do fluxo de sangue vindo da periferia e do trato respiratório, que seria interpretada por ele na expressão e liberação de seus principais hormônios. O presente estudo objetiva avaliar a expressão de genes do relógio, canais TRP e opsinas, em explantes cardíacos, em condições de 12h:12h de ciclo claro-escuro LD; e investigar os efeitos do ácido palmítico no relógio local, em cultura primária de cardiomiócitos. As culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos adultos selvagens C57BL/6J foram utilizadas para avaliar o efeito do ácido palmítico na expressão dos genes do relógio *Bmal1* e *Per1*, pelo ensaio de qPCR. Foram avaliados também a expressão de genes do relógio *Bmal1* e *Per1*, das opsinas *Opn1*, *Opn2*, *Opn3* e *Opn4*, e dos canais *TrpVI* e *TrpAI*, em átrio e ventrículo de camundongos adultos selvagens C57BL/6J, *TrpVI KO* e *TrpAI KO*, pelo ensaio de qPCR.. Os resultados de qPCR de tecido cardíaco indicaram uma maior expressão do gene *Per1* no átrio em relação ao ventrículo dos animais *TrpVI KO*. O gene *Bmal1* não apresentou nenhuma diferença significativa, independente do genótipo ou da cavidade cardíaca. As opsinas *Opn1* e *Opn2* foram mais expressas no átrio em relação ao ventrículo dos animais selvagens. Já para as opsinas, *Opn3* e *Opn4*, não houve diferença significativa, independente do genótipo. Os canais *TrpVI* e *TrpAI* foram mais expressos no átrio em relação ao ventrículo nos animais selvagens. Não houve diferença significativa entre átrio e ventrículo para os canais *TrpVI* e *TrpAI* nos animais *TRPA1 KO* e *TRPVI KO*, respectivamente. Os valores obtidos na qPCR das culturas de células mostraram um perfil de alta expressão do gene *Bmal1* e baixo do *Per1* 14 horas após o tratamento com ácido palmítico. Conclui-se que o canal TRPV1 participa da regulação do sistema circadiano cardíaco. Além disso, as opsinas e os canais TRP podem estar atuando como termo-sensores no coração.

PALAVRAS-CHAVE: Ácidos graxos, Coração, Osciladores, Ritmos circadianos, Cronobiologia.

ABSTRACT

Since biological rhythms are generated by circadian machinery, and cardiovascular physiology is known to have oscillators, the analysis of clock genes in the heart will bring advances in the knowledge of this peripheral clock. In addition, it is known that the heart is an organ that expresses several members of the family of potential transient receptor (TRP) channels, in addition to some opsins. Possibly, the heart works by monitoring variations in internal temperature, through the blood flow coming from the periphery and the respiratory tract, which would be interpreted by it in the expression and release of its main hormones. The present study aims to evaluate the expression of clock genes, TRP channels and opsins, in cardiac explants, in conditions of 12h: 12h of light-dark cycle LD; and to investigate the effects of palmitic acid on the local clock in a primary culture of cardiomyocytes. Primary cultures of cardiomyocytes from C57BL / 6J wild adult mice were used to evaluate the effect of palmitic acid on the expression of the clock genes *Bmal1* and *Per1*, by the qPCR assay. The expression of clock genes *Bmal1* and *Per1*, of opsins *Opn1*, *Opn2*, *Opn3* and *Opn4*, and of the channels *TrpV1* and *TrpA1*, in the atrium and ventricle of wild adult mice C57BL / 6J, *TrpV1* KO and *TrpA1* KO, were also evaluated by the assay of qPCR .. The results of cardiac tissue qPCR indicated a greater expression of the *Per1* gene in the atrium in relation to the ventricle of the animals *TrpV1* KO. The *Bmal1* gene did not show any significant difference, regardless of the genotype or the cardiac cavity. *Ops1* *Opn1* and *Opn2* were more expressed in the atrium compared to the ventricle of wild animals. As for opsins, *Opn3* and *Opn4*, there was no significant difference, regardless of the genotype. The channels *TrpV1* and *TrpA1* were more expressed in the atrium compared to the ventricle in wild animals. There was no significant difference between atrium and ventricle for the *TrpV1* and *TrpA1* channels in the *TRPA1* KO and *TRPV1* KO animals, respectively. The values obtained in the qPCR of the cell cultures showed a profile of high expression of the *Bmal1* gene and low of *Per1* 14 hours after treatment with palmitic acid. It is concluded that the *TRPV1* channel participates in the regulation of the cardiac circadian system. In addition, opsins and TRP channels may be acting as thermo-sensors in the heart.

KEYWORDS: Fatty acids, Heart, Oscillators, Circadian rhythms, Chronobiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Maquinaria molecular de relógio biológico em mamíferos. A nível molecular o relógio biológico de mamíferos é constituído de loops de feedback transcricional. O principal loop envolve os fatores de transcrição CLOCK e BMAL1, que formam um complexo e regulam a transcrição de outros genes do relógio, *Per* e *Cry*. Outro loop consiste no *Rev-Erba/β* e *Rora/γ*, que controla a expressão de *Bmal1*, atuando como repressores e ativadores transcricional, respectivamente20
- Figura 2** - Sistema de temporização circadiana endógena. (Que controla o ritmo de atividade/repouso.)22
- Figura 3** - Fluxograma - Delineamento experimental39
- Figura 4** - Expressão do gene *Bmal1* em explantes cardíacos de camundongos WT, *TrpVI KO* e *TrpAI KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$46
- Figura 5** - Expressão do gene *Per1* em explantes cardíacos de camundongos WT, *TrpVI KO* e *TrpAI KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$. (*) Indica significativamente diferentes do respectivo ventrículo.....47
- Figura 6** - Expressão do gene *TrpAI* em explantes cardíacos de camundongos WT e *TrpVI KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$. (*) Indica significativamente diferentes do respectivo ventrículo.....48
- Figura 7** - Expressão do gene *TrpVI* em explantes cardíaco de camundongos WT e *TrpAI KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S.

Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$. (*) Indica significativamente diferentes do respectivo ventrículo.....48

Figura 8 - Expressão do gene *Opn1* em explantes cardíacos de camundongos WT, *TrpVI KO* e *TrpAI KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$. (*) Indica significativamente diferentes do respectivo ventrículo.....49

Figura 9 - Expressão do gene *Opn2* em explantes cardíacos de camundongos WT, *TrpVI KO* e *TrpAI KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$. (*) Indica significativamente diferentes do respectivo ventrículo.....50

Figura 10 - Expressão do gene *Opn3* em explantes cardíacos de camundongos WT, *TrpVI KO* e *TrpAI KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$50

Figura 11 - Expressão do gene *Opn4* em explantes cardíacos de camundongos WT, *TrpVI KO* e *TrpAI KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$51

Figura 12 - Expressão do gene *Per1* em cultura primária de cardiomiócitos submetidos a meio de cultura sem ácido palmítico e com ácido palmítico (0,4 mM) por 24 horas. O lizado celular foi coletado 2 e 14 horas após o tratamento. Os valores são apresentados como expressão média do gene de interesse normalizado pela média dos genes *eEF1 α 1* e *Rpl37*. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguida por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$52

Figura 13 - Expressão do gene *Bmal1* em cultura primária de cardiomiócitos submetidos a meio de cultura sem ácido palmítico e com ácido palmítico (0,4 mM) por 24 horas. O lizado celular foi coletado 2 e 14 horas após o tratamento. Os valores são apresentados como expressão média do gene de interesse normalizado pela média dos genes eEF1 α 1 e Rpl37. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução de BRDU [10^{-2} M] (5-Bromo-2'-Deoxiuridina)	37
Tabela 2 - Composição do meio de cultura normal	37
Tabela 3 - Composição da solução tampão de digestão	37
Tabela 4 - Composição do meio de cultura baixa glicose do meio hiperlipídico	37
Tabela 5 - Composição da solução BSA conjugado com ácido palmítico	37
Tabela 6 - Composição da solução de 50% de soro para sincronização do relógio	37
Tabela 7 - Sequência de <i>primers</i> e <i>probes</i> para PCR quantitativo	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AGs	Ácidos graxos
ANOVA	Análise de variância unidirecional
ANP	Peptídeos natriuréticos atrial
AMP-c	Monofosfato cíclico de adenosina
APS	Selador de placa de acetato
<i>Bmal1</i>	<i>Brain and Muscle Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like</i>
BNP	Peptídeos Natriuréticos do tipo B
BAT	Tecido adiposo marrom
BRDU	5-bromo-2'-deoxiuridina
CCG	Genes controlados pelo relógio
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
Cyp7a1	Colesterol 7 alfa-hidroxilase
<i>Cry</i>	<i>Cryptochrome</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CNP	Peptídeos Natriuréticos do tipo C
DAG	Diacilglicerol
DD	Escuridão Constante
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelulares
GC	Guanilil ciclase
GC-A	Guanilil ciclase A
GC-B	Guanilil ciclase B
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GMPc	Monofosfato cíclico de guanossina
HFD	Dieta high-fat (dieta rica em gordura)
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
ipRGCs	Células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina
LD	Ciclo de claro/escuro
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Ldlr	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LL	Iluminação constante
NaCl	Cloreto de Sódio

NASH	Esteatose hepática não-alcoólica
NEFA	Ácidos graxos não-esterificados
NPR-A	Receptores de peptídeos natriuréticos do tipo A
NPR-A	Receptores de peptídeos natriuréticos do tipo B
NPR-C	Receptores de peptídeos natriuréticos do tipo C
NPs	Peptídeos Natriuréticos
NSQ	Núcleo supraquiasmático
OPN4	Melanopsina
p38 MAPK	Proteínas cinases ativadas por mitogênio p38
<i>Per</i>	Period
PGC-1 α	Coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PIP2	Bifosfato de fosfatidilinositol
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLC β 4	Fosfolipase C β 4
PLC γ	Fosfolipase C γ
PPAR α	Receptores ativados por proliferador de peroxissomo alfa
PPAR β/δ	Receptores ativados por proliferador de peroxissomo beta/delta
RAAS	Eixo renina-angiotensina-aldosterona
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SNS	Sistema Nervoso Simpático
TGI	Triacilgliceróis
TRP	Canais de Potencial Receptor Transitório
UCP-1	Proteína desacopladora 1
UV	Radiação ultravioleta
WAT	Tecido adiposo branco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO TEÓRICA	19
2.1	MAQUINARIA DOS RELÓGIOS	19
2.2	RITMOS BIOLÓGICOS E MELANOPSINA (OPN4)	21
2.3	CANAIS TRP	23
2.4	MELANOPSINA E RITMO CIRCADIANO NO CORAÇÃO	24
2.5	A INFLUÊNCIA DE UMA DIETA RICA EM GORDURA NO RELÓGIO BIOLÓGICO	26
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVOS GERAIS	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	METODOLOGIA	35
4.1	EXPLANTES CARDÍACOS DE CAMUNDONGOS.....	35
4.1.1	Animais	35
4.1.2	Delineamento Experimental do Ensaio com Explantes Cardíacos de Camundongos.....	35
4.2	CULTURA PRIMÁRIA DE CARDIOMIÓCITOS.....	36
4.2.1	Animais	36
4.2.2	Cultura Primária de Cardiomiócitos	36
4.2.3	Soluções Utilizadas nos Ensaios	37
4.2.4	Desenho Experimental do Ensaio com Cultura de Células.....	38
4.2.5	Preparo das Placas	38
4.2.6	Delineamento Experimental	38
4.2.7	Efeito do meio hiperlipídico nos genes do relógio em cultura de cardiomiócitos	39
4.2.8	Preparação do Complexo BSA: Ácido Palmítico	39
4.3	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL, RT-PCR E QPCR	40

4.3.1	Extração do RNA	40
4.3.2	RT-PC	41
4.3.3	PCR quantitativo	42
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5	RESULTADOS	46
5.1	DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS GENES DO RELÓGIO, <i>BMAL1</i> E <i>PER1</i> EM EXPLANTES CARDÍACOS	46
5.2	DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS CANAIS <i>TRPV1</i> E <i>TRPA1</i> EM EXPLANTES CARDÍACOS	47
5.3	DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DAS OPSINAS, <i>OPN1</i> , <i>OPN2</i> , <i>OPN3</i> E <i>OPN4</i> , EM EXPLANTES CARDÍACOS	49
5.4	EFEITO DO MEIO HIPERLIPÍDICO NO NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS GENES DO RELÓGIO, <i>BMAL1</i> E <i>PER1</i> , EM CULTURA PRIMÁRIA DE CARDIOMIÓCITOS	51
6	DISCUSSÃO	54
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXOS	79
	ANEXO A: VALIDAÇÃO DA GENOTIPAGEM (GEL)	79
	ANEXO B: PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DO GENÓTIPO TRPV1 KO.	80
	ANEXO C: PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DA GENÓTIPO TRPA1 KO.	81
	ANEXO D: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	82

1 INTRODUÇÃO

O ciclo claro-escuro é caracterizado por uma fase com elevadas temperaturas e radiação UV, e outra fase com temperaturas amenas e baixa radiação. Os ritmos biológicos associados aos ciclos de claro-escuro definem o ciclo circadiano, assim como as variações de luminosidade e temperatura sincronizam os relógios biológicos internos, essenciais para a organização temporal, metabólica e fisiológica de diversos organismos (PITTENDRIGH, 1960; BASS e TAKAHASHI, 2010). O funcionamento do relógio biológico envolve mecanismos de retroalimentação de transcrição, tradução e modificações pós-traducionais, positivas e negativas (HONMA, 2018).

O relógio central encontra-se no núcleo supraquiasmático (NSQ) conectado à retina através do trato retino-hipotalâmico, enquanto os relógios periféricos estão distribuídos por todo o corpo, sendo ajustados pelo relógio central através de sinais neuro-hormonais e metabólicos (LEVI e SCHIBLER, 2007). A luz, uma importante pista ambiental, é percebida pelo NSQ através de um fotopigmento localizado nas células ganglionares retinianas, denominado melanopsina. Destaca-se o fato de que os osciladores periféricos, presentes na maioria das células dos tecidos de mamíferos, possuem um cerne gênico e proteico similar e interligado ao NSQ. Com isso, a fisiologia circadiana de muitos tecidos periféricos está envolvida com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) através da modulação de órgãos-alvo que se dá principalmente por glicocorticóides, assim como com o eixo hipotálamo-pineal-tecidos periféricos, através da sinalização do escuro dada pela melatonina, essencialmente secretada pela glândula pineal e controlada pelo NSQ (HARDELAND, 2009; LUCHETTI et al., 2010; HARDELAND et al., 2011).

É possível que a fisiologia cardiovascular apresente alterações combinadas em acoplamento estímulo-resposta ao longo do dia (REILLY, WESTGATE e FITZGERALD, 2007). De fato, a taxa de disparo do coração, pressão sanguínea, performance de contratilidade, oxidação de carboidratos e consumo de oxigênio apresentam variação com período próximo de 24 horas (BRAY e YOUNG, 2008). Diversos hormônios cardioprotetores, como hormônios peptídeos natriuréticos (NPs), aldosterona, renina e fatores de crescimento, apresentam padrões rítmicos ao longo do dia (LEMMER, 2017). Destaca-se o fato de que os peptídeos natriuréticos (NPs) possuem diversos elementos regulatórios localizados na região promotora do gene que codifica NPs, como a presença do E-box, o que sugere uma possível

participação do heterodímero CLOCK/BMAL1 em seu elemento responsivo (GARAMI; GARDNER, 1996).

Além disso, análises de *microarray* demonstraram que aproximadamente 10 a 15% do transcriptoma cardíaco de camundongos selvagens oscila ao longo do dia, dentre os quais alguns apresentam genes relacionados ao metabolismo do miocárdio, essenciais para a manutenção dos cardiomiócitos (STORCH et al., 2002; MARTINO et al., 2004). Uma vez que o metabolismo do miocárdio e a função contrátil estão intrinsecamente interligados, é de se esperar que eles apresentem um ritmo circadiano marcado, conforme observado por Durgan et al. (2007). Possivelmente, mecanismos intrínsecos ao miocárdio medeiam os ritmos circadianos do seu metabolismo. Acreditamos que atrelado a esse mecanismo, o coração possa orquestrar o metabolismo de outros órgãos/tecidos. Até o presente momento, existem poucas evidências sobre estes mecanismos.

2 REVISÃO TEÓRICA

2.1 MAQUINARIA DOS RELÓGIOS

A Terra apresenta um eixo de rotação marcada pelos ciclos de claro e escuro que delineiam o período de 24 horas em dois momentos: uma fase com elevadas temperaturas e radiação ultravioleta (UV) e outra fase com temperaturas mais amenas e baixa incidência de radiação UV. Segundo a teoria da “Fuga da Luz” de Pittendrigh (1993), temperaturas mais altas são encontradas durante a fotofase do dia e, portanto, temperatura e luz são entidades ambientais que exercem pressões seletivas simultâneas sobre os organismos. Visto que a luz e a temperatura são percebidas pelas mesmas proteínas, os fotorreceptores associados a osciladores endógenos provavelmente coevoluiram a partir desses dois sistemas frente àquelas pressões dos ciclos diários de luz e temperatura (MORAES et al., 2017).

Os sinais enviados do ambiente ao nosso organismo são chamados *zeitgebers* (“doador de tempo” em alemão). Diversos ritmos biológicos estão associados ao ciclo claro-escuro, sendo este ciclo de grande relevância para todos os seres vivos que possuem algum pigmento fotossensível (MARQUES et al., 2003). A luz, sendo um importante *zeitgeber* para o relógio circadiano, alcança os relógios periféricos através de várias rotas. Ela chega ao NSQ através do trato-retinohipotalâmico e arrasta o relógio central que, então, transmite a informação de tempo aos relógios periféricos ao longo das vias neuronais e/ou endócrinas. Todavia, existem rotas adicionais para a transmissão de informação fóptica nas quais é ignorado o relógio central e que, por sua vez, redefinem direta ou indiretamente os relógios periféricos (HUSSE; EICHELE; OSTER, 2015).

O relógio biológico em mamíferos é conceituado como um sistema hierárquico no qual um relógio central, localizado no NSQ, atua como um marcapasso principal para sincronizar ou arrastar os pulsos periféricos distribuídos por todo o corpo (TAKAHASHI, 2017). Todavia, esse sistema circadiano não consiste apenas no marcapasso, NSQ, mas também em uma complexa rede rítmica dentro do sistema nervoso central (SNC) e em incontáveis osciladores periféricos que expressam ritmicamente os genes do relógio (HARDELAND et al., 2011). Logo, é de suma importância entender o cerne molecular dos relógios.

A maquinaria molecular do relógio biológico é composta por circuitos de retroalimentação transcricional, traducional e modificações pós-traducionais (Figura 1). O laço central é composto de elementos positivos (*CLOCK* e *BMALI*) e elementos negativos

(*PERs* e *CRYs*). No núcleo celular, os fatores de transcrição *CLOCK* e *BMAL1* ativam a expressão dos genes *Per1/2/3* e *Cry1/2* ao longo do dia. Os genes *Per* e *Cry* migram para o citoplasma, onde são traduzidos nas proteínas *PER* e *CRY*, respectivamente, e se acumulam para formarem os dímeros *PER/CRY*. Em direção à noite, retornam para o núcleo, inibindo a transcrição mediada por *CLOCK/BMAL1*. Acompanhada de modificações nas caudas de histonas ao redor dos locais de ligação do DNA de *CLOCK/BMAL1*, a ligação *PER/CRY* leva a uma dissociação do complexo de transcrição e suprime a transcrição de *Per* e *Cry* (HONMA, 2018; HUSSE; EICHELE; OSTER, 2015; BROWN; AZZI, 2013). Em paralelo, no citoplasma da célula, ocorre o processo de ubiquitinação, responsável por clivar os complexos *PER/CRY*. A degradação gradual dos complexos *PER/CRY*, até o final da noite, libera o dímero *CLOCK/BMAL1* da supressão de *PER/CRY*, reiniciando o ciclo do relógio pela indução da transcrição *Per* e *Cry* (TAKARASHI, 2017).

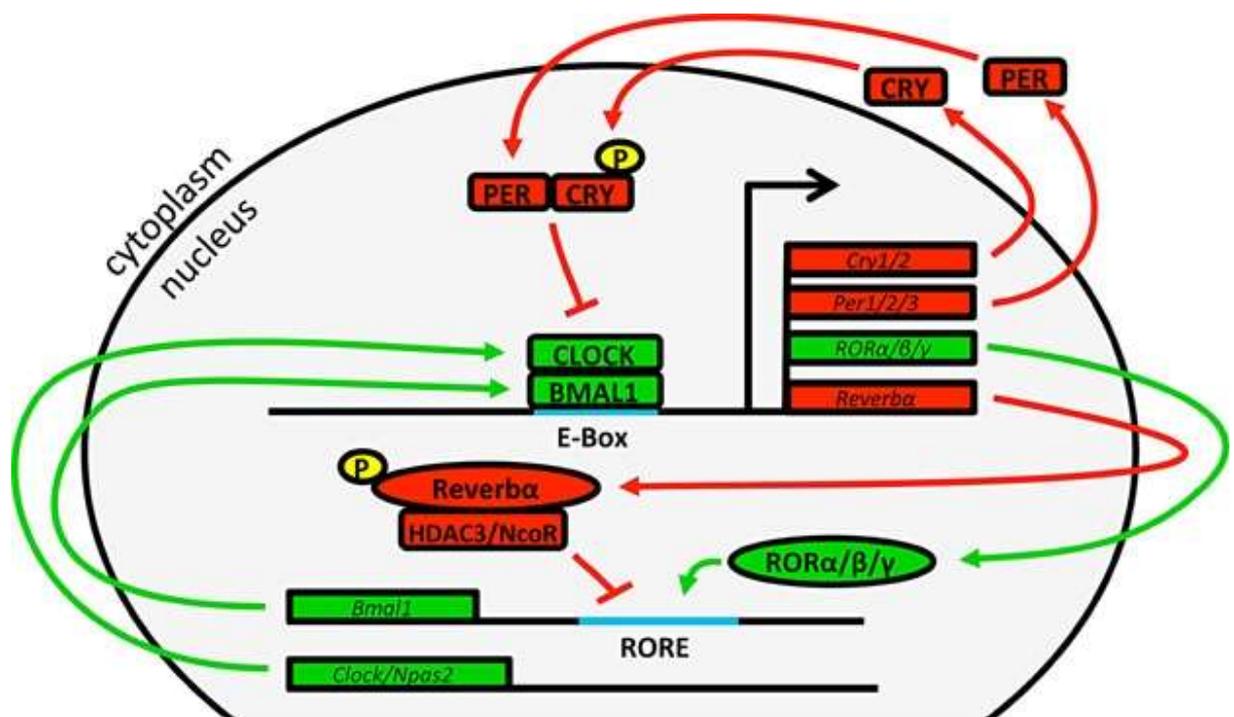


Figura 1 - Maquinaria molecular de relógio biológico em mamíferos. A nível molecular, o relógio biológico de mamíferos é constituído de loops de feedback transcricional. O principal loop envolve os fatores de transcrição *CLOCK* e *BMAL1*, que formam um complexo e regulam a transcrição de outros genes do relógio, *Per* e *Cry*. Outro loop consiste dos genes *Rev-erba/β* e *Rora/γ*, que controlam a expressão de *Bmal1*, atuando como repressores e ativadores transcricionais, respectivamente. (Adaptado de West; Bechtold, 2015).

O dímero *CLOCK/BMAL1* também ativa uma alça secundária do cerne do relógio, da qual fazem parte os genes *Rev-erb α/β* e *ROR α/β* , cujos transcritos atuam de forma antagônica competitiva sobre o elemento *RORE*, estimulando ou inibindo a transcrição de *Bmal1*, respectivamente (WEST; BECHTOLD, 2015).

Um número de loops de feedback auxiliares, bem como mecanismos pós-translacionais, sintoniza e estabiliza a oscilação da maquinaria molecular. Além de criar um mecanismo de relógio autossustentável, as proteínas do relógio central também controlam a transcrição de muitos genes controlados pelo relógio (CCGs) específicos do tecido (HONMA, 2018). O mecanismo do relógio circadiano de mamíferos é autônomo e está distribuído por todo o corpo regulando as funções rítmicas do tecido. Os principais reguladores transcricionais controlam os ritmos de expressão gênica em milhares de genes. Por exemplo, o complexo *CLOCK/BMAL1* do fígado tem como alvos vias metabólicas fundamentais, indicando assim que o sistema de relógio está intimamente embutido no metabolismo celular (TAKAHASHI, 2017).

É importante salientar que o ritmo do NSQ é reforçado em todo o corpo através de ritmos complementares e da liberação de hormônios (como a melatonina e os glicocorticóides) (WEST; BECHTOLD, 2015). A melatonina, por exemplo, possui múltiplos papéis no sistema oscilatório circadiano, influenciando tanto as fases do marcapasso quanto dos osciladores periféricos através da modulação, tanto positiva quanto negativa, na expressão de alguns genes do relógio (HARDELAND, 2011). Outros sinais transmitidos pelo sangue, ou até mesmo ciclos de temperatura corporal, poderiam sozinhos ou em combinação sustentar a sincronização de múltiplos relógios periféricos (HUSSE; EICHELE; OSTER, 2015).

A consolidação adicional virá do cérebro ou dos relógios de tecidos periféricos, cuja atividade é arrastada pelo NSQ, assim como a propagação do ritmo que influencia a fisiologia rítmica ou produção rítmica de fatores secretados que podem, por sua vez, retroalimentar e influenciar a fase ou amplitude do mecanismo do relógio. Logo, quando corretamente alinhado, o sistema circadiano existe em um estado de ressonância pelo qual os relógios internos são constantemente reforçados pelo nosso ambiente e comportamento (WEST; BECHTOLD, 2015).

2.2 RITMOS BIOLÓGICOS E MELANOPSINA (OPN4)

Todo evento biológico que se repete periodicamente no tempo é denominado ritmo biológico. O período de 24hs de atividade/repouso em consonância com os ciclos ambientais diários, como o ciclo claro/escuro, indica que o organismo responde, diretamente, aos estímulos cíclicos ambientais. Sabe-se que esses ritmos diários são endógenos, uma vez que mesmo na ausência de pistas ambientais existe ritmicidade, indicando a presença de osciladores circadianos associados a um sistema de temporização circadiana (Figura 2) (TOMOTANI; A ODA, 2012).

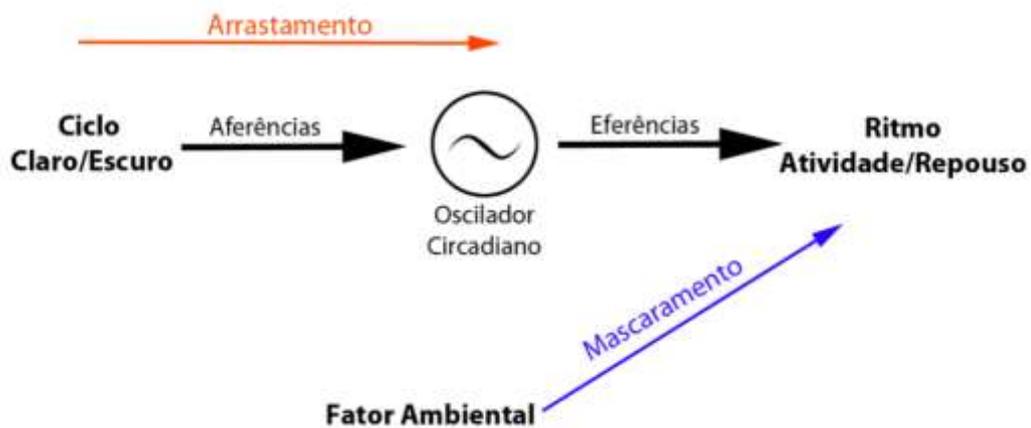


Figura 2 – Esquema do sistema de temporização circadiana endógena. (Que controla o ritmo de atividade/repouso.) (TOMOTANI; A ODA, 2012)

Existe um marcapasso central que, provavelmente, seria responsável por controlar uma série de mecanismos fisiológicos, como a síntese de hormônios e outras variáveis fisiológicas. A luz é um estímulo ambiental que ativa um subgrupo de células localizadas na retina, células essas denominadas células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina (ipRGC), sensíveis à luz azul e que se projetam, morfológicamente, para o núcleo supraquiasmático, o marcapasso central (BERSON, 2002; HUGHES et al., 2016; PROVENCIO et al, 2002). A membrana das células ganglionares expressa um fotopigmento denominado melanopsina (OPN4), uma opsina baseada em retinaldeído (BERSON, 2002) que contribui para uma série de respostas não formadoras de imagens frente à estímulos luminosos, como o arrastamento circadiano, resposta à luz pupilar, mascaramento negativo da atividade locomotora, regulação dos estados de sono-vigília, fotofobia e aversão à luz (HUGHES et al., 2016). Consiste em uma proteína ligada covalentemente ao cromóforo 11-cis-retinaldeído, que quando estimulado pela luz, o cromóforo é isomerizado em all-trans-

retinaldeído, levando a uma mudança conformacional da melanopsina, que por sua vez desencadeia uma cascata de fototransdução (WONG, 2009).

A melanopsina apresenta fototransdução intrínseca, assumindo o papel de fotorreceptores primários que sincronizam o relógio biológico com o ambiente externo (KUMBALASIRI *et al.*, 2007). Logo, acredita-se que ela seja o fotopigmento responsável pela sensibilidade intrínseca dessas células à luz.

O mecanismo de fototransdução da OPN4 expresso nas ipRGC é conhecido por ser marcadamente distinto aos fotorreceptores cones e bastonetes (HUGHES *et al.*, 2016). Inicialmente, na região em que se localiza a melanopsina, há a sua fotoativação, responsável por desencadear uma cascata de sinalização dependente de proteína G tipo Gq/11. A fosfolipase C (PLC β 4) é ativada, proporcionando a abertura dos canais TRPC6/7 (canal de potencial receptor transitório) e, por conseguinte, o aumento nos níveis de cálcio intracelular, seguido da despolarização da membrana. Os axônios das ipRGCs, então, liberam o glutamato para o NSQ, o marcapasso central, que irá orquestrar os osciladores circadianos do organismo. (ISOLDI *et al.*, 2005; HUGHES *et al.*, 2016; MORAES *et al.*, 2017).

2.3 CANAIS TRP

Existe uma superfamília de canais catiônicos dependentes de voltagem, denominados canais TRP, constituídos de arquitetura tetrâmera e sendo cada unidade constituída por seis alças transmembrânicas. Os canais TRP são agrupados, por homologia, em sete famílias, TRPC (canônica), TRPM (melastatina), TRPV (ligação vanilóide), TRPA (repetição de ankirina), TRPP (policistina), TRPML (mucopolipina) e TRPN (potencial mecanorreceptor C) (RAMSEY *et al.*, 2006). Alguns são permeáveis ao Ca²⁺, com exceção de TRPM4 e TRPM5 que são permeáveis apenas a cátions monovalentes (LIAO *et al.*, 2013). Sua ativação ocorre mediante vários mecanismos, sendo envolvidos em uma série de processos sensoriais, tais como sensação térmica, mecanosensação, quimiosensação, nocicepção e percepção de luz, desencadeando o influxo de cálcio que resulta na despolarização da célula. Diversos canais TRP foram identificados como sensores térmicos, os quais exibem diferentes faixas dinâmicas para o seu perfil de ativação por temperatura (PERTUSA *et al.*, 2012), sendo os canais TRPV1-4, TRPM2, TRPM4 e TRPM5 ativados por calor, enquanto TRPM8, TRPA1 e TRPC5 são ativados por frio (PERTUSA *et al.*, 2012; FOWLER & MONTELL, 2013). Uma das características intrínsecas aos canais TRP é o cooperativismo que exercem e que pode aparecer nos chamados acoplamentos alostéricos mediante diversos estímulos de ativação.

Um bom exemplo da natureza alostérica seria o dos canais termo-TRPs (PERTUSA et al., 2012).

Em geral, diversos sítios de interação regulatória de fosforilação de proteína quinase A (PKA) e C (PKC), assim como domínios de reconhecimento de fosfatidil inosítido 3-quinase SH2 estão envolvidos na via de sinalização dos canais TRPs. São regulados pelas vias de PLC- β e PLC- γ , ativação por diacilglicerol (DAG), ácido araquidônico, bisfosfato de fosfatidil inositol (PIP₂), depleção de estoques de Ca²⁺ do retículo e tensão de cisalhamento (BEVAN et al., 2014).

2.4 MELANOPSINA E RITMO CIRCADIANO NO CORAÇÃO

As opsinas são proteínas compostas por sete domínios transmembrânicas especializadas na percepção da luz. Estes receptores estão acoplados à proteína G associadas com um cromóforo derivado da vitamina A, que as tornam capazes de transduzir a luz. São classificadas com base na natureza da proteína G: opsinas visuais de vertebrados, OPN1 e OPN2 (proteína Gt); OPN3 (encefalopsinas)/teleostina (proteína Gi/Go); melanopsina/OPN4 (proteína Gq); Opsinas de invertebrados (proteína Go); neuropsinas/OPN5 (proteína Li); opsinas cnidária (proteína Gs); peropsinas; fotoisomerases da retina (POLETINI et al., 2015). Entre as opsinas não visuais, a mais estudada é a melanopsina, clonada a partir da rã africano *Xenopus laevis*, na qual medeia a dispersão de grânulos de melanina induzida pela luz (ISOLDI et al., 2005). A melanopsina é expressa em apenas 2% das ipRGCs e está envolvida na redefinição do NSQ de mamíferos pela luz azul (em torno de 480nm) (BERSON, 2002).

Muitas outras opsinas tem sido descrita em vertebrados. A encefalopsina (OPN3) com comprimento de onda de excitação máxima de 460nm (KOYANAGI et al., 2013), possui uma ampla distribuição em vertebrados, sendo encontrada na retina e em outros órgãos (BLACKSHAW; SNYDER, 1999).

Estudos demonstram que a OPN4 atua não apenas como um fotorreceptor, mas também como um sinalizador de temperatura e de radiação ultravioleta A em mamíferos (PÉREZ-CEREZALES et al., 2015; DE ASSIS et al., 2017). Ademais temos que o coração é um órgão não-visual com maior expressão da melanopsina e alguns membros da família TRP envolvidos com a sinalização da melanopsina, tais como: TRPC1, C3-7, TRPV2-V4, TRPM4, M5, M7 e TRPP2/1 (DIAZ et al., 2015; HUGHES et al., 2016; RANDALL et al., 2015; YUE et al., 2015).

Além disso, este órgão possivelmente atua monitorando a temperatura do sangue que a ele chega, a fim de ajustar seu próprio metabolismo e de outros órgãos e tecidos. Sabe-se que a temperatura exerce forte influência na expressão de receptores de NPs, mecanismo chave no metabolismo de lipídios em tecidos de reserva como o adiposo branco e o marrom (BORDICCHIA *et al.*, 2012). Esse seria apenas um exemplo do que provavelmente estaria acontecendo em outros órgãos/tecidos.

Dentre diversas funções, a atividade do sistema nervoso autônomo sofre influência do ciclo claro-escuro, o qual modula de forma rítmica diversos parâmetros vasculares (GUO & STEIN, 2003). Além disso, a comparação de oscilações dependentes do dia no transcriptoma entre cardiomiócitos de animais nocautes ou mutantes em relação a selvagens revela que até 8% do transcriptoma cardíaco é regulado pelos osciladores circadianos de cardiomiócitos; a nível transcricional, o coração de nocautes ou mutantes para o relógio apresenta atenuação temporal no início da fase de luz. Além disso o relógio local regula diversos processos metabólicos, tais como transcrição, turnover de proteínas, cascata de sinalização, homeostase de íons e os níveis no metabolismo de carboidratos e lipídeos (MARTIN, 2016; BRAY *et al.*, 2008; YOUNG *et al.*, 2014). Tem-se como exemplo o ritmo do metabolismo lipídico no coração que varia diuturnamente, uma vez que os ácidos graxos (AGs) são a principal fonte de combustível para os cardiomiócitos (LOPASCHUK *et al.*, 1994). Além disso, a síntese de triacilgliceróis (TGI), a lipólise e a expressão de genes envolvidos na oxidação de AGs exibem variações diárias no coração de camundongos selvagens, estando atenuados em mutantes *Clock* específicos (BRAY e YOUNG, 2008; TSAI *et al.*, 2010).

A indução de genes responsivos a AGs deve-se, pelo menos em parte, à ligação direta de AGs ao PPAR α e/ou PPAR β/δ , resultando na ativação desses receptores nucleares, que regulam a expressão de uma ampla variedade de genes envolvidos com o controle do metabolismo de gordura e glicose, tanto no coração como no tecido adiposo (NEDEGAARD *et al.*, 2005; BARGUT *et al.*, 2016; CHENG *et al.*, 2004; RIEHLE e ABEL 2012; PENNA-DE-CARVALHO *et al.*, 2014; RACHID *et al.*, 2015; ABUSHOUK *et al.*, 2017). Além disso, PPAR α e PPAR γ são reguladores diretos de *Bmal1* e *Rev-erba* em tecidos metabólicos (CHEN & YANG, 2014).

O relógio biológico do músculo esquelético e cardíaco permite que os miócitos antecipem variações diurnas na circulação de ácidos graxos através da capacidade oxidativa de ácidos graxos a um nível transcricional (DURGAN *et al.*, 2006). Somado a isso, Durgan e colaboradores (2007), observaram que o metabolismo do coração e sua função contrátil apresentam um ritmo circadiano intrinsecamente marcado. O conteúdo de glicogênio do

miocárdio de ratos exibe um ritmo circadiano significativo, espelhando os ciclos de alimentação/jejum até certo ponto, aumentando durante a fase de sono/alimentação/escuro e diminuindo durante a fase de sono/jejum/luz (DURGAN *et al.*, 2007). Sabe-se ainda que tanto nos tecidos cardiovasculares como nos metabólicos, a ingestão alimentar é um *zeitgeber* que afeta a expressão cíclica dos genes do relógio (WU *et al.*, 2008). Portanto, o metabolismo energético é um importante modulador da função do relógio nesses tecidos.

2.5 A INFLUÊNCIA DE UMA DIETA RICA EM GORDURA NO RELÓGIO BIOLÓGICO

Os genes do relógio desempenham papéis importantes na regulação não apenas dos ritmos circadianos, mas também na homeostase energética e do metabolismo (YANG; SHIEH, 2009), visto que a cronorruptura do relógio está associada a desordens metabólicas, tais como a obesidade e a síndrome metabólica (TUREK, 2005). Já foi visto na literatura que mutações ou nocautes em alguns genes do relógio, como o caso do *Clock*, e genes controlados pelo relógio (CCG) estão associados com o desenvolvimento de desordens metabólicas, como hiperlipidemia, hiperleptinemia e hiperfagia (KUDO *et al.*, 2007; TUREK, 2005; YANG; SHIEH, 2009).

Alguns estudos *in vivo* têm analisado a relação de genes do relógio e o desenvolvimento de desordens metabólicas, tais como alterações nas concentrações séricas dos lipídios plasmáticos e, por sua vez, a progressão de processos ateroscleróticos, mediante uma alimentação rica em gordura.

A sincronização do relógio biológico dos processos comportamentais e fisiológicos está principalmente ligada aos ciclos LD, levando o organismo a antecipar uma necessidade que ocorrerá a seguir. Do ponto de vista energético, o relógio biológico, ao imprimir um ritmo circadiano, orchestra a troca diária entre períodos de alimentação e jejum, o que determina o uso ou armazenamento de substratos energéticos (PEEK *et al.*, 2012). Por outro lado, não se deve esquecer que a alimentação em si é um sinal importante para o ajuste dos relógios central e periférico. Desde que o rompimento da rede circadiana influencia o metabolismo, também foi demonstrado que a relação recíproca existe, pois o comportamento alimentar e o metabolismo alterados afetam o relógio. Kohsaka e colaboradores (2007) demonstraram que camundongos alimentados com uma *dieta high-fat* (HFD) apresentaram alterações no período de atividade locomotora quando comparados aos camundongos controle. Também foi observado que não apenas a expressão dos genes do relógio foi afetada, mas também os genes controlados pelo relógio envolvidos no uso de energia no hipotálamo, fígado e tecido adiposo.

Portanto, o ganho ou perda de peso corporal, analisado até então como um simples equilíbrio entre ingestão calórica e gasto energético, acabou ganhando um componente novo e, provavelmente, vital: o relógio biológico. Assim, os estudos começaram a reunir dados demonstrando que não apenas a quantidade de nutrientes ingerida ou utilizada, mas também o tempo de ingestão se tornou de importância decisiva no ganho de peso (ARBLE et al., 2009). Os autores relataram que um ganho de peso maior foi alcançado quando camundongos noturnos submetidos a um ciclo LD 12:12 foram alimentados com HFD na fotofase desse ciclo, em comparação com aqueles alimentados na fase escura. Uma variação interessante encontrada em um estudo que associou a influência de uma dieta rica em gordura com uma dieta rica em açúcar (KLOTING et al., 2013). Os autores observaram que ratos Wistar submetidos ao ciclo LD 12:12 alimentados com dietas ricas em gordura e açúcar apresentaram maior ganho de peso corporal, e níveis mais altos de triacilgliceróis, colesterol e leptina sérica em comparação com animais com dieta semelhante, mas com um avanço de fase de 6 horas (as luzes estavam acesas 6 horas após o grupo de controle). Foi, então, demonstrado que não apenas a dieta, mas também a fase do relógio afeta os parâmetros fisiológicos ligados ao metabolismo.

Na mesma linha, Mendoza e colaboradores (2008) obtiveram aumento do índice de massa corporal, maior glicemia, hiperleptinemia e aumento de insulina em camundongos machos C57BL/6J tratados por 3 meses com uma HFD, em comparação aos animais controle. Testes de sincronização fótica, que mediram a atividade de corrida e os ritmos de temperatura corporal (marcadores de fase diários), revelaram que os animais alimentados com HFD tiveram um ajuste inadequado da hora do dia. Quando esses animais foram submetidos ao teste *jet-lag* (ciclo avançado de 6 horas), as alterações incluíram uma taxa mais lenta de arrastamento dos ritmos locomotores e da temperatura corporal, e respostas reduzidas à fase leve, conforme descrito abaixo. Alterações de fase induzidas pela luz no núcleo supraquiasmático causaram aumento da expressão de *c-fos* e aumento da fosforilação de *erk*. Nos animais submetidos à HFD, houve menor expressão de *c-fos* e menor fosforilação de *erk* em resposta à luz quando comparado ao controle. Simplificando, podemos concluir que o HFD altera a sincronização circadiana pela luz.

Para testar a ideia de "pular o café da manhã" e suas consequências para o metabolismo lipídico, Shimizu e colaboradores (2018) criaram um protocolo no qual os camundongos eram alimentados com uma HFD durante o ZT12/24 (grupo controle) e outro grupo no ZT16/4 (Grupo DFAM - aqueles que estariam pulando o café da manhã). Os animais do grupo DFAM apresentaram ganho de peso corporal e aumento do peso do tecido

adiposo, sem alterações na ingestão total de alimentos. Os picos na oscilação circadiana dos genes do relógio do fígado e de genes relacionados a síntese de ácidos graxos foram atrasados em 2-4 horas devido ao DFAM. Além disso, insulina sérica, ácidos graxos não esterificados e ácidos biliares, bem como a temperatura corporal tiveram picos atrasados em 4-6 horas no grupo DFMA. Resumidamente, o “pular o café da manhã” levou ao metabolismo lipídico anormal, oscilação circadiana alterada dos genes do fígado e genes relacionados ao metabolismo lipídico. Portanto, anormalidades metabólicas e obesidade causadas pelo salto do café da manhã em humanos seriam mediadas por alterações nos ritmos circadianos dos tecidos periféricos, como o fígado (DASHTI et al., 2019).

Foi encontrada uma relação direta entre o desequilíbrio alimentar (neste caso promovido pelo HFD) e a ritmicidade do ciclo circadiano. Curiosamente, a manipulação de genes específicos do relógio leva a uma variedade de disfunções específicas.

Shimba e colaboradores (2011) descobriram que camundongos deficientes para o gene *Bmall* (*Bmall*^{-/-}) alimentado com uma HFD tinham uma baixa capacidade de armazenamento de gordura no tecido adiposo, o que resultou em níveis aumentados de ácidos graxos circulantes, em comparação com os camundongos selvagens. Esses altos níveis de ácidos graxos circulantes foram um fator decisivo para o acúmulo e a formação de gordura ectópica no fígado e no músculo esquelético desses camundongos. Segundo outros autores (HEMMERYCKX et al., 2011), os camundongos *Bmall*^{-/-} alimentados por 15 semanas com uma HFD tiveram um aumento inicial acelerado no peso e na massa gorda quando comparados aos controles do tipo selvagem (WT). No entanto, no final do ensaio, ambos os grupos apresentaram o mesmo aumento na massa corporal. Por esse motivo, os camundongos *Bmall*^{-/-} têm um fenótipo com menos gordura quando comparados aos camundongos deficientes em *Clock* (TUREK et al., 2005; SHIMBA et al., 2011).

O conjunto de dados levou os pesquisadores a concluir que o *Bmall* está ligado à homeostase energética, e os fatores que levam à sua disfunção podem estar relacionados ao desenvolvimento da síndrome metabólica (SHIMBA et al., 2011; MILAGRO et al., 2012).

Os camundongos mutantes para o gene *Clock* mostraram atenuação da atividade quando comparados ao WT, mas, curiosamente, também estavam ativos na fase leve. No entanto, os dados mais relevantes foram em relação à ingestão de alimentos: os camundongos WT se alimentaram basicamente na fase escura, enquanto os mutantes para o gene *Clock* se alimentaram de maneira uniforme nas duas fases (TUREK et al., 2005).

Quando camundongos WT ou mutantes para o gene *Clock* foram alimentados com uma dieta regular por 10 semanas, o ganho de peso corporal foi de 24% e 29%,

respectivamente. Quando esses grupos foram alimentados com uma HFD, o ganho de peso foi de 38% para camundongos do tipo selvagem e 49% para camundongos com mutação do *Clock*. É notável que os mutantes para *Clock* alimentados com uma dieta regular tiveram 65% de ganho de massa magra e 35% de ganho de massa gorda, enquanto com o HFD, o ganho de peso total foi representado por 25% de massa magra e 75% de gordura em comparação com os ratos WT (TUREK et al., 2005).

Outras consequências do *Clock* nulo foram hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperglicemia e hipoinsulinemia entre o sexto e o sétimo mês de idade. Além disso, os níveis séricos de leptina foram aumentados durante a fase leve em mutantes alimentados com a dieta padrão, enquanto os camundongos alimentados com HFD tiveram um aumento ainda maior na leptina sérica na mesma fase em comparação aos animais WT (TUREK et al., 2005).

Outra descoberta importante foi que os mRNAs da grelina e da orexina eram baixos no hipotálamo mediobasal de camundongos com mutação do relógio em comparação aos camundongos WT. A análise do núcleo supraquiasmático e do transcriptoma hepático revelou alterações nas vias metabólicas, incluindo enzimas da via glicolítica, fosforilação oxidativa mitocondrial e metabolismo lipídico, em camundongos com mutações no gene *Clock* (MENDOZA et al., 2008). O conjunto de dados analisados nesses animais nos permite dizer que alterações no relógio circadiano, precisamente no gene *Clock*, podem levar a alterações comportamentais fenotípicas e alterações no metabolismo celular (TUREK et al., 2005).

Quando camundongos deficientes em *Cry* foram tratados com uma HFD, não foram observadas alterações fenotípicas em animais deficientes em *Cry2*. Diferentemente, os camundongos knockout *Cry1* mostraram, quando tratados com HFD, menos ganho de peso e menor reserva de gordura quando comparados ao grupo WT. Também foi relatado um baixo teor de gordura sem alteração no teor de proteínas. Além disso, a glicose sérica e os perfis lipídicos não mostraram diferença quando comparados aos camundongos WT, no final do tratamento com HFD (GRIEBEL et al., 2014). Uma possível explicação para esse achado seria o aumento da atividade do sistema nervoso simpático, principalmente durante a fase leve do ciclo, exibida pelos camundongos deficientes em *Cry1* e/ou *Cry2*. Isso levaria à ativação do tecido adiposo marrom e ao hipermetabolismo (IKEDA et al., 2007), o que poderia justificar a resistência ao ganho de peso observada em camundongos *Cry1*^{-/-} submetidos à HFD.

Por interrupção está diretamente envolvido no ganho de massa corporal em camundongos machos *Per*^{1/2/3tm1Drw} alimentados com HFD. No entanto, quando a deleção

ocorreu apenas em *Per3*, os animais expressaram um início tardio do fenótipo da obesidade (DALLMANN et al., 2010).

Estudos com camundongos deficientes para os genes *Per1* ou *Per2* demonstraram uma redução no peso corporal e uma diminuição nos níveis séricos de triacilgliceróis e ácidos graxos livres quando comparados aos animais WT (DALLMANN et al., 2010; DALLMANN et al., 2006). Esses efeitos podem ser explicados pela ação de repressão exercida pelo *Per2* no PPAR γ . Em camundongos *Per2*^{-/-} (deficientes em *Per2*) alimentados com uma dieta padrão, onde a repressão foi eliminada devido à ausência de *Per2*, ocorreram mudanças significativas na adiposidade e no metabolismo lipídico (GRIMALDI et al., 2010). O PPAR γ é responsável pela regulação do desenvolvimento do tecido adiposo, diferenciando as células-tronco mesenquimais em adipócitos, um processo conhecido como adipogênese (EVANS et al., 2004). Portanto, o *Per2* controla a atividade pré-patogênica do PPAR γ , operando como seu modulador natural (GRIMALDI et al., 2010).

O gene *Ldlr* codifica a formação de uma proteína chamada receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr) que se liga a lipoproteínas de baixa densidade (LDLs), os principais transportadores de colesterol. Akashi e colaboradores (2017) observaram que, após uma HFD, camundongos com uma deleção do gene *Ldlr*^{-/-} desenvolveram aterosclerose, com formação de placa de ateroma em 16 semanas. Entretanto, ao analisar camundongos com deleção nos genes *Per2* e *Ldlr*, foi observada adiposidade quando comparada ao grupo *Ldlr*^{-/-}.

Ainda não foi relatada uma ligação entre a transcrição de proteínas relevantes relacionadas ao controle do metabolismo lipídico e os genes *Cry1-2*. Suas funções parecem mais relevantes para a gliconeogênese hepática. A gliconeogênese hepática é regulada pelo glucagon e pela epinefrina (GRIEBEL et al., 2014), assim como o gene *Cry* também exerce essa função inibindo a fosforilação do CREB mediada por cAMP (HIROTA et al., 2012; LAMIA et al., 2011). Isto foi encontrado em dois ensaios importantes. Em um deles, camundongos KO duplos para os genes *Cry1* e *Cry2* aumentaram a atividade do CREB. Como resultado, os níveis de mRNA hepático para genes envolvidos na gliconeogênese foram mais altos em camundongos com expressão derrubada de *Cry1* e *Cry2* em comparação aos controles. Por outro lado, quando o *Cry* foi superexpresso em camundongos da linhagem *db/db*, conhecidos como bons modelos para obesidade e diabetes, houve uma diminuição na produção de glicose (ZHANG et al., 2010).

Um fato ainda pouco explorado, mas que está ganhando importância, é a interação dos componentes do relógio com outros genes fora do mecanismo do relógio. Acredita-se que a mutação do gene *Clock* leve à superexpressão de *Bmal1* ou à sua substituição pelo gene

Npas2, um gene que promove a adipogênese. O complexo BMAL1/CLOCK possivelmente desempenha um papel importante na expressão gênica envolvida na regulação do metabolismo lipídico (TUREK et al., 2005; SHIMBA et al., 2011). Camundongos com uma mutação no gene *Clock* e uma exclusão no gene *ApoE* foram alimentados com diferentes dietas para um estudo de aterosclerose. O gene *ApoE* produz uma proteína chamada apolipoproteína E que combina com lipídios para formar moléculas de lipoproteína, podendo se ligar ao colesterol e, assim, transportá-lo na corrente sanguínea. Esses animais desenvolveram hipercolesterolemia devido ao acúmulo de lipoproteínas contendo ApoB48, ricos em éster de colesterol, e ao aumento da absorção de colesterol pelo intestino (PAN; JIANG e HUSSAIN, 2013).

Camundongos C57BL/6J fêmeas, sem mutação ou exclusão genética, quando alimentados com um HFD por oito semanas desenvolveram obesidade, hiperglicemia e hiperlipidemia, levando a uma síndrome metabólica (YANAGIHARA et al., 2006). No entanto, os ritmos do relógio do fígado e do tecido adiposo não foram afetados pela dieta. No mesmo estudo, a expressão do gene *Cyp7a1*, membro da superfamília da enzima citocromo p450, mostrou uma diminuição de sua ritmicidade, que foi regulada pelo gene *Dbp*, relacionada às enzimas envolvidas no metabolismo hepático, que por sua vez demonstraram uma clara ritmicidade de 24 horas (YANAGIHARA et al., 2006). Esses achados corroboram com os estudos de Ando e colaboradores (2009), que relataram que camundongos machos C57BL/6J submetidos a uma dieta aterogênica por 5 semanas também não apresentaram alterações na expressão dos genes do relógio. No entanto, quanto à expressão de genes ligados à produção de energia mitocondrial, regulação redox e metabolismo de carboidratos e lipídios, sua expressão foi reduzida pela dieta aterogênica. A explicação dada pelos autores foi que a proteção do relógio ocorreu possivelmente devido à alteração compensada na expressão de genes envolvidos na degradação de proteínas. A soma desses dados abre outras possibilidades. Embora o relógio biológico não tenha mudado durante o tempo em que o animal foi tratado com um HFD, a expressão cíclica de genes relacionados ao relógio biológico mudou. Provavelmente, essas mudanças podem, posteriormente, alterar o relógio biológico, fato não observado pelo curto período em que os animais foram acompanhados.

Hsieh e colaboradores (2010) propuseram que uma HFD a longo prazo causa maiores alterações na expressão gênica em comparação com a mesma dieta por um período mais curto, demonstrando que as modificações dependem do tempo. Ainda sobre o assunto, outro grupo (YAMAJUKU et al., 2009), ao examinar as funções fisiológicas do relógio do fígado usando um esquema alimentar, ratos Wistar alimentados a cada 6 horas por 18 dias em uma

dieta rica em colesterol, descobriu que a ritmicidade de vários genes do relógio foi interrompido. Os autores também observaram que a expressão do gene *CyP7a1* foi alterada. Entre as conclusões, os autores (YAMAJUKU et al., 2009) apontaram para a importância não apenas da duração da exposição alimentar, mas também da frequência da ingestão alimentar ao longo do dia, essencial para induzir mudanças no relógio biológico. Uma HFD a longo prazo alterou a expressão de genes do relógio, como *Per1* e *Bmal1*, no fígado, embora o gene *Clock* não tenha mostrado nenhuma alteração. Um modelo animal de hipercolesterolemia familiar (camundongos *Ldlr*^{-/-}) apresentou anormalidades circadianas. Ao executar experimentos comportamentais em escuridão constante, os pesquisadores (AKASHI et al., 2017) observaram uma fase ativa estendida e ritmos distintamente bimodais. No mesmo estudo, observou-se que camundongos *Ldlr*^{-/-} *Per2*^{m/m} (deficientes em *Ldlr* com uma mutação no gene *Per2*) mostraram um aumento significativo na área da placa arterial com um aumento nos níveis de citocinas inflamatórias IL-6 (AKASHI et al., 2017) Portanto, esses resultados sugerem que a disfunção circadiana pode estar associada ao desenvolvimento ou progressão de doenças cardiovasculares.

Em alguns casos, observou-se que o ritmo poderia apresentar variações específicas mesmo quando o animal foi submetido a uma dieta por um curto período. O consumo de HFD a curto prazo (2 semanas) diminuiu a expressão do gene *Bmal1* no ceco e no fígado. O HFD alterou a expressão de 7 genes, 4 dos quais envolvidos na regulação do relógio biológico desses órgãos (LIZIER et al., 2013). Portanto, uma dieta a curto prazo também pode causar alterações na expressão dos genes do relógio e comprometer os processos metabólicos.

Somado a isso, a composição da dieta, assim como o protocolo de administração, pode ter um forte impacto no metabolismo, no relógio biológico e em suas inter-relações. Fuse e colaboradores (2012) submeteram camundongos C57BL/6J a um café da manhã rico em gordura - imitando uma única refeição, e um segundo grupo recebeu duas refeições com alto teor de gordura que imitavam o café da manhã e o jantar. Os autores observaram que o primeiro grupo apresentava uma síndrome metabólica mais grave quando comparado ao segundo grupo. No mesmo desenho experimental, foi observado um ritmo padrão para *Per2* e *Bmal1* em ambos os grupos. Da mesma forma, ratos Wistar submetidos a um protocolo tardio da dieta da manhã mostraram alterações no metabolismo lipídico, oscilações dos genes do relógio hepático e genes envolvidos na síntese de ácidos graxos em comparação aos animais que receberam uma dieta rica em gordura no ZT12-24 (SHIMIZU et al., 2018). No estudo de Eckel-Mahan e colaboradores (2013), um tratamento com camundongos HFD por dez semanas causou uma reprogramação do relógio hepático como resultado da perda de

oscilação de genes normalmente oscilantes. Entre os efeitos marcantes da HFD estão os efeitos pleiotrópicos que levam à reprogramação de várias vias metabólicas e transcricionais.

De fato, uma dieta rica em gordura apresenta forte correlação com a síndrome metabólica e diversas alterações no relógio biológico. Provavelmente, o relógio pode ser induzido pela dieta, levando a várias alterações metabólicas, bem como a dieta promovendo problemas metabólicos, levando a alterações no relógio circadiano.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo objetiva avaliar a expressão de genes do relógio, canais TRP e opsinas, em explantes cardíacos, em condições de 12h:12h de ciclo claro-escuro LD, e investigar os efeitos do ácido palmítico no relógio local, em cultura primária de cardiomiócitos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar a expressão gênica relativa dos genes do relógio, *Bmal1* e *Per1*, das opsinas *Opn1*, *Opn2*, *Opn3* e *Opn4*, e dos canais TRP, *TrpVI* e *TrpA1*, *in vitro*, em explantes cardíacos oriundos de camundongos adultos selvagens e nocautes para os canais *TrpVI* e *TrpA1* mantidos a 30°C;
- b) Investigar o efeito do ácido palmítico, na expressão gênica relativa dos genes do relógio, *Per1* e *Bmal1*, em cultura primária de cardiomiócitos oriundos de camundongos neonatos selvagens.

4 METODOLOGIA

A metodologia do estudo foi dividida em dois ensaios experimentais: um ensaio com explantes cardíacos de camundongos adultos da linhagem C57BL/6J, selvagens, nocautes para o canal TRPV1 e nocautes para o canal TRPA1; e outro ensaio envolvendo culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos neonatos da linhagem C57BL/6J. No primeiro ensaio, a partir do modelo animal de estudo, foi realizado o delineamento experimental. Para ensaio experimental, com culturas primárias, foi realizada a confecção das culturas e preparo de soluções utilizadas no experimento, o desenho experimental, preparo das placas e o delineamento experimental. Para avaliação da expressão gênica de ambos ensaios experimentais foi utilizado a técnica de qPCR. E, por fim, foi feita a estatística dos resultados.

4.1 EXPLANTES CARDÍACOS DE CAMUNDONGOS

4.1.1 Animais

Os experimentos foram conduzidos em camundongos machos da linhagem C57BL/6J, *TrpA1 KO* em fundo C57BL/6J produzidos no Biotério do Departamento de Fisiologia do IB-USP (a partir do retrocruzamento de C57BL/6J com B6.129X1-*Trpv1^{tm1}*Jul/J Stock No:003770, Jackson Laboratories, Bar Harbor, MA, EUA) e *TrpV1 KO* em fundos C57BL/6J (B6;129P-*Trpa1^{tm1}*Kykw/J Stock No: 006401, Jackson Laboratories), com 15 animais entre 3 a 6 meses de vida. As progenitoras foram acomodadas uma por gaiola, com seus respectivos filhotes, mantidas em ambiente silencioso, com temperatura controlada, em ciclos de 12 horas de período diurno (das 07:00 às 19:00 horas) e 12 horas de período noturno (das 19:00 às 07:00 horas) mantidos artificialmente. Receberam água e ração Purina *ad libitum*.

As informações referentes ao processo de nocaute dos animais se encontram na seção anexos.

4.1.2 Delineamento Experimental do Ensaio com Explantes Cardíacos de Camundongos

Os animais selvagens e nocautes foram transferidos para o biotério do laboratório da USP, mantendo-os em temperatura de 30°C (termoneutralidade) em LD por 2 semanas. A eutanásia aconteceu no ZT2 (2 horas após o acender das luzes). No primeiro dia de experimento, camundongos selvagens (C57BL/6J) foram eutanasiados, totalizando 5 animais.

Os nocautes para TRPV1 e TRPA1 foram eutanasiados no mesmo *zeitgeber* (ZT2) em diferentes dias. O coração extraído foi dividido em átrio e ventrículo para avaliação da expressão gênica por ensaio de q-PCR.

4.2 CULTURA PRIMÁRIA DE CARDIOMIÓCITOS

4.2.1 Animais

Para obtenção de cardiomiócitos foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6J, neonatos (1 a 3 dias), sexo indiferente. Estes permaneceram juntamente com a mãe até o dia do experimento.

As progenitoras foram acomodadas uma por gaiola, com seus respectivos filhotes, mantidas em ambiente silencioso, com temperatura controlada, em ciclos de 12 horas de período diurno (das 07:00 às 19:00 horas) e 12 horas de período noturno (das 19:00 às 07:00 horas) mantidos artificialmente. Receberam água e ração Purina *ad libitum*. Todas as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA-UFOP nº 4825230419) foram seguidas.

4.2.2 Cultura Primária de Cardiomiócitos

O protocolo de extração de células cardíacas foi um protocolo adaptado de EHLE et al. (2006). Resumidamente, foram utilizados 10 camundongos neonatos em cada cultura, os quais foram higienizados com álcool 70% e decapitados, seguido de remoção e lavagem do coração em solução ADS. Em seguida, os fragmentos de ventrículos selecionados foram, posteriormente, digeridos enzimaticamente em solução tampão de digestão (Tabela 3), agitando-os em banho-maria a 37°C em 2 ciclos de 30 min. A suspensão de células resultante desta etapa foi centrifugada (Befer BMCD modelo CMPlus) a 1200rpm/5min. O pellet foi ressuspensionado com meio de cultura DMEM enriquecido com 5% de soro fetal bovino, 10% de soro de cavalo, 1% de penicilina/estreptomicina e 0,1% de inibidor de fibroblasto BRDU (5-Bromo-2'-deoxiuridina – Sigma-Aldrich) (Tabela 1 e 2). Posteriormente, as células foram distribuídas em placa de 24 poços e incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 60min para que ocorresse a devida adesão dos fibroblastos e, assim, aumentasse a pureza da cultura. O sobrenadante desta etapa (cardiomiócitos) foi retirado e distribuído em uma nova placa de 24 poços. Novamente, o sobrenadante desta etapa foi removido e distribuído em uma nova placa.

Por fim, a placa foi acondicionada em estufa de CO₂ (5%) a temperatura constante de 37°C por 48 horas para adesão completa das células.

4.2.3 Soluções Utilizadas nos Ensaios

Tabela 1: Composição da solução de BRDU [10⁻²M] (5-Bromo-2'-deoxiuridina)

Componentes	Quantidade
Água Milli-Q	165 mL
BRDU	0,5g

Tabela 2: Composição do meio de cultura normal

Componentes	Quantidade (q.s.p)
DMEM (Sigma-Aldrich)	42,5 mL
Soro de cavalo (LGC)	5,0 mL
Soro fetal bovino (LGC)	2,5 mL
Penicilina-estreptomicina (LGC)	0,5 mL
Solução de BRDU [10 ⁻² M]	50 µL

Tabela 3: Composição da solução tampão de digestão

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

Tabela 4: Composição do meio de cultura baixa glicose do meio concentrado em ácido palmítico

Componentes	Quantidade (q.s.p)
DMEM baixa glicose 5,5 mM (Sigma-Aldrich)	42,5 mL
Soro fetal bovino (LGC)	1,0 mL
Penicilina-estreptomicina (LGC)	0,5 mL

Tabela 5: Composição da solução BSA conjugado com ácido palmítico

Componentes	Quantidade (q.s.p)
Protein Standards, MicroStandard, 1mg BSA/ml em 0,15M NaCl, 0,05% NaN ₃ (Sigma-Aldrich P0914 – 10 ampolas)	999,95 µL
Ácido Palmítico (Sigma-Aldrich P0500 – 10g)	0,01024 g

Tabela 6: Composição da solução de 50% de soro para sincronização do relógio

Componentes	Quantidade (q.s.p)
DMEM (Sigma-Aldrich)	50 MI
Soro Fetal Bovino (LGC)	50 MI

Todas as soluções utilizadas para cultivo e manutenção das culturas de cardiomiócitos foram esterilizadas em membrana Millipore 0,22 μm .

4.2.4 Desenho Experimental do Ensaio com Cultura de Células

As culturas celulares foram divididas em grupos experimentais Controle e Meio Ácido Palmítico, conforme descrito a seguir.

Grupos Experimentais

1. Células Primárias: Meio Controle.
2. Células Primárias: Meio Ácido Palmítico.

4.2.5 Preparo das Placas

Após o período de adesão celular, as células foram removidas da placa com TrypLE Express Enzima (trípex - tripsina sintética) (Gibco®). Removido o meio de cultura, foram acrescentados de 350 μL de trípex em cada poço para perda de adesão celular à placa. O Trípex com as células foi, então, removido e centrifugado a 1020 rpm/5 min. Foi descartado o sobrenadante e as células foram ressuspensas em meio de cultura próprio (tabela 2). Os cardiomiócitos foram semeadas na densidade de 10^5 células em placa de 6 poços e acondicionadas em estufa de 5% CO_2 à temperatura constante de 37°C para adesão completa das células.

4.2.6 Delineamento Experimental do Ensaio com Cultura de Células

Durante o experimento, as células foram mantidas no meio descrito acima (tabela 2). Os cardiomiócitos foram mantidos em escuridão constante e na temperatura (37°C) durante 3 dias. No início do 4º dia, o meio das células foi trocado com um intervalo de 2 horas, por um meio com 50% de soro bovino fetal (choque de soro) (tabela 6) (Durgan et al., 2006). Esse procedimento foi responsável por sincronizar os genes do relógio.

4.2.7 Efeito do meio com ácido palmítico nos genes do relógio em cultura de cardiomiócitos

Após o choque de soro, as células receberam meios específicos conforme a seguir: células com meio Controle (tabela 4) e células com meio rico em ácido palmítico (tabela 5). As células do grupo *Meio Controle* receberam meio DMEM baixa glicose 5mM, suplementado com 2% de soro bovino fetal (LGC) e solução antibiótica/antimicótica a 1% (penicilina 10.000 U/mL, estreptomicina 10.000 µL/mL). O grupo *Meio Ácido Palmítico* recebeu o mesmo meio de cultura, porém acrescido com ácido palmítico $0,4 \times 10^{-3}M$, cuja concentração foi determinada segundo Durgan et al (2006). As células foram mantidas em estufa 5% CO₂ e temperatura constante de 37°C, em escuridão constante, durante 24hs (ensaio agudo). Após esse período, o RNA total foi extraído 2hs (T2) e 14hs (T14) após o tratamento e a expressão dos genes *Bmal1* e *Per1* será feita por PCR em tempo real (Figura 1).

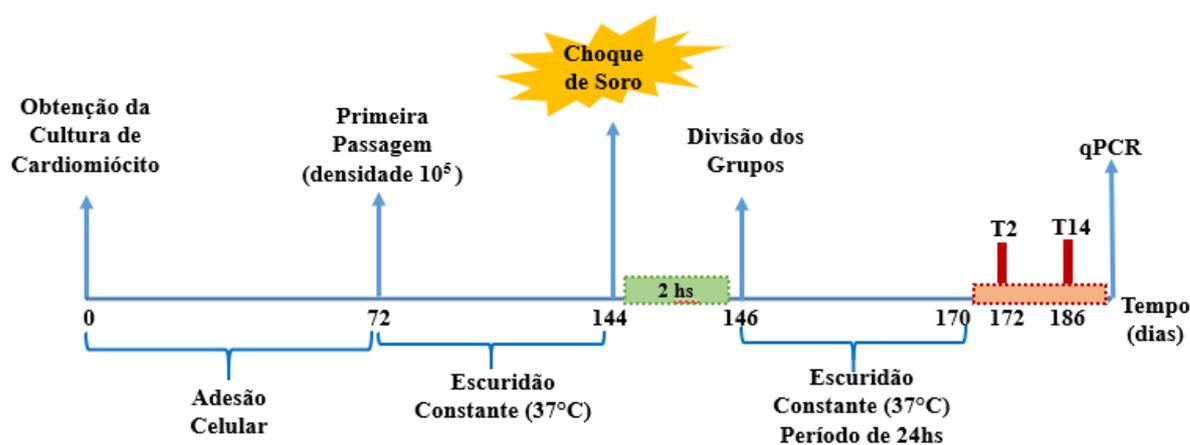


Figura 3: Fluxograma – Delineamento Experimental

4.2.8 Preparação do Complexo BSA: Ácido Palmítico

Inicialmente, foi preparada a solução de ácido palmítico. Para isso, pesou-se 0,01024g de ácido palmítico e solubilizou-o em 857,1 µL da solução de BSA/NaCl 150M (veículo). Adicionou-se, posteriormente, mais 142,85 µL da solução de BSA/NaCl 150M, para obter uma solução de concentração molar de $0,4 \times 10^{-1}M$. A solução BSA conjugado com ácido palmítico ($0,4 \times 10^{-1}M$) foi homogeneizada em banho-maria a 37°C durante 1h. Após completa homogeneização, foi adicionado 100 µL da solução BSA conjugado com ácido

palmítico ($0,4 \times 10^{-1}M$) a 9900 μL de meio pré-preparado de DMEM baixa glicose (5,5 mM de glicose), atingindo, assim, a concentração final desejada de ácido palmítico $0,4 \times 10^{-3}M$ no meio de cultura baixa glicose.

4.3 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL, RT-PCR E qPCR

4.3.1 Extração do RNA

No ensaio com as culturas de células, foi extraído o lizado celular nos tempos T2 e T14 (2hs e 14 hs após o tratamento com os meios hiperlipídico e controle). O meio de cultura foi descartado e uma alíquota de TRIzol (1mL) foi acrescentada em cada poço, pipetando várias vezes para lavar a superfície à qual as células estavam aderidas. Após, foi transferido o conteúdo dos poços para um eppendorf de 1,5mL, deixando-o por 5 minutos em temperatura ambiente.

Para os ensaios com explantes cardíacos, os animais foram eutanasiados em câmaras de CO₂. Em seguida, foi realizada uma incisão torácica para a remoção do coração e separação em átrio e ventrículo para, então, serem armazenados em eppendorf e mergulhados em gelo seco. Para a extração do RNA, o tecido cardíaco foi fragmentado manualmente, com o auxílio de uma lâmina estéril. Em seguida, foi adicionado ao eppendorf, contendo a amostra, 300 μL de reagente TRIzol (Tri-Reagent-LS, Sigma, EUA) que foi homogeneizado utilizando um homogeneizador e, por fim, adicionou-se 700 μL de TRIzol (para volume final de 1mL). Adiante, as amostras contendo o TRIzol foram incubadas durante 10 minutos em temperatura ambiente. Os eppendorfs foram centrifugados a 500xg por 5 minutos a temperatura ambiente. Após, foi pipetado 900 μL de sobrenadante para novos eppendorfs. A centrífuga foi ajustada para temperatura de 4°C.

A partir dessa etapa, os procedimentos executados foram os mesmos, tanto para as culturas quanto para o tecido cardíaco. Adicionaram-se 200 μL de 1-bromo-3-cloropropano-BCP seguido de agitação vigorosa (vortex) por 15 seg e permanecendo em temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000xg a 4°C durante 15 minutos e, com cuidado, transferiu-se 400 μL da fase aquosa superior para um frasco eppendorf (de 1,5 mL). A interfase curta que contém proteínas e a inferior que contém DNA foram descartadas. Adicionou-se 600 μL de isopropanol 100% para precipitar o RNA. Com um movimento de aspirar para cima e para baixo uma única vez, deixou-se por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram, novamente, centrifugadas a 12.000xg a 4°C

durante 35 minutos, para formarem um pellet, e removeu-se o sobrenadante virando o eppendorf, sem bater, dispensando a fase líquida. Após, adicionou-se 1,3mL de etanol 75%, vortexando em seguida. Novamente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g a 4°C durante 15 minutos e, então, levadas para o freezer a -20°C por pelo menos 1 hora para precipitar o RNA restante. Passado esse período, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 1,3 mL de etanol 75%, seguido de agitação no vortex. Centrifugou-se a 12.000 x g a 4°C durante 15 minutos e descartou-se o sobrenadante sem bater os frascos, apenas invertendo os eppendorfs em lencinhos de papel e deixando por 5-10 minutos até secar. Ressuspendeu-se o RNA com um volume de 20µL de H₂O DEPC e pipetou-se para cima e para baixo até que o pellet desaparecesse. Acrescentou-se 10% do volume do 10X Turbo DNase buffer e acrescentou-se 1µL da turbo DNase, depois centrifugou-se brevemente na centrífuga de bancada. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Após ressuspendeu-se o reagente de inativação da DNase por vortex e adicionaram-se 3µL, vortexando novamente, para manter a suspensão homogênea. As amostras foram incubadas por 2 minutos em temperatura ambiente e, então, centrifugadas a 10.000 x g a 4°C durante 2 minutos para precipitar o reagente de inativação. Removeu-se o sobrenadante para um novo tubo e determinou-se a concentração de RNA fazendo a leitura no equipamento Nanodrop 1000 (ND-1000). A razão de OD₂₆₀/OD₂₈₀ foi considerada boa acima de 1,6.

4.3.2 RT-PCR

A reação de RT-PCR foi realizada com 1µg de RNA total, utilizando 1µL de oligonucleotídeos randômicos (100 ng/µL) e 1 µL de dNTPs Mix 10mM (Life Technologies, EUA), em reação com volume final de 13µL ajustado com H₂O/DEPC. As amostras foram aquecidas por 5 min a 65°C e, em seguida, transferidas para cuba com gelo, adicionando-se 7µL do mix [4µL de tampão para PCR (5x), 1µL de DTT (0,1 M), 1µL de inibidor de ribonuclease (40U/uL) e 1µL da enzima Superscript III (200U/µL, Life Technologies, EUA) 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° por 15 min. O cDNA sintetizado foi usado nas subsequentes reações de PCR quantitativo (em tempo real).

4.3.3 PCR quantitativo

Para o protocolo multiplex foi utilizado uma solução de Supermix UDG 2X (Invitrogen) suplementado com $MgCl_2$, dNTPs e Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Brasil) para complementar o mix. A solução foi complementada com H_2O DNaseRNase-free e um par de *primers* e probes, específicos para cada um dos genes, *Per1* e *Bmal1* (desenhados pelo programa *Primer Quest*, IDT, e sintetizado pela IDT, EUA, Tabela 1). Para o protocolo SYBER Green foi utilizado KAPA SYBR FAST qPCR. Master Mix (2X) Bio-Rad. iCycler (Invitrogen) com um par de *primers*, específicos para cada um dos genes, *TrpA1*, *TrpV1*, *Opn1*, *Opn2*, *Opn3* e *Opn4* (Tabela 1), e H_2O DNaseRNase-free. O RNA ribossômico 18S foi utilizado como normalizador do experimento de explantes cardíacos. O Rpl37 e Elongation factor 1-alpha 1 (eEF1 α 1) foram utilizados como normalizadores no ensaio das culturas celulares (Tabela 1). A média do Rpl37 e eEF1 α 1 foi usada para normalizar os valores de expressão dos genes de interesse no ensaio das culturas celulares.

Para o tecido, os *primers* e probes foram diluídos em H_2O DNaseRNase free para se obter a solução estoque de concentração igual a 10^{-4} M. Uma solução intermediária dos *primers* e probes, de forma que o volume não passasse de 1 μ L por poço. Os primers e a probes de cada gene de interesse foram diluídos 10X (10 μ L em 90 μ L de H_2O DNaseRNase free), dando uma solução intermediária de 10^{-5} M. A concentração final foi de 300nM para primers e 200nM para probes dos genes, e de 50nM para primers do RNA 18S. Essa solução foi aliqüotada (42 μ L, sendo cada aliqüota suficiente para 2 poços) em tubos, e o cDNA de cada amostra dos diferentes genótipos (2 μ L/aliqüota) a cada tubo. As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa de experimento (20 μ L/poço).

Para o ensaio das culturas, os *primers* foram diluídos em H_2O DNaseRNase free para se obter a solução estoque de concentração igual a 10^{-5} M. Uma solução intermediária dos *primers*, de forma que o volume não passasse de 1 μ L por poço. Os primers de cada gene de interesse foram diluídos 10X (10 μ L em 90 μ L de H_2O DNaseRNase free), dando uma solução intermediária de 10^{-5} M. A concentração final foi de 300nM para primers, e de 50nM para primers de eEF1 α 1 e Rpl37. Essa solução foi aliqüotada (23,5 μ L, sendo cada aliqüota suficiente para 2 poços) em tubos, e o cDNA de cada amostra dos diferentes genótipos (2,5 μ L/aliqüota) a cada tubo. As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa de experimento (10 μ L/poço).

Após, com auxílio de adesivo óptico *MicroAmp Optical Adhesive Film* (*Applied Biosystems*®), foram seladas as placas. As reações foram executadas no equipamento ABI 7300 (*Applied Biosystems*), configurado a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores de *baseline* foram ajustados para 3 a 15 ciclos e o *threshold* fixado em 0,2 para todos os grupos. Os resultados de PCR quantitativo foram analisados através do método de $\Delta\Delta C_T$. O valor de C_T é o número de ciclos obtido passando-se uma reta definida como limiar que cruza as porções de crescimento geométrico das curvas de amplificação. Sabendo-se o C_T , é encontrado ΔC_T que é a diferença entre esse valor para o gene de interesse e o valor para *18S* da mesma amostra de cDNA (ambos correspondendo à média de poços triplicados ou duplicados do mesmo cDNA). A seguir, obtém-se o $\Delta\Delta C_T$ subtraindo a média do grupo ventrículo WT dos valores encontrados para cada amostra dos grupos átrios e ventrículos de todos os genótipos, sendo exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) e esse valor foi utilizado nas análises estatísticas.

As respectivas sequências de *primers* e *probes* são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 7: Sequência de *primers* e *probes* para PCR quantitativo

Sequência	Concentração Final	Nome
For.: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' Rev.:5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	50 nM	RNA 18S
For.: 5'-GCATGAAAACAGTGGCCGGT-3' Rev.: 5'-CAGGGTCACACAGTATGTCTCAAAA-3'	50 nM	Rpl37
For.: 5'-ACGTTCTTTTCGCAACGGG-3' Rev.: 5'-TAGTGATACCACGCTCACGC-3'	50 nM	eEF1 α 1
For:5'-AAGCTTCTGCACAATCCACAGCAC -3'	300 nM	

Rev: 5'-TGTCTGGCTCATTGTCTTCGTCCA-3'		<i>mBmal1</i>
Probe:5'-/5HEX/- AAAGCTGGCCACCCACGAAGATGGG/3BHQ_1/-3	200 nM	
For:5'-AGCAGGTTTCAGGCTAACCAGGAAT-3' Rev:5'-AGGTGTCCTGGTTTCGAAGTGTGT-3'	300 nM	<i>mPer1</i>
Probe:5'-/6FAM/-AGCCTTGTGCCATGGACA TGTCTACT/3BHQ_1/-3'	200 nM	
For: 5'-ACATCTTCATCTTCAGGGCCA-3' Rev: 5'-ACTCACCGCAGCCCTCAC-3'	300 nM	<i>mOpn4</i>
For: 5'-TGGGCACCAAGTATCGAAGC-3' Rev: 5'-ATCTCCAGAATGCAAGCCCG-3'	300 nM	<i>mOpn1-SW</i>
For: 5'-TGCCACACTTGGAGGTGAAA-3' Rev: 5'-ACCACGTAGCGCTCAATGG-3'	300 nM	<i>mOpn2</i>
For: 5'-TCTCTACTCCAAGTTCCCGAG-3' Rev: 5'-TGACTIONCGAACAGGGATACCA-3'	300 nM	<i>mOpn3</i>
For: 5'-CAGAGACCTGTGTCGGTTTATG-3' Rev: 5'-CATGTTGAGCAGGAGGATGTAG-3'	300 nM	<i>mTrpV1</i>
For: 5'-GGTCCAACATAACCGCATAGA-3' Rev: 5'-AGGGCAACACGAAGATGATAC-3'	300 nM	<i>mTrpA1</i>

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos resultados foram feitas através do *software* GraphPad Prism (versão 7.01). Todos os valores são expressos como média $x \pm s$. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas usando análise de variância unidirecional (ANOVA) *Two-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni para determinação das diferenças significativas entre os grupos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS GENES DO RELÓGIO, *BMAL1* E *PER1* EM EXPLANTES CARDÍACOS

Camundongos C57BL/6J selvagens e nocautes para o canal *TrpV1* e *TrpA1* foram mantidos em temperatura termoneutra (30°C) durante 2 semanas em ciclo LD 12:12. Os animais não apresentaram diferença significativa no nível de expressão para o gene *Bmal1*, entre átrio e o ventrículo, tanto nos selvagens quanto nos nocautes (Figura 4). O nível de transcrição dos gene *Per1* foi significativamente maior no átrio dos camundongos *TrpV1 KO* em comparação ao ventrículo no ZT2. Já os animais selvagens e *TrpA1 KO* não apresentaram diferença significativa no nível de expressão em relação ao átrio e ventrículo (Figura 5).

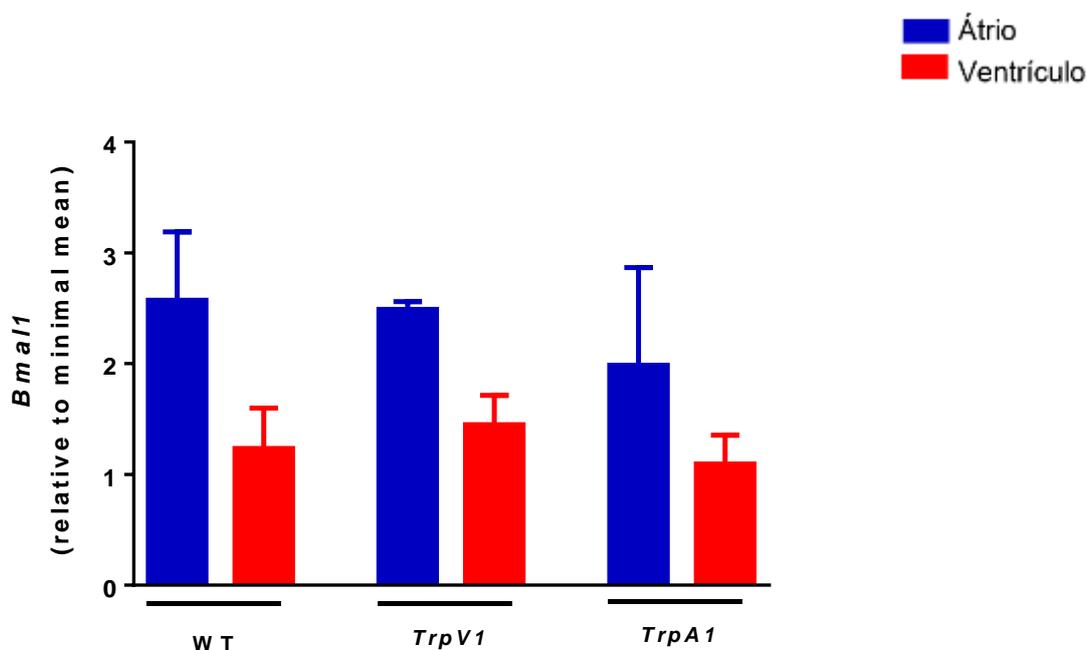


Figura 4 - Expressão do gene *Bmal1* em explantes cardíacos de camundongos WT, *TrpV1 KO* e *TrpA1 KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$.

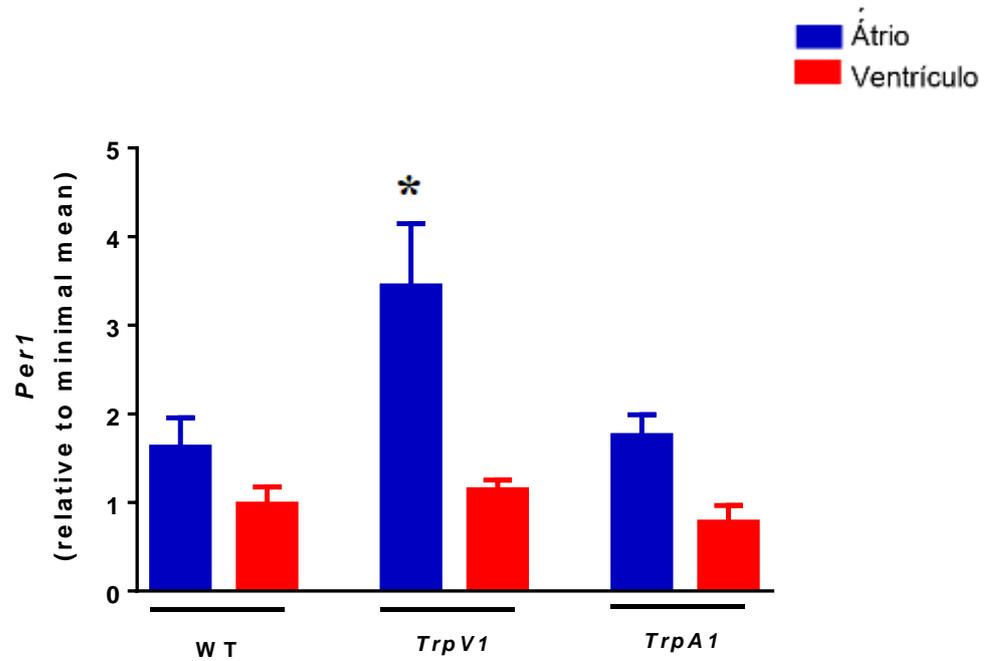


Figura 5 - Expressão do gene *Per1* em explantes cardíacos de camundongos WT, *TrpV1 KO* e *TrpA1 KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$. (*) Indica significativamente diferentes do respectivo ventrículo.

5.2 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS CANAIS *TRPV1* E *TRPA1* EM EXPLANTES CARDÍACOS

Foram avaliados a expressão relativa dos canais *TrpA1* e *TrpV1* de camundongos selvagens e nocautes para os canais *TrpV1* e *TrpA1*, respectivamente. Os animais selvagens apresentaram, significativamente, maior expressão tanto dos canais *TrpA1* quanto *TrpV1* no átrio em relação ao ventrículo. Já os animais *TrpV1 KO* e *TrpA1 KO* não apresentaram diferença significativa no nível de expressão dos canais *TrpA1* e *TrpV1* em relação ao átrio e ventrículo, respectivamente (Figura 6 e 7).

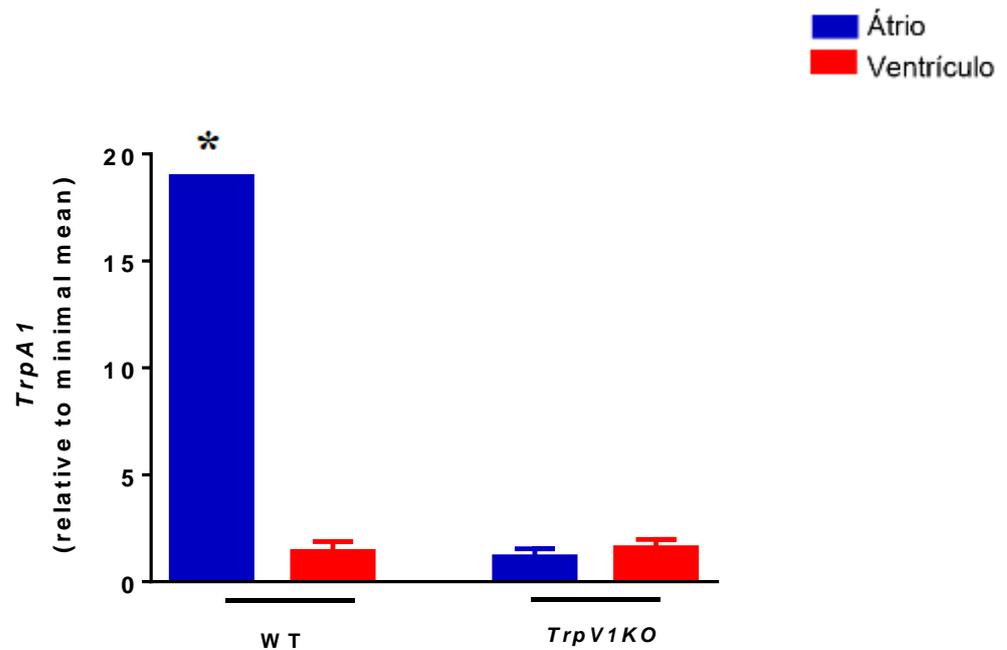


Figura 6 - Expressão do gene *TrpA1* em explantes cardíacos de camundongos WT e *TrpV1 KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$. (*) Indica significativamente diferentes do respectivo ventrículo.

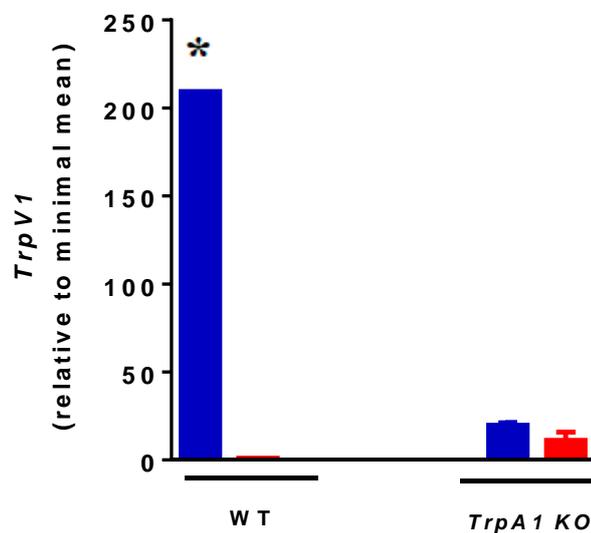


Figura 7 - Expressão do gene *TrpV1* em explantes cardíaco de camundongos WT e *TrpA1 KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$. (*) Indica significativamente diferentes do respectivo ventrículo.

5.3 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DAS OPSINAS, *OPN1*, *OPN2*, *OPN3* e *OPN4* EM EXPLANTES CARDÍACOS

Além dos canais TRPs e os genes do relógio, foram avaliadas o nível de expressão de algumas opsinas. Dentre elas a *Opn1*, *Opn2*, *Opn3* e *Opn4*. Os resultados referentes ao perfil de expressão gênica relativa das opsinas encontram-se representados pela Figura 8 (*Opn1*), Figura 9 (*Opn2*), Figura 10 (*Opn3*) e Figura 11 (*Opn4*). Tanto a *Opn1* quanto a *Opn2* apresentaram significativamente maior expressão no coração de camundongos C57BL/6J no átrio em relação ao ventrículo no ZT2 (Figura 8 e 9). Os genótipos *TrpA1 KO* e *TrpV1 KO* não exibiram diferenças significativas no nível de expressão das opsinas *Opn1* e *Opn2*. Não foram observadas diferenças significativas na expressão da *OPN3* no átrio e ventrículo de todos o genótipos avaliados (Figura 10).

A expressão da *Opn4* foi avaliada também nos animais nocautes e selvagens no ZT2 à 30°C. Baseado nos resultados de qPCR, o gene *Opn4* não apresentou diferença significativa no nível de expressão no átrio e ventrículo nos animais selvagens e nos nocautes para o canal *TrpA1* e *TrpV1* (Figura 11).

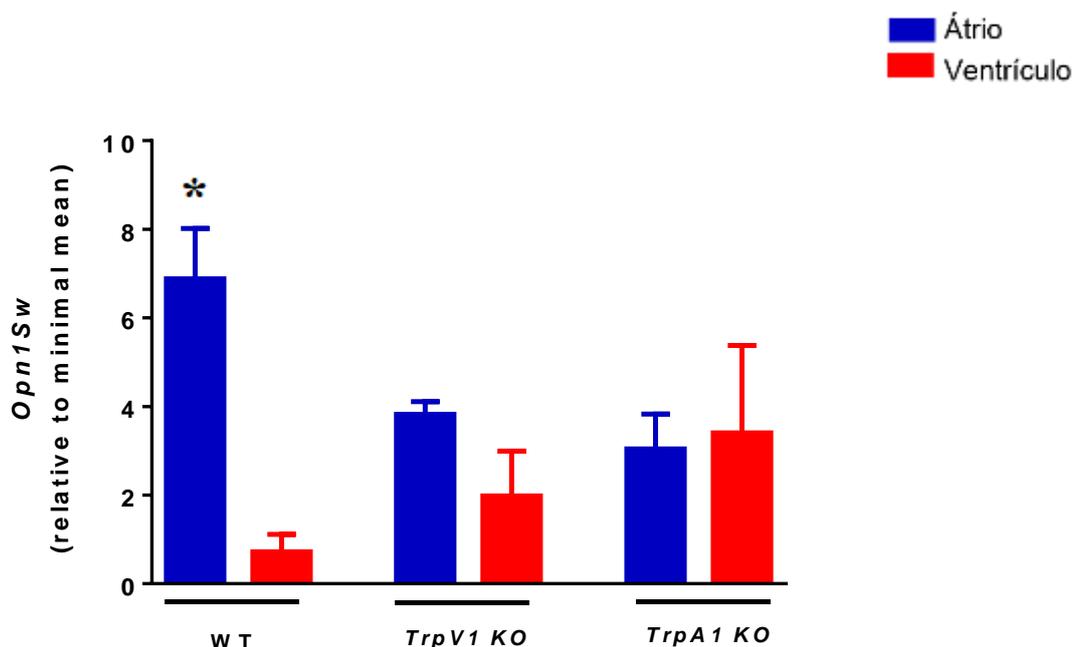


Figura 8 - Expressão do gene *Opn1* em explantes cardíacos de camundongos WT, *TrpV1 KO* e *TrpA1 KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test.

Significância foi estabelecida por $p < 0.05$. (*) Indica significativamente diferentes do respectivo ventrículo.

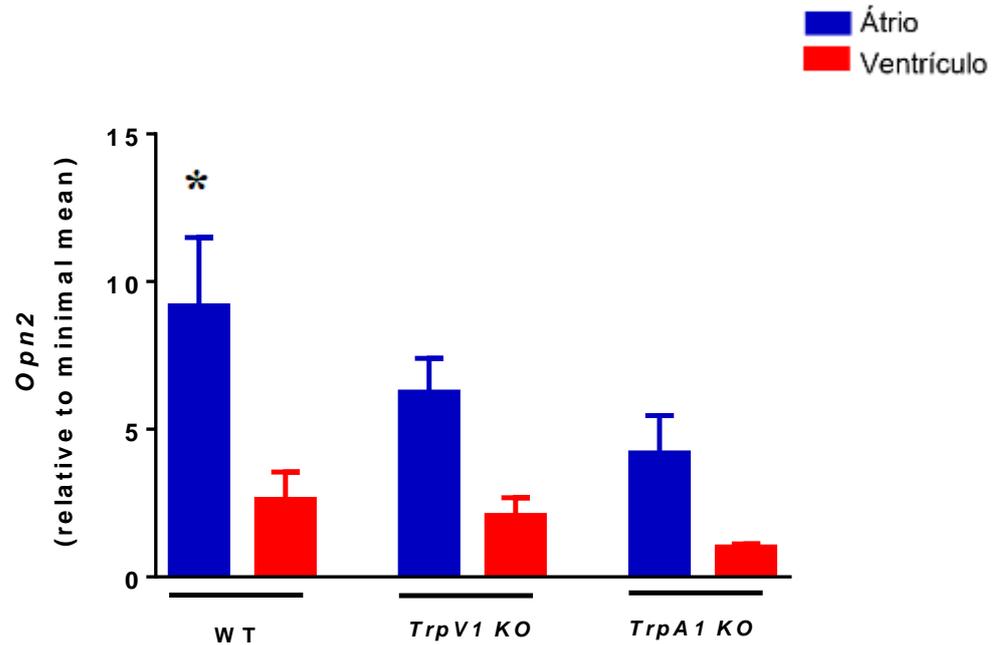


Figura 9 - Expressão do gene *Opn2* em explantes cardíacos de camundongos WT, *TrpV1 KO* e *TrpA1 KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$. (*) Indica significativamente diferentes do respectivo ventrículo.

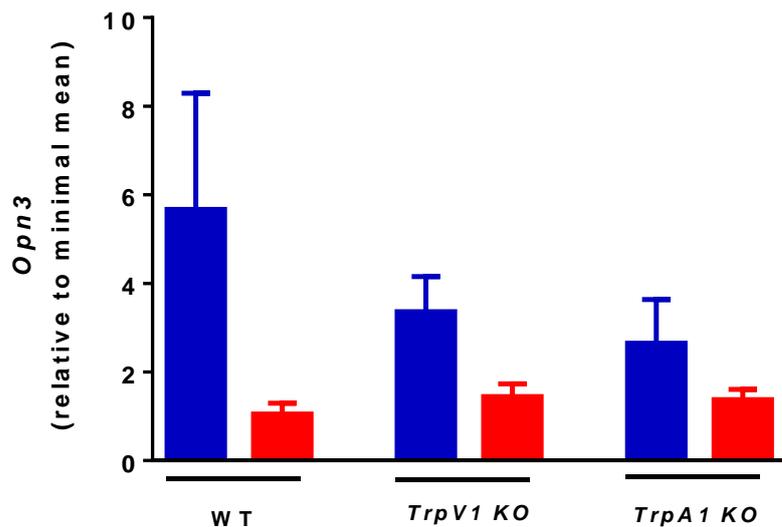


Figura 10 - Expressão do gene *Opn3* em explantes cardíacos de camundongos WT, *TrpV1 KO* e *TrpA1 KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA

ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$.

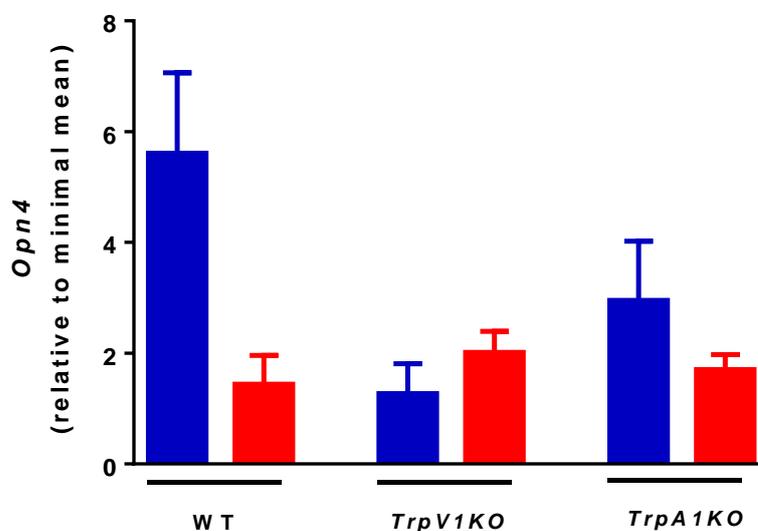


Figura 11 - Expressão do gene *Opn4* em explantes cardíacos de camundongos WT, *TrpV1 KO* e *TrpA1 KO* em ciclo LD, por qPCR sendo os resultados normalizados pelo RNA ribossomal 18S. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$.

5.4 EFEITO DO ÁCIDO PALMÍTICO NO NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS GENES DO RELÓGIO, *BMALI* E *PERI*, EM CULTURA PRIMÁRIA DE CARDIOMIÓCITOS

Para investigar os efeitos de um meio concentrado em ácido palmítico na expressão do genes *Bmal1* e *Per1* em cultura de cardiomiócitos, foi feita a divisão das células em grupos controle e meio ácido palmítico, sendo células expostas apenas ao meio de cultura sem ácido palmítico e células expostas ao mesmo meio com ácido palmítico (0,4mM), respectivamente. Como protocolo padrão, as culturas foram submetidas ao choque de soro (50%) para sincronização do relógio das células antes de iniciado o tratamento com os respectivos meios de cultura.

Conforme demonstrado nas Figuras 12 e 13, o grupo hiperlipídico apresentou alta expressão para o gene *Per1* e baixa para o gene *Bmal1*, 2 horas após o tratamento. No tempo 14 (14 horas após o tratamento), o grupo hiperlipídico apresentou um perfil de baixa expressão para o gene *Per1* e alta para o gene *Bmal1*.

Quando observado o nível de expressão nos grupos quanto ao tempo (T2 e T14), os resultados mostram que possivelmente houve sincronização dos genes do relógio pelo choque

de soro em todos os grupos. Observa-se que expressão média difere de um tempo para o outro, condizente com a literatura (BALSALOBRE et al., 2000).

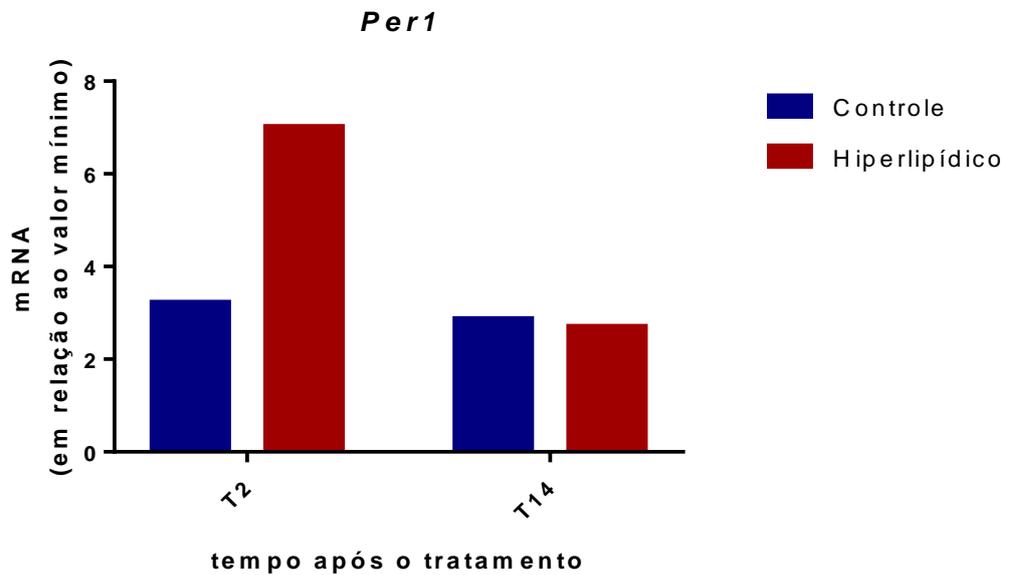


Figura 12 - Expressão do gene *Per1* em cultura primária de cardiomiócitos submetidos a meio de cultura sem ácido palmítico e com ácido palmítico (0,4 mM) por 24 horas. O lizado celular foi coletado 2 e 14 horas após o tratamento. Os valores são apresentados como expressão média do gene de interesse normalizado pela média dos genes *eEF1 α 1* e *Rpl37*. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguida por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$.

O grupo controle apresentou o mesmo perfil de expressão do gene *Per1*, 2 e 14 horas após o tratamento, e alta expressão para o gene *Bmal1*, 2 horas após o tratamento. No tempo 14 (14 horas após o tratamento), o grupo controle não apresentou um perfil de expressão de baixa para o gene *Bmal1* (Figuras 12 e 13).

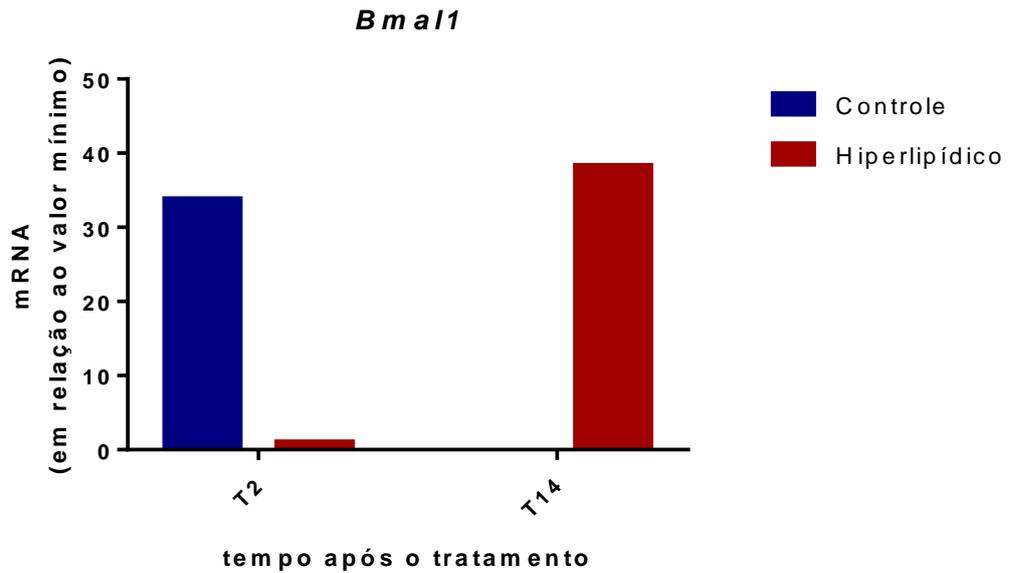


Figura 13 - Expressão do gene *Bmal1* em cultura primária de cardiomiócitos submetidos a meio de cultura sem ácido palmítico e com ácido palmítico (0,4 mM) por 24horas. O lizado celular foi coletado 2 e 14 horas após o tratamento. Os valores são apresentados como expressão média do gene de interesse normalizado pela média dos genes *eEF1 α 1* e *Rpl37*. Análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguido por Bonferroni post-test. Significância foi estabelecida por $p < 0.05$.

6 DISCUSSÃO

Existe a visão clássica de que rodopsina e opsinas relacionadas funcionam exclusivamente na detecção de luz (SHEN et al, 2011). Evidências sugerem que os mamíferos podem detectar luz na pele (OLINSKI; LIN; OANCEA, 2019), no cérebro (NISSILÄ et al., 2012) e nos vasos sanguíneos (ORTIZ et al., 2017). Uma grande descoberta é a de que as opsinas não estariam atuando exclusivamente como sensores de luz (SHEN et al, 2011), mas, também, como sensores independentes da luz, tais como termo-sensores em *Drosophilas* através da rodopsina, e, na sua ausência, a melanopsina desempenharia essa função associadas aos canais TRP (LEE & MONTELL, 2013).

Em mamíferos, a descoberta de que a melanopsina é, além de um foto-receptor, também um sinalizador de temperatura (DE ASSIS et al., 2017; PÉREZ-CEREZALES et al., 2015), abriu um novo leque de possibilidades relacionadas a sua função. Os canais TRP, dependentes de voltagem permeáveis ao cálcio, também estão presentes em vários órgãos e tecidos de vertebrados e invertebrados. Interessantemente, alguns dos canais TRP têm sido identificados como sensores térmicos atuando com diversas faixas de ativação pela temperatura. Logo, é plausível que exista uma relação entre essas duas proteínas, uma vez que estimulada a melanopsina, canais TRP são ativados, promovendo o influxo de cálcio. O coração de camundongos, entre outros mamíferos incluindo o homem, apresentam alta expressão de melanopsina, além de canais TRP sensíveis a variação de temperatura (FREICHEL et al., 2017).

Nossa ideia inicial foi verificar a possibilidade de o coração de camundongos estarem funcionando como um termo-sensor e a de uma possível relação desse sensor com o relógio cardíaco.

O nível de expressão dos genes *Bmall* e *Per1* nas câmaras cardíacas de camundongos do tipo selvagem e nocautes para os canais *TrpV1* e *TrpA1* foram determinados. Foi observado, apenas no gene do relógio *Per1l*, um aumento significativo da sua expressão no átrio em relação ao ventrículo dos animais *TrpV1 KO*. De acordo com Goetze e col. (2010), os genes *Per1* e *Bmall* oscilam em um ciclo antifásico de 24 horas, tanto no átrio quanto no ventrículo, confirmando que existe um padrão de expressão diurna para esses genes. Outro estudo, avaliando o nível de expressão dos genes do relógio no coração, também observou um padrão de oscilação (LEIBETSEDER, 2009). Estudos apontam que a expressão cardíaca dos genes do relógio é independente da câmara, ou seja, átrio ou ventrículo, sugerindo que o conteúdo de mRNA não é anatomicamente restrito a uma específica população de células

(GOETZE et al., 2010). De fato, já está bem descrito na literatura a importância dos osciladores circadianos nos cardiomiócitos em processos responsáveis por modular as propriedades intrínsecas do coração (MARTINO & YOUNG, 2015). O papel crítico desses processos é observado por relatos de que a interrupção, por manipulação genética, resulta no desenvolvimento de doenças cardíacas e mortalidades em modelo animal (MARTINO & YOUNG, 2015). Estudos observaram, em modelo de camundongo nocaute *Bmal1* específico para cardiomiócitos, uma alteração marcada no transcriptoma cardíaco e comprometimento no metabolismo dos corpos cetônicos e na sinalização celular. Além disso, a validação do estudo confirmou que a enzima β -hidroxibutirato-desidrogenase 1 (Bdh1), envolvida no metabolismo de corpos cetônicos, e a subunidade reguladora da fosfatidilinositol-3-quinase alfa (Pik3r1), são regulados por *Bmal1* (YOUNG et al., 2014). O gene *Pik3r1* é de potencial interesse, visto que ele está envolvido na via de sinalização da insulina, o que impacta no metabolismo do coração e na sua contratilidade (YOUNG et al., 2014).

Estudos direcionaram esforços para tentar entender qual é a função da maquinaria molecular no coração. Segundo análises de *microarray*, transcriptomas cardíacos de camundongos selvagens oscilam, aproximadamente, entre 10 a 15% ao longo do dia (STORCH et al., 2002; MARTINO et al., 2004), entre os quais um conjunto apreciável influencia o metabolismo do miocárdio direta ou indiretamente. No entanto, permanecem em aberto qual é o possível sinal temporal interno que regula o ritmo desses genes e qual a molécula responsável por enviar esse sinal ao relógio.

É interessante ressaltar que a temperatura é um importante *zeitgeber* reforçador do tempo interno a tecidos periféricos, e que quando estimulados podem ter sua fisiologia ajustada (TAKAHASHI, 2017). Logo, o estudo foi conduzido com animais mantidos a 30°C, dentro da zona de termoneutra, para evitar que o relógio fosse estimulado e fossem mantidas as condições fisiológicas. Imaginamos um cenário onde o coração, ao receber o sangue que entra no coração recém-vindo do trato respiratório e do fluxo de sangue vindo da periferia, detectaria pequenas variações de temperatura. Essas variações poderiam servir como um sinal a ser interpretado pelo coração, vindo assim a influenciar outros tecidos, através da liberação, por exemplo, de NPs.

Devido à escassez de informação na literatura, é difícil discutir os dados sobre a melanopsina. Tomados em conjunto, os dados não apontam uma diferença significativa no nível da *Opn4* no átrio e ventrículo dos genótipos estudados. Embora os animais selvagens tenham apresentado uma certa tendência em direção a significância no nível de expressão do átrio em relação ao ventrículo. Como os átrios direito e esquerdo recebem sangue da periferia

e do pulmão, respectivamente, seria plausível especular que as variações internas de temperatura são percebidas pelo coração através da *Opn4*, uma vez que esta opsina pode atuar como um sensor de temperatura (PÉREZ-CEREZALES et al., 2015; MORAES et al., 2017). Essa variação de temperatura seria interpretada pelo coração ao liberar seus principais hormônios, peptídeos natriuréticos, apelina e elabela. Logo, esses dados sugerem que o coração possa ser um grande órgão de monitoramento, usando variações de temperatura ou metabólitos para ajustar seu próprio metabolismo, bem como o metabolismo de outros tecidos. Destaca-se a influência da temperatura na expressão de receptores peptídicos natriuréticos, fato já bem conhecido (BORDICCHIA et al., 2012). Como é proposta uma ligação entre a função cardíaca (via liberação de NPs) e o metabolismo, e entre disfunção metabólica e interrupção do relógio, pode-se especular que o desequilíbrio exacerbado dessa via seria responsável por patologias não apenas no próprio coração, mas também no próprio organismo como um todo.

Existem evidências de que os ANPs estejam envolvidos na resposta adaptativa ao ambiente frio em algumas espécies de teleosteos antárticos ou a variações sazonais no sapo *Bufo arenarum* (MASINI et al., 1998; AOKI et al., 1989). Seria viável especular que a expressão dos ANPs, uma vez estimulada por variações de temperatura ambiente em animais hibernantes, esteja envolvida na regulação da temperatura corporal. Foi o que Addario e col. (2004) puderam observar, ao investigarem a expressão de ANP e o conteúdo dos grânulos de ANP em rãs *R. esculenta*, nos quais puderam observar mudanças sazonais no estado funcional do coração. Observaram também um elevado turnover de grânulos de ANP atriais no cardiomiócito de animais ativos comparados aos animais hibernantes. Além disso, a presença de grânulos maiores nos animais hibernantes se dá possivelmente em função da fusão dos pequenos grânulos, como forma de armazenamento de ANPs. Já, outro estudo, observou uma redução na expressão de NPs cardíacos no período de hibernação em esquilo terrestre da Anatólia (*Spermophilus xanthoprimum*) (OZTOP et al., 2019). Foi observado alterações nos níveis de transcrição e de proteínas para ANP no coração de esquilos da terra (*Ictidomys tridecemlineatus*) (LUU et al., 2015) e em camundongos mantidos a 4°C, comparados a homólogos mantidos a temperatura ambiente, que apresentaram elevada expressão de ANP e BNP (BORDICCHIA et al., 2012).

Considerando essas importantes constatações, mudanças sazonais influenciando no turnover de ANPs nos corações de animais hibernantes reforçam a hipótese deste trabalho de que o coração atua como órgão de monitoramento da temperatura corporal.

No presente estudo foi observado que o genótipo *TrpV1 KO* apresenta elevada expressão dos genes *Per1* no átrio, indicando que este canal está, possivelmente, envolvido na regulação do mecanismo do relógio no coração. Já no genótipo *TrpA1 KO*, o nível de expressão dos genes do relógio não apresentou diferenças significativas. Além disso, foi demonstrada, ao avaliar o nível de expressão dos canais TRPV1 e TRPA1 nos corações de camundongos, maior expressão de ambos os canais no átrio dos animais selvagens. Já nos animais *TrpV1 KO* e *TrpA1 KO* não foi diferença no nível de expressão do canal *TrpA1* e *TrpV1*. Evidências sugerem que os canais TRPA1 e TRPV1 exibem regulação recíproca, possivelmente indicando cross-talk entre os dois receptores quando expressos na mesma célula (PATIL; JESKE; AKOPIAN, 2010). Um recente estudo identificou a presença de mRNA TRPA1 em cardiomiócitos de camundongos (PAZIENZA et al., 2014), enquanto apenas um estudo demonstrou a expressão de TRPA1 em fibroblastos cardíacos (OGURI et al., 2014). A localização precisa do TRPA1 e TRPV1 dentro da ultraestrutura dos cardiomiócitos poderia fornecer importantes informações, como os papéis específicos que estes canais exercem na fisiologia e eventos patológicos do coração. Um interessante estudo, realizado em 2016 por Andrei e col., demonstrou que ambos os canais, TRPA1 e TRPV1, são co-expressos no endocárdio, miocárdio e epicárdio, e encontram-se localizados especificamente nos discos Z, costâmeres e nos discos intercalares. Além disso, tem-se identificado que a sensibilidade dos canais TRPV1 à ativação de agonistas pode ser modulada pelos agonistas do canal TRPA1. Logo, com base nessas informações, é plausível especular que realmente exista uma regulação entre esses canais, o que pode ser vital por alterar respostas celulares a estímulos nocivos nos neurônios sensoriais.

De fato, está bem descrito na literatura que o coração expressa os canais TRPV1, TRPV2 e TRPV4, muitos deles atuando como sensores térmicos. Existem evidências de que o TRPV1 esteja envolvido na manutenção da temperatura corporal normal. Acredita-se que a ativação tônica dos canais TRPV1 nos neurônios sensoriais viscerais seja mediada pelo calor, pois a resposta hipertérmica evocada pelo antagonismo do TRPV1 não foi afetada pela temperatura corporal central nem pela temperatura da pele da cauda (BEVAN et al., 2014; FALCÓN et al., 2019; STEINER et al., 2007). Além disso, alguns estudos relatam que o TRPV1 é encontrado, principalmente, em nervos sensoriais do sistema cardiovascular e no miocárdio (ZAHNER et al., 2003; GAO et al., 2015; RANDHAWA & JAGGI, 2017). Em vista destas descobertas, foi surpreendente que, em ensaios clínicos, o uso de agonistas para TRPV1 em células H9C2 (linhagem de células derivada de tecido cardíaco embrionário de *Rattus norvegicus*) tenha evocado o aumento, significativo, na expressão de ANP. Porém, o

tratamento com capsazepine (antagonista) atenuou a expressão de ANP induzido pelos agonistas capsaicina e o endocanabinoide anandamida (CHEN et al., 2016). Uma vez que já está bem descrito na literatura o papel dos peptídeos natriuréticos na termogênese do tecido adiposo, esse achado reforça a hipótese de que os canais TRP e, possivelmente, a melanopsina estejam atuando como termo-sensores.

Além disso, a temperatura pode estar atuando como um sincronizador de relógio universal, bem como a luz, que foi baseada na alteração da expressão do gene *Per2* no pulmão do camundongo (BUHR et al., 2010). Esses dados reforçam nossa hipótese de que a melanopsina, possivelmente, esteja atuando como um receptor de temperatura, e os canais TRP envolvidos na regulação dos genes do relógio. De fato, as descobertas obtidas com este estudo evidenciam essa informação, uma vez que camundongos nocautes para o canal *TrpVI* mostraram maior expressão do gene do relógio *Per1*. Dentro dessa linha, a melanopsina expressa na pele do camundongo estaria atuando como um receptor de sinais térmicos, levando ao aumento da expressão dos genes do relógio (MORAES et al., 2017). Além disso, foi demonstrado que a termotaxia de espermatozoides de mamíferos envolve uma cascata de sinalização dependente de opsina, possivelmente envolvendo OPN3, OPN5, OPN1-SW, OPN1-MW, OPN4 e rodopsina, além dos canais TRPC3 (PÉREZ-CEREZALES et al., 2015). Um estudo realizado por Roy e col. (2020), demonstrou que rodopsina e melanopsina coexistem nos mesmos espermatozoides, embora sua distribuição possa variar até certo ponto. Além disso, cada uma delas desencadeia uma via sinalização diferente. SIKKA e col. (2014) demonstraram a expressão da melanopsina nos vasos sanguíneos e observaram um papel fisiológico o relaxamento deles após estimulação por luz. Assim, com base no corpo de evidências, existe uma possibilidade real de que a melanopsina presente nos tecidos não visuais esteja atuando como uma molécula detectora de temperatura ou metabólito, associada aos canais TRP (PÉREZ-CEREZALES et al., 2015).

Verificamos aqui que as opsinas OPN1 e OPN2 são mais bem expressas no átrio de dos genótipos selvagens. Possivelmente existe alguma relação entre essas opsinas e os canais TRPA1 e TRPV1, porém não há evidências na literatura que justifiquem esses achados.

Ainda sobre as opsinas, ao determinar os níveis relativos de expressão gênica de transcritos de opsina em diferentes tecidos de zebrafish, usando o sistema NanoString nCounter (DAVIES et al., 2015), um protocolo altamente sensível e capaz de quantificar a expressão de até 800 genes em uma única amostra de RNA (GEISS et al., 2008). Davies e colaboradores (2015), observaram em tecidos dissecados e processados do coração de zebrafish adulto, níveis moderados a altos para diversas opsinas, totalizando 38 das 42

opsinas. Porém, no mesmo estudo não foi avaliada qual região do coração, átrio ou ventrículo, apresenta maior expressão. Como se pode observar no modelo do presente estudo, camundongos selvagens expressaram as opsinas, *Opn1* e *Opn2*, avaliadas predominantemente no átrio em relação ao ventrículo.

É importante ressaltar que as opsinas não visuais se encontram em diversos órgãos e tecidos fotossensíveis, podendo indicar um papel importante no ajuste das funções locais impostas pelos ciclos claro-escuro. Esse ajuste ocorre pelos genes do relógio, que expressam um mecanismo autossustentado para manter células e tecidos sincronizados entre si e com o ambiente. Quatro *zeitgebers* afetam fortemente a sincronização do relógio: a temperatura, a luz, os hormônios e a alimentação. Possivelmente, essas opsinas não visuais sejam as responsáveis pela percepção de temperatura (LEE & MONTELL, 2013), visto que a rodopsina foi essencial para a discriminação de temperatura nas larvas de *Drosophila* (SHEN et al; 2011).

Até o momento, milhares de opsinas foram identificadas tanto em vertebrados quanto em invertebrados e estão divididas em 8 classes. Mais de um membro em cada classe foi caracterizado em termos de suas propriedades moleculares em relação à ligação ao cromóforo, espectro de absorção, fotorrecepção e ativação de proteínas G (TERAKITA, 2014). As opsinas GPCRs regulam os níveis intracelulares de GMP e/ou ativam a cascata de fosfoinositídeo a partir de sinais fotorreceptores. Sua função é frequentemente classificada como visual ou não visual, uma vez que estes receptores são também encontrados em tecidos não visuais. Um estudo recente observou que a luz azul induz vasorelaxamento em artérias pulmonares de ratos e em células do músculo liso da artéria pulmonar mediado pela OPN3 e OPN4. Nos animais *Opn4*^{-/-} e nocautes para *Opn3*, o fotorrelaxamento da artéria pulmonar foi atenuado (ORTIZ et al., 2017). Outro estudo demonstrou que a OPN3 está intimamente envolvida na resposta à luz do relógio no tecido adiposo. A luz azul foi capaz de regular, significativamente, o crescimento e o metabolismo neonatal em camundongos, através da fotorrecepção no tecido adiposo, via OPN3. A perda dessa opsina resultou na modificação da composição celular de gordura e comprometimento da termogênese sob desafio de frio (VEMARAJU et al., 2018).

Considerando essas duas importantes constatações (quais sejam: a percepção de luz pelas opsinas induzindo o vasorelaxamento em artérias pulmonares e regulando o relógio e o balanço energético de adipócitos), pode-se especular que as opsinas estejam atuando como fotorreceptores em órgãos não visuais com o propósito de ajustarem a maquinaria do relógio e o metabolismo do órgão ou tecido em questão, no nosso caso, o coração. Até o momento não

há estudos que confirmem essa hipótese. Além disso, seria interessante especular a possibilidade das opsinas poderem atuar em consonância para ajustar o relógio e o metabolismo local e do próprio coração, visto que elas são mais expressas no átrio em relação ao ventrículo. Relação semelhante existe com o mecanismo de controle da pressão arterial. Visto que existem receptores de baixa pressão, denominados mecanorreceptores, localizados nas paredes dos átrio, que quando ativados proporcionam alterações reflexas imediatas para ajustar a pressão arterial. Outro mecanismo fisiológico que tem seu início no átrio é o batimento cardíaco, iniciado pela geração de um potencial de ação no nodo sinusal, localizado na parede lateral superior do átrio direito (BISHOP; MALLIANI; THORÉN, 2011).

Os modelos de estudo *in vitro*, cultura de células, tornaram-se um modelo valioso para o estudo de relógios periféricos. Quando em cultura, cada célula exibe oscilações autônomas dos genes do relógio, mas sem um estímulo ou pista ambiental, as células permanecem dessincronizadas (BALSALOBRE et al., 2000). O choque de soro tem demonstrado induzir a ritmicidade na expressão dos genes do relógio. O soro pode ser considerado como um *zeitgeber* para os cardiomiócitos, visto que na composição há diversos fatores que demonstram atuar como *zeitgebers* para o relógio de outros tipos de células (BALSALOBRE, 2000; NONAKA et al., 2001). Logo, em nosso estudo, houve uma tendência que poderia nos indicar a sincronização do relógio pelo choque de soro, visto que os genes do relógio apresentaram um padrão de oscilação, embora o n amostral tenha sido unitário.

No estudo *in vitro* com cultura primária de cardiomiócitos foi observado que o ácido palmítico é capaz de prejudicar a função do relógio molecular. Essa observação foi feita em prévios estudos que mostram o efeito supressor do ácido palmítico na expressão dos genes do relógio em cultura de hepatócitos (TONG et al., 2015; TAL et al., 2019), destacando que este ácido graxo reprime os genes do relógio em múltiplos tipos de células embora o mecanismo de ação possa ser diferente. No caso dos cardiomiócitos do presente estudo, os resultados obtidos apontam que o ácido palmítico pode ter comprometido as oscilações dos genes do relógio.

Em um estudo realizado por Durgan e col. (2006), foi observado que ao suplementar cardiomiócitos com meio sem soro, há a atenuação na oscilação dos genes do relógio. Porém, após o desafio agudo (2hs) com altas concentrações de soro (50% FCS), as culturas foram capazes de reestabelecer significativamente a expressão rítmica dos genes do relógio avaliados. Já em outro estudo realizado em 2014, pelo grupo de Chen e colaboradores, constatou-se que o choque de soro também resulta em uma robusta oscilação dos genes do relógio, porém tais expressões rítmicas foram comprometidas ao incubar as células com meio

contendo 0,4 mM de conjugado BSA/ácido graxo (ácido oléico e ácido palmítico com razão de 1:1). O conjugado de ácidos graxos diminuiu a expressão dos genes do relógio, *Bmal1*, *Clock* e *Dbp*, de forma tempo-dependente, ou seja, quanto mais tempo expostos aos ácidos graxos, menor foi a expressão; assim como também de forma dose-dependente, altas concentrações atenuaram a oscilação do relógio.

Neste estudo, não foi observado a relação tempo-dependente. As células suplementadas com DMEM acrescido de ácido palmítico apresentaram alta expressão do gene *Bmal1* com mais tempo de exposição ao ácido palmítico. O perfil de expressão observado para o gene *Per1* apontou alta expressão 2 horas após o tratamento com ácido palmítico. Em função desses achados, serão necessários mais estudos para compreender a influência do ácido palmítico nos genes do relógio, devido ao fato de que até o momento tivemos a oportunidade de realizar esse ensaio apenas uma vez.

Evidências na literatura mostram que em explantes cardíacos o pico de expressão de genes do relógio, como *Bmal1* é no ~ZT2, *Rev-erba/β* no ZT7, *Dbp* no ZT11 e *Per2* no ZT15 é muito similar ao observado em cultura de cardiomiócitos (DURGAN et al., 2006).

Em suma, no estudo *in vitro* com cultura de células, foi possível observar perfis de níveis de expressão distintos para os genes *Per1* e *Bmal1* no grupo controle e hiperlipídicos, porém não se pode afirmar uma significância para esses achados. Logo, são necessários a realização de novos ensaios pela equipe que possam contribuir para a literatura.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os dados apresentados nesse trabalho permitem concluir que o canal TRPV1 participa da regulação do sistema circadiano cardíaco. Além disso, existe um cross-talk entre os canais os genes do relógio e os canais TRPV1, possivelmente, pode estar envolvido na sinalização dos genes do relógio no coração.

Embora a expressão da melanopsina não tenha apresentado diferenças no seu nível de expressão nas cavidades do coração. Acredita-se que os resultados deste estudo tenham contribuído para hipótese de que oscilações de temperatura na corrente sanguínea são percebidas pelo coração através da melanopsina e/ou dos canais TRP, altamente expressos neste órgão, desencadeando uma via de sinalização que estimularia a expressão e liberação de seus principais hormônios NPs, entre outras possibilidades, para estimular a termogênese no tecido adiposo entre outros tecidos. Verificou-se também que outras opsinas, *Opn1* e *Opn2* são mais expressas no átrio de camundongos C57BL/6J.

Em suma, os achados com explantes cardíacos contribuem de forma significativa para o conhecimento em fisiologia e o cerne molecular, além da relação entre os canais TRP, as opsinas e os genes do relógio.

Com esses resultados, aponta-se a necessidade de investigar a detecção de temperatura, o relógio local e os processos canônicos em cultura primária de cardiomiócitos e adipócitos oriundos de animais selvagens, com uso de antagonistas de canais TRP e OPN4, e nocautes para *Opn4*, *TrpA1*, *TrpV1* e *TrpM8* frente a diferentes temperaturas.

REFERÊNCIAS

ABUSHOUK, A. I.; EL-HUSSENY, M. W. Ahmed; BAHBAH, E. I.; ELMARAEZY, A.; ALI, A. A.; ASHRAF, A.; ABDEL-DAIM, M. M.. Peroxisome proliferator-activated receptors as therapeutic targets for heart failure. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 95, p. 692-700, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.083>.

ADDARIO, C.; MILANESI, G.; VACCARONE, R.; BARNI, S.; GERZELI, G.; FENOGLIO, C.. Expression of atrial natriuretic peptide in the heart of active and hibernating frog. **Italian Journal Of Zoology**, [S.L.], v. 71, n. 2, p. 69-72, jan. 2004. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/11250000409356609>.

AKASHI, M.; MATSUMURA, R.; MATSUO, T.; KUBO, Y.; KOMODA, H.; NODE, K.. Hypercholesterolemia Causes Circadian Dysfunction: a potential risk factor for cardiovascular disease. **Ebiomedicine**, [S.L.], v. 20, p. 127-136, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.04.034>.

ANDREI, S. R.; SINHAROY, P.; BRATZ, I. N.; DAMRON, D. S.. TRPA1 is functionally co-expressed with TRPV1 in cardiac muscle: co-localization at z-discs, costameres and intercalated discs. **Channels**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 395-409, 4 maio 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19336950.2016.1185579>

ANDO, H.; TAKAMURA, T.; MATSUZAWA-NAGATA, N.; SHIMA, K. R.; NAKAMURA, S.; KUMAZAKI, M.; KURITA, S.; MISU, H.; TOGAWA, N.; FUKUSHIMA, T.. The hepatic circadian clock is preserved in a lipid-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 380, n. 3, p. 684-688, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.150>.

AOKI, A.; MALDONADO, C. A.; FORSSMANN, W. G.. Seasonal changes of the endocrine heart. **Functional Morphology Of The Endocrine Heart**, [s.l.], p.61-68, 1989. Steinkopff. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-72432-9_5.

ARBLE, D. M.; BASS, J.; LAPOSKY, A. D.; VITATERNA, M. H.; TUREK, F. W.. Circadian Timing of Food Intake Contributes to Weight Gain. **Obesity**, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 2100-2102, 3 set. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2009.264>.

BALSALOBRE, A.. Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling. **Science**, [s.l.], v. 289, n. 5488, p.2344-2347, 29 set. 2000. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.289.5488.2344>.

BARGUT, T. C. L.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.. Brown adipose tissue: Updates in cellular and molecular biology. **Tissue And Cell**, [s.l.], v. 48, n. 5, p.452-460, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2016.08.001>.

BASS, J.; TAKAHASHI, J. S.. Circadian Integration of Metabolism and Energetics. *Science*, [S.L.], v. 330, n. 6009, p. 1349-1354, 2 dez. 2010. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1195027>.

BEVAN, S.; QUALLO, T.; ANDERSSON, D. A. TRPV1. **Handbook Of Experimental Pharmacology**, [s.l.], p.207-245, 2014. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_9.

BERSON, D. M.. Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, [s.l.], v. 295, n. 5557, p.1070-1073, 8 fev. 2002. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1067262>.

BISHOP, V. S.; MALLIANI, A.; THORÉN, P.. Cardiac Mechanoreceptors. **Comprehensive Physiology**, [s.l.], p.497-555, jan. 2011. John Wiley & Sons, Inc.. <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.cp020315>.

BLACKSHAW, S.; SNYDER, S. H.. Encephalopsin: A Novel Mammalian Extraretinal Opsin Discretely Localized in the Brain. **The Journal Of Neuroscience**, [s.l.], v. 19, n. 10, p.3681-3690, 15 maio 1999. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.19-10-03681.1999>.

BORDICCHIA, M.; LIU, D.; AMRI, E.; AILHAUD, G.; DESSÌ-FULGHERI, P.; ZHANG, C.; TAKAHASHI, N.; SARZANI, R.; COLLINS, S.. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 122, n. 3, p. 1022-1036, 1 mar. 2012. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci59701>.

BRAY, M. S.; YOUNG, M. E.. Diurnal variations in myocardial metabolism. **Cardiovascular Research**, [S.L.], v. 79, n. 2, p. 228-237, 30 abr. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvn054>.

BRAY, M. S.; SHAW, C. A.; MOORE, Mi. W. S.; GARCIA, R. A. P.; ZANQUETTA, M. M.; DURGAN, D. J.; JEONG, W. J.; TSAI, J.; BUGGER, H.; ZHANG, D.. Disruption of the circadian clock within the cardiomyocyte influences myocardial contractile function, metabolism, and gene expression. **American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology**, [S.L.], v. 294, n. 2, p. 1036-1047, fev. 2008. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.01291.2007>.

BROWN, S. A.; AZZI, A. Peripheral Circadian Oscillators in Mammals. **Circadian Clocks**, [s.l.], p.45-66, 2013. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0_3.

BUHR, E. D.; YOO, S.-h.; TAKAHASHI, J. S.. Temperature as a Universal Resetting Cue for Mammalian Circadian Oscillators. **Science**, [s.l.], v. 330, n. 6002, p.379-385, 14 out. 2010. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1195262>.

CHEN, L.; YANG, G. PPARs Integrate the Mammalian Clock and Energy Metabolism. **Ppar Research**, [s.l.], v. 2014, p.1-6, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/653017>.

CHENG, L.; DING, G.; QIN, Q.; HUANG, Y.; LEWIS, W.; HE, N.; EVANS, R. M; SCHNEIDER, M. D; A BRAKO, F.; XIAO, Y.. Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor- δ deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 10, n. 11, p. 1245-1250, 10 out. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1116>.

CHEN, M.; XIN, J.; LIU, B.i; LUO, L.; LI, J.; YIN, W.; LI, M.. Mitogen-Activated Protein Kinase and Intracellular Polyamine Signaling Is Involved in TRPV1 Activation-Induced Cardiac Hypertrophy. **Journal Of The American Heart Association**, [S.L.], v. 5, n. 8, p. 1-15, 8 ago. 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/jaha.116.003718>.

COUÉ, M.; MORO, C.. Natriuretic peptide control of energy balance and glucose homeostasis. **Biochimie**, [s.l.], v. 124, p.84-91, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.05.017>.

DALLMANN, R.; WEAVER, D.R. Altered Body Mass Regulation in Male mPeriod Mutant Mice on High-Fat Diet. **Chronobiology International**, [s.l.], v. 27, n. 6, p.1317-1328, jul. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/07420528.2010.489166>.

DALLMANN, R.; TOUMA, C.; PALME, R.; ALBRECHT, U.; STEINLECHNER, S.. Impaired daily glucocorticoid rhythm in Per1 Brd mice. **Journal Of Comparative Physiology A**, [S.L.], v. 192, n. 7, p. 769-775, 28 fev. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00359-006-0114-9>.

DASHTI, H. S; MERINO, J.; LANE, J. M; SONG, Y.; SMITH, C. E.; TANAKA, T.; MCKEOWN, N. M.; TUCKER, C.; SUN, D.; BARTZ, T. M. Genome-wide association study of breakfast skipping links clock regulation with food timing. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 110, n. 2, p. 473-484, 13 jun. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/nqz076>.

DAVIES, W. I.L.; TAMAI, T. K.; ZHENG, L.; FU, J. K.; RIHEL, J.; FOSTER, R. G.; WHITMORE, D.; HANKINS, M. W.. An extended family of novel vertebrate photopigments is widely expressed and displays a diversity of function. **Genome Research**, [S.L.], v. 25, n. 11, p. 1666-1679, 8 out. 2015. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.189886.115>.

DE ASSIS, L. V. M.; MORAES, M. N.; CASTRUCCI, A. M. d. L. Heat shock antagonizes UVA-induced responses in murine melanocytes and melanoma cells: an unexpected interaction. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.L.], v. 16, n. 5, p. 633-648, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6pp00330c>.

DE BOLD, A.J.; BORENSTEIN, H.B.; VERESS, A.T.; SONNENBERG, H.. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sciences**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 89-94, jan. 1981. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205\(81\)90370-2](http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205(81)90370-2).

DÍAZ, N. M.; MORERA, L. P.; GUIDO, M. E.. Melanopsin and the Non-visual Photochemistry in the Inner Retina of Vertebrates. **Photochemistry And Photobiology**, [s.l.], v. 92, n. 1, p.29-44, 15 dez. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/php.12545>.

DURGAN, D. J.; MOORE, M. W. S.; HA, N. P.; EGBEJIMI, O.; FIELDS, A.; MBAWUIKE, U.; EGBEJIMI, A.; SHAW, C. A.; BRAY, M. S.; NANNEGARI, V.. Circadian rhythms in myocardial metabolism and contractile function: influence of workload and oleate. **American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology**, [S.L.], v. 293, n. 4, p. 2385-2393, out. 2007. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.01361.2006>.

DURGAN, D. J.; TREXLER, N. A.; EGBEJIMI, O.; MCELFRISH, T. A.; SUK, H. Y.; PETTERSON, L. E.; SHAW, C. A.; HARDIN, P. E.; BRAY, M. S.; CHANDLER, M. P.. The Circadian Clock within the Cardiomyocyte Is Essential for Responsiveness of the Heart to Fatty Acids. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 281, n. 34, p. 24254-24269, 22 jun. 2006. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m601704200>.

ECKEL-MAHAN, K. L.; PATEL, V. R.; DE€MATEO, S.; OROZCO-SOLIS, R.; CEGLIA, N. J.; SAHAR, S.; DILAG-PENILLA, S. A.; DYAR, K. A.; BALDI, P.; SASSONE-CORSI, P.. Reprogramming of the Circadian Clock by Nutritional Challenge. **Cell**, [S.L.], v. 155, n. 7, p. 1464-1478, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.034>.

FALCÓN, D.; GALEANO-OTERO, I.; CALDERÓN-SÁNCHEZ, E.; TORO, R. d.; MARTÍN-BÓRNEZ, M.; ROSADO, J. A.; HMADCHA, A.; SMANI, T.. TRP Channels: current perspectives in the adverse cardiac remodeling. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 10, p. 1-12, 1 mar. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2019.00159>.

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

FREICHEL, M.; BERLIN, M.; SCHÜRGER, A.; MATHAR, I.; BACMEISTER, L.; MEDERT, R.; FREDE, W.; MARX, A.; SEGIN, S.; LONDOÑO, J. E. C.. TRP Channels in the Heart. **Neurobiology Of Trp Channels**, [S.L.], p. 149-185, 9 ago. 2017. CRC Press. <http://dx.doi.org/10.4324/9781315152837-9>.

FUSE, Y.; HIRAO, A.; KURODA, H.; OTSUKA, M.; TAHARA, Y.; SHIBATA, S.. Differential roles of breakfast only (one meal per day) and a bigger breakfast with a small dinner (two meals per day) in mice fed a high-fat diet with regard to induced obesity and lipid metabolism. **Journal Of Circadian Rhythms**, [S.L.], v. 10, p. 4-10, 15 maio 2012. Ubiquity Press, Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1186/1740-3391-10-4>.

GAO, Y.; SONG, J.; CHEN, H.; CAO, C.; LEE, C.. TRPV1 activation is involved in the cardioprotection of remote limb ischemic postconditioning in ischemia-reperfusion injury rats. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 463, n. 4, p. 1034-1039, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.054>.

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

GEISS, G. K.; BUMGARNER, R. e; BIRDITT, B.; DAHL, T.; DOWIDAR, N.; DUNAWAY, D. L; FELL, H P.; FERREE, S.; GEORGE, R. D; GROGAN, T.. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 317-325, 17 fev. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1385>.

GOETZE, J. P.; GEORG, B.; JØRGENSEN, H. L.; FAHRENKRUG, J.. Chamber-dependent circadian expression of cardiac natriuretic peptides. **Regulatory Peptides**, [S.L.], v. 160, n. 1-3, p. 140-145, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2009.12.010>.

GRIEBEL, G.; RAVINET-TRILLOU, C.; BEESKÅ%, S.; AVENET, P.; PICHAT, P.. Mice Deficient in Cryptochrome 1 (Cry1^Δ) Exhibit Resistance to Obesity Induced by a High-Fat Diet. **Frontiers In Endocrinology**, [S.L.], v. 5, p. 1-6, 9 abr. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2014.00049>.

GRIMALDI, B.; BELLET, M. M.; KATADA, S.; ASTARITA, G.; HIRAYAMA, J.; AMIN, R. H.; GRANNEMAN, J. G.; PIOMELLI, D.; LEFF, T.; SASSONE-CORSI, P.. PER2 Controls Lipid Metabolism by Direct Regulation of PPAR γ . **Cell Metabolism**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 509-520, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.10.005>.

GUO, Y.; STEIN, P. K. Circadian rhythm in the cardiovascular system: chronocardiology. **American Heart Journal**, [s.l.], v. 145, n. 5, p.779-786, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-8703\(02\)94797-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-8703(02)94797-6).

GUPTA, D. K.; WANG, Thomas J.. Natriuretic Peptides and Cardiometabolic Health. **Circulation Journal**, [s.l.], v. 79, n. 8, p.1647-1655, 2015. Japanese Circulation Society. <http://dx.doi.org/10.1253/circj.cj-15-0589>.

HARDELAND, R.. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. **Biofactors**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 183-192, mar. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.23>.

HARDELAND, R.; CARDINALI, D. P.; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D. W.; BROWN, G. M.; PANDI-PERUMAL, S. R.. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress In Neurobiology**, [S.L.], v. 93, n. 3, p. 350-384, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.12.004>.

HEMMERYCKX, B.; HIMMELREICH, U.; HOYLAERTS, M. F.; LIJNEN, H. R.. Impact of Clock Gene Bmal1 Deficiency on Nutritionally Induced Obesity in Mice. **Obesity**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 659-661, 28 out. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2010.266>.

HIROTA, T.; LEE, J. W.; JOHN, P. C. St.; SAWA, M.; IWASAKO, K.; NOGUCHI, T.; PONGSAWAKUL, P. Y.; SONNTAG, T.; WELSH, D. K.; BRENNER, D. A.. Identification of Small Molecule Activators of Cryptochrome. **Science**, [S.L.], v. 337, n. 6098, p. 1094-1097, 12 jul. 2012. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1223710>.

HODES, A.; LICHTSTEIN, D.. Natriuretic Hormones in Brain Function. **Frontiers In Endocrinology**, [s.l.], v. 5, p.1-13, 28 nov. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2014.00201>.

HONMA, S. The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm. **The Journal Of Physiological Sciences**, [s.l.], v. 68, n. 3, p.207-219, 19 fev. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12576-018-0597-5>.

HORTON, J. S.; SHIRAISHI, T.; ALFULAIJ, N.; SMALL-HOWARD, A. L.; TURNER, H. C.; KUROKAWA, T.; MORI, Y.; STOKES, A. J.. TRPV1 is a component of the atrial natriuretic signaling complex, and using orally delivered antagonists, presents a valid therapeutic target in the longitudinal reversal and treatment of cardiac hypertrophy and heart failure. **Channels**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-16, 12 dez. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19336950.2018.1547611>.

HSIEH, M-C; YANG, S-C; TSENG, H-L; HWANG, L-L; CHEN, C-T; SHIEH, K-R. Abnormal expressions of circadian-clock and circadian clock-controlled genes in the livers and kidneys of long-term, high-fat-diet-treated mice. **International Journal Of Obesity**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 227-239, 10 nov. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2009.228>.

HUBER, A. H.; KAMPF, J. P.; KWAN, T.; ZHU, B.; KLEINFELD, A. M.. Fatty Acid-Specific Fluorescent Probes and Their Use in Resolving Mixtures of Unbound Free Fatty Acids in Equilibrium with Albumin†. **Biochemistry**, [S.L.], v. 45, n. 48, p. 14263-14274, dez. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi060703e>

HUGHES, S; A JAGANNATH,; RODGERS, J; HANKINS, M W; PEIRSON, S N; FOSTER, R G. Signalling by melanopsin (OPN4) expressing photosensitive retinal ganglion cells. **Eye**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 247-254, 15 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/eye.2015.264>.

HUSSE, J.; EICHELE, G.; OSTER, H. Synchronization of the mammalian circadian timing system: Light can control peripheral clocks independently of the SCN clock. **Bioessays**, [s.l.], v. 37, n. 10, p.1119-1128, 7 ago. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201500026>.

IKEDA, Hi.; YONG, Q.; KUROSE, T.; TODO, T.; MIZUNOYA, W.; FUSHIKI, T.; SEINO, Y.; YAMADA, Y.. Clock gene defect disrupts light-dependency of autonomic nerve activity. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 364, n. 3, p. 457-463, dez. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.058>.

ISOLDI, M. C.; ROLLAG, M. D.; CASTRUCCI, A. M. D. L.; PROVENCIO, I. Rhabdomic phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 102, n. 4, p. 1217-1221, 14 jan. 2005. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409252102>.

KLÖTING, I.; BAHR, J.; WILKE, B.; LANGE, J.. Light rhythm and diet differently influence facets of the metabolic syndrome in WOKW rats. **Laboratory Animals**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 31-35, jan. 2013. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1258/la.2012.011095>.

KOHSAKA, A.; LAPOSKY, A. D.; RAMSEY, K. M.; ESTRADA, C.; JOSHU, C.; KOBAYASHI, Y.; TUREK, F. W.; BASS, J.. High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. **Cell Metabolism**, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 414-421, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2007.09.006>.

KOYANAGI, M.; TAKADA, E.; NAGATA, T.; TSUKAMOTO, H.; TERAOKA, A.. Homologs of vertebrate Opn3 potentially serve as a light sensor in nonphotoreceptive tissue. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 110, n. 13, p. 4998-5003, 11 mar. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1219416110>.

KUDO, T.; HORIKAWA, K.; SHIBATA, S.. Circadian Rhythms in the CNS and Peripheral Clock Disorders: the circadian clock and hyperlipidemia. **Journal Of Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 103, n. 2, p. 139-143, 2007. Japanese Pharmacological Society. <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.fmj06003x3>.

KUMBALASIRI, T.; ROLLAG, M. D.; ISOLDI, M. C.; CASTRUCCI, A. M. de Lauro; PROVENCIO, I. Melanopsin Triggers the Release of Internal Calcium Stores in Response to Light†. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 83, n. 2, p. 273-280, 27 fev. 2007. American Society for Photobiology. <http://dx.doi.org/10.1562/2006-07-11-ra-964>.

LAMIA, K. A.; PAPP, St. J.; YU, R. T.; BARISH, G. D.; UHLENHAUT, N. H.; JONKER, J. W.; DOWNES, M.; EVANS, R. M.. Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. **Nature**, [S.L.], v. 480, n. 7378, p. 552-556, dez. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10700>.

LEE, Y.; MONTELL, C.. Drosophila TRPA1 Functions in Temperature Control of Circadian Rhythm in Pacemaker Neurons. **Journal Of Neuroscience**, [s.l.], v. 33, n. 16, p.6716-6725, 17 abr. 2013. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.4237-12.2013>.

LEIBETSEDER, V.; HUMPELER, S.; SVOBODA, M.; SCHMID, D.; THALHAMMER, T.; ZUCKERMANN, A.; MARKTL, W.; EKMEKCIOGLU, C.. Clock Genes Display Rhythmic Expression in Human Hearts. **Chronobiology International**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 621-636, jan. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07420520902924939>.

LEMMER, B.. Signal Transduction and Chronopharmacology of Regulation of Circadian Cardiovascular Rhythms in Animal Models of Human Hypertension. **Heart Failure Clinics**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 739-757, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hfc.2017.05.009>.

LEROY, C.; TRICOT, S.; LACOUR, B.; GRYNBERG, A.. Protective effect of eicosapentaenoic acid on palmitate-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [S.L.], v. 1781, n. 11-12, p. 685-693, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.07.009>.

LEVI, F.; SCHIBLER, U.. Circadian Rhythms: mechanisms and therapeutic implications. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 593-628, fev. 2007. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105208>.

LIAO, M.; CAO, E.; JULIUS, D.; CHENG, Y.. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. **Nature**, [S.L.], v. 504, n. 7478, p. 107-112, dez. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12822>.

LIZIER, M.; BOMBA, L.; MINUTI, A.; CHEGDANI, F.; CAPRARO, J.; TONDELLI, B.; MAZZA, R.; CALLEGARI, M. L.; TREVISI, E.; ROSSI, F.. The nutrigenomic investigation of C57BL/6N mice fed a short-term high-fat diet highlights early changes in clock genes expression. **Genes & Nutrition**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 465-474, 16 abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12263-013-0344-8>.

LOPASCHUK, G. D.; BELKE, D. D.; GAMBLE, J.; TOSHIYUKI, I.; SCHÖNEKESS, B. O.. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Lipids And Lipid Metabolism**, [S.L.], v. 1213, n. 3, p. 263-276, ago. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)00082-4](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760(94)00082-4).

LUCHETTI, F.; CANONICO, B.; BETTI, M.; ARCANGELETTI, M.; PILOLLI, F.; PIRODDI, M.; CANESI, L.; PAPA, S.; GALLI, F.. Melatonin signaling and cell protection function. **The Faseb Journal**, [S.L.], v. 24, n. 10, p. 3603-3624, 9 jun. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.10-154450>.

LUU, B. E.; TESSIER, S. N.; DUFORD, D. L.; STOREY, K. B.. The Regulation of Troponins I, C and ANP by GATA4 and Nkx2-5 in Heart of Hibernating Thirteen-Lined Ground Squirrels, *Ictidomys tridecemlineatus*. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 1-19, 13 fev. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0117747>.

MARQUES, M. D. *et al.* Adaptação temporal. In: *Cronobiologia: Princípios e aplicações*. São Paulo: EDUSP. p.55-97, 2003.

MARTINO, T.; ARAB, S.; STRAUME, M.; BELSHAM, D. D.; TATA, N.; CAI, Fang; LIU, P.r; TRIVIERI, M.; RALPH, M.; SOLE, M. J.. Day/night rhythms in gene expression of the normal murine heart. **Journal Of Molecular Medicine**, [S.L.], v. 82, n. 4, p. 256-264, 1 abr. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-003-0520-1>.

MARTINO, T. A.; YOUNG, M. E.. Influence of the Cardiomyocyte Circadian Clock on Cardiac Physiology and Pathophysiology. **Journal Of Biological Rhythms**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.183-205, 22 mar. 2015. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0748730415575246>.

MASINI, M. A.; STURLA, M.; PISANO, E.; KOUBBI, P.; CORADEGHINI, R.; UVA, B. M.. Atrial Natriuretic Peptides in Antarctic Fish. **Fishes Of Antarctica**, [S.L.], p. 215-224, 1998. Springer Milan. http://dx.doi.org/10.1007/978-88-470-2157-0_19.

MENDOZA, J.; PÉVET, P.; CHALLET, E.. High-fat feeding alters the clock synchronization to light. **The Journal Of Physiology**, [s.l.], v. 586, n. 24, p.5901-5910, 12 dez. 2008. Wiley-Blackwell . <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2008.159566>.

MILAGRO, F. I.; GÓMEZ-ABELLÁN, P.; CAMPIÓN, J.; MARTÍNEZ, J. A.; ORDOVÁS, J. M.; GARAULET, M.. CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA Methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake. **Chronobiology International**, [S.L.], v. 29, n. 9, p. 1180-1194, 24 set. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/07420528.2012.719967>.

MORAES, M. N.; ASSIS, L. V. M. d.; MAGALHÃES-MARQUES, K. K.; POLETINI, M. O.; LIMA, L. H. R. G. d.; CASTRUCCI, A. M. d. L.. Melanopsin, a Canonical Light Receptor, Mediates Thermal Activation of Clock Genes. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-9, 25 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-13939-3>.

MORO, C.. Natriuretic peptides and fat metabolism. **Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care**, [s.l.], v. 16, n. 6, p.645-649, nov. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mco.0b013e32836510ed>.

NAKAGAWA, Y.; NISHIKIMI, T.; KUWAHARA, K. Atrial and brain natriuretic peptides: Hormones secreted from the heart. **Peptides**, [s.l.], v. 111, p.18-25, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2018.05.012>.

NISSILÄ, J.; MÄNTTÄRI, S.; SÄRKIOJA, T.; TUOMINEN, H.; TAKALA, T.; TIMONEN, M.; SAARELA, S.. Enkephalopsin (OPN3) protein abundance in the adult mouse brain. **Journal Of Comparative Physiology A**, [S.L.], v. 198, n. 11, p. 833-839, 19 set. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00359-012-0754-x>.

NEDERGAARD, J.; PETROVIC, N.; LINDGREN, E. M.; JACOBSSON, A.; CANNON, Barbara. PPAR γ in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Basis Of Disease*, [s.l.], v. 1740, n. 2, p. 293-304, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.02.003>.

NONAKA, H.; EMOTO, N.; IKEDA, K.; FUKUYA, H.; ROHMAN, M. S.; RAHARJO, S. B.; YAGITA, K.; OKAMURA, H.; YOKOYAMA, M.. Angiotensin II Induces Circadian Gene Expression of Clock Genes in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. **Circulation**, [S.L.], v. 104, n. 15, p. 1746-1748, 9 out. 2001. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/hc4001.098048>.

OGURI, G.; NAKAJIMA, T.; YAMAMOTO, Y.; TAKANO, N.; TANAKA, T.; KIKUCHI, H.; MORITA, T.; NAKAMURA, F.; YAMASOBA, T.; KOMURO, I.. Effects of methylglyoxal on human cardiac fibroblast: roles of transient receptor potential ankyrin 1 (trpa1) channels. **American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology**,

[S.L.], v. 307, n. 9, p. 1339-1352, 1 nov. 2014. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.01021.2013>.

OLINSKI, L. E.; LIN, E. M.; OANCEA, E.. Illuminating insights into opsin 3 function in the skin. **Advances In Biological Regulation**, [s.l.], p.1-33, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbior.2019.100668>.

ORTIZ, S. B.; HORI, D.; NOMURA, Y.; YUN, X.; JIANG, H.; YONG, H.; CHEN, J.; PAEK, S.; PANDEY, D.; SIKKA, G.. 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**, [S.L.], v. 314, n. 1, p. 93-106, 1 jan. 2018. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00091.2017>.

ÖZTOP, M.; ÖZBEK, M.; LIMAN, N.; BEYAZ, F.; ERGÜN, E.; ERGÜN, L.. Localization profiles of natriuretic peptides in hearts of pre-hibernating and hibernating Anatolian ground squirrels (*Spermophilus xanthoprimum*). **Veterinary Research Communications**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 45-65, 28 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-019-9745-5>.

PALMER, B. F.; CLEGG, D. J.. An Emerging Role of Natriuretic Peptides. **Mayo Clinic Proceedings**, [s.l.], v. 90, n. 12, p.1666-1678, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.08.006>.

PAN, X.; JIANG, X.-c.; HUSSAIN, M. M.. Impaired Cholesterol Metabolism and Enhanced Atherosclerosis in Clock Mutant Mice. **Circulation**, [s.l.], v. 128, n. 16, p.1758-1769, 6 set. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.113.002885>.

PATIL, M. J.; JESKE, N. A.; AKOPIAN, A. N.. Transient receptor potential V1 regulates activation and modulation of transient receptor potential A1 by Ca²⁺. **Neuroscience**, [s.l.], v. 171, n. 4, p.1109-1119, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.031>.

PAZIENZA, V.; POMARA, C.; CAPPELLO, F.; CALOGERO, R.; CARRARA, M.; MAZZOCOLI, G.; VINCIGUERRA, M.. The TRPA1 channel is a cardiac target of mIGF-1/SIRT1 signaling. **American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology**, [S.L.], v. 307, n. 7, p. 939-944, 1 out. 2014. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00150.2014>.

PEEK, C. B.; RAMSEY, K. M.; MARCHEVA, B.; BASS, J.. Nutrient sensing and the circadian clock. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 23, n. 7, p. 312-318, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2012.02.003>.

PEINADO, G.; OSORNO, T.; GOMEZ, M. d. P.; NASI, E.. Calcium activates the light-dependent conductance in melanopsin-expressing photoreceptors of amphioxus. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 112, n. 25, p. 7845-7850, 8 jun. 2015. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1420265112>.

PENNA-DE-CARVALHO, A.; GRAUS-NUNES, F.; RABELO-ANDRADE, J.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; SOUZA-MELLO, V.. Enhanced pan-peroxisome proliferator-activated receptor gene and protein expression in adipose tissue of diet-induced obese mice treated with telmisartan. **Experimental Physiology**, [S.L.], v. 99, n. 12, p. 1663-1678, 13 nov. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2014.081596>.

PÉREZ-CEREZALES, S.; BORYSHPOLETS, S.; AFANZAR, O.; BRANDIS, A. NEVO, R.; KISS, V.; EISENBACH, M.. Involvement of opsins in mammalian sperm thermotaxis. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-10, 5 nov. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep16146>.

PERTUSA, M.; MOLDENHAUER, H.; BRAUCHI, S.; LATORRE, R.; MADRID, R.; ORIO, P.. Mutagenesis and Temperature-Sensitive Little Machines. **Mutagenesis**, [S.L.], p. 221-246, 17 ago. 2012. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/50333>.

PITTENDRIGH, C. S.. Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems. **Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology**, [S.L.], v. 25, p. 159-184, 1 jan. 1960. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/sqb.1960.025.01.015>.

PITTENDRIGH, C S. Temporal Organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. **Annual Review Of Physiology**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.17-54, out. 1993. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ph.55.030193.000313>.

POLETINI, M. O; MORAES, M. N.; RAMOS, B. C.; JERÔNIMO, R.; CASTRUCCI, A. M. d. L.. TRP channels: a missing bond in the entrainment mechanism of peripheral clocks throughout evolution. **Temperature**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 522-534, 2 out. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/23328940.2015.1115803>.

RACHID, T. L.; PENNA-DE-CARVALHO, A.; BRINGHENTI, I.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; SOUZA-MELLO, Va.. PPAR- α agonist elicits metabolically active brown adipocytes and weight loss in diet-induced obese mice. **Cell Biochemistry And Function**, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 249-256, 11 maio 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.3111>.

RAMSEY, I. S.; DELLING, M.; CLAPHAM, D. E.. AN INTRODUCTION TO TRP CHANNELS. **Annual Review Of Physiology**, [s.l.], v. 68, n. 1, p.619-647, jan. 2006. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431>.

RANDALL, A. S.; LIU, C.-H.; CHU, B.; ZHANG, Q.; DONGRE, S. A.; JUUSOLA, M.; FRANZE, K.; WAKELAM, M. J. O.; HARDIE, R. C.. Speed and Sensitivity of Phototransduction in *Drosophila* Depend on Degree of Saturation of Membrane Phospholipids. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 35, n. 6, p. 2731-2746, 11 fev. 2015. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1150-14.2015>.

RANDHAWA, P. K.; JAGGI, A. S. TRPV1 channels in cardiovascular system: A double edged sword? **International Journal Of Cardiology**, [s.l.], v. 228, p.103-113, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.11.205>.

REILLY, D. F.; WESTGATE, E. J.; FITZGERALD, G. A.. Peripheral Circadian Clocks in the Vasculature. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, [S.L.], v. 27, n. 8, p. 1694-1705, ago. 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.107.144923>.

RIEHLE, C.; ABEL, E. D.. PGC-1 Proteins and Heart Failure. **Trends In Cardiovascular Medicine**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.98-105, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2012.07.003>.

ROY, D.; LEVI, K.; KISS, V.; NEVO, R.; EISENBACH, M.. Rhodopsin and melanopsin coexist in mammalian sperm cells and activate different signaling pathways for thermotaxis. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, 10 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-56846-5>.

RYDÉN, M; BÄCKDAHL, J; PETRUS, P; A THORELL,; GAO, H; COUE, M; LANGIN, D; MORO, C; ARNER, P. Impaired atrial natriuretic peptide-mediated lipolysis in obesity. **International Journal Of Obesity**, [S.L.], v. 40, n. 4, p. 714-720, 26 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2015.222>.

SHEN, W. L.; KWON, Y.; ADEGBOLA, A. A.; LUO, J.; CHESS, A.; MONTELL, C.. Function of Rhodopsin in Temperature Discrimination in *Drosophila*. *Science*, [S.L.], v. 331, n. 6022, p. 1333-1336, 10 mar. 2011. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1198904>.

SHIMBA, S.; OGAWA, T.; HITOSUGI, S.; ICHIHASHI, Y.; NAKADAIRA, Y.; KOBAYASHI, Mu.; TEZUKA, M.; KOSUGE, Y.; ISHIGE, K.; ITO, Y.. Deficient of a Clock Gene, Brain and Muscle Arnt-Like Protein-1 (BMAL1), Induces Dyslipidemia and Ectopic Fat Formation. **Plos One**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 1-10, 22 set. 2011. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025231>.

SHIMIZU, H.i; HANZAWA, F.; KIM, D.; SUN, S.; LAURENT, T.; UMEKI, M.; IKEDA, S.; MOCHIZUKI, S.; ODA, H.. Delayed first active-phase meal, a breakfast-skipping model, led to increased body weight and shifted the circadian oscillation of the hepatic clock and lipid metabolism-related genes in rats fed a high-fat diet. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 1-17, 31 out. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0206669>.

SIKKA, G.; HUSSMANN, G. P.; PANDEY, De.; CAO, S.; HORI, D.; PARK, J. T.; STEPPAN, J.; KIM, J. H.; BARODKA, V.; MYERS, A. C.. Melanopsin mediates light-dependent relaxation in blood vessels. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 111, n. 50, p. 17977-17982, 17 nov. 2014. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1420258111>.

STEINER, A. A.; TUREK, V. F.; ALMEIDA, M. C.; BURMEISTER, J. J.; OLIVEIRA, D. L.; ROBERTS, J. L.; BANNON, A. W.; NORMAN, M. H.; LOUIS, J.-C.; TREANOR, J. J. S.. Nonthermal Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channels in Abdominal Viscera Tonicly Inhibits Autonomic Cold-Defense Effectors. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 27, n. 28, p. 7459-7468, 11 jul. 2007. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1483-07.2007>.

STORCH, K.-F.; LIPAN, O.; LEYKIN, I.; VISWANATHAN, N.; DAVIS, F. C.; WONG, W. H.; WEITZ, C. J.. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. **Nature**, [S.L.], v. 417, n. 6884, p. 78-83, 21 abr. 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature744>.

TAKAHASHI, J. S.. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.164-179, 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.150>.

TAL, Y.; CHAPNIK, N.; FROY, O.. Non-obesogenic doses of fatty acids modulate the functionality of the circadian clock in the liver. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 76, n. 9, p.1795-1806, 29 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-019-03023-6>.

TARTTELIN, E. e; BELLINGHAM, J.; HANKINS, M.W; FOSTER, R. G; LUCAS, R.J. Neuropsin (Opn5): a novel opsin identified in mammalian neural tissue1. **Febs Letters**, [S.L.], v. 554, n. 3, p. 410-416, 27 out. 2003. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01212-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01212-2).

TERAKITA, A.; NAGATA, T.. Functional Properties of Opsins and their Contribution to Light-Sensing Physiology. **Zoological Science**, [s.l.], v. 31, n. 10, p.653-659, out. 2014. Zoological Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.2108/zs140094>.

TSAI, J.-Y.; KIENESBERGER, P. C.; PULINILKUNNIL, T.; SAILORS, M. H.; DURGAN, D. J.; VILLEGAS-MONTOYA, C.; JAHOR, A.; GONZALEZ, R.I; GARVEY, M. E.;

BOLAND, B.. Direct Regulation of Myocardial Triglyceride Metabolism by the Cardiomyocyte Circadian Clock. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 285, n. 5, p. 2918-2929, 25 nov. 2009. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m109.077800>.

TOMOTANI, B. M; A ODA, G.. Diurnos ou Noturnos? Discutindo padrões temporais de atividade. **Revista da Biologia**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.1-6, dez. 2012. Revista da Biologia, Reitoria da Universidade de Sao Paulo. <http://dx.doi.org/10.7594/revbio.09.03.01>.

TONG, X.; ZHANG, D.; ARTHURS, B.; LI, P.; DURUDOGAN, L.; GUPTA, N.; YIN, L.. Palmitate Inhibits SIRT1-Dependent BMAL1/CLOCK Interaction and Disrupts Circadian Gene Oscillations in Hepatocytes. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 1-20, 15 jun. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0130047>.

TUREK, F. W.. Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. **Science**, [s.l.], v. 308, n. 5724, p.1043-1045, 13 maio 2005. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1108750>.

VEMARAJU, S.; NAYAK, G.; BUHR, E. D.; ODAKA, Y.; ZHANG, K. X.; A MOCKO, J.; SMITH, A. N.; UPTON, B. A.; ZHAN, J. J.; BORRA, V. J.. An adipocyte light-Opin 3 pathway regulates the circadian clock and energy balance. **Biorxiv**, [S.L.], p. 1-29, 13 jul. 2018. Cold Spring Harbor Laboratory.

WEST, A. C.; BECHTOLD, D. A. The cost of circadian desynchrony: Evidence, insights and open questions. **Bioessays**, [s.l.], v. 37, n. 7, p.777-788, 22 maio 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201400173>.

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

WU, T.; JIN, Y.; NI, Y.; ZHANG, D.; KATO, H.; FU, Z.. Effects of light cues on re-entrainment of the food-dominated peripheral clocks in mammals. **Gene**, [S.L.], v. 419, n. 1-2, p. 27-34, ago. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2008.04.010>.

YAMAJUKU, D.; OKUBO, S.; HARUMA, To.; INAGAKI, T.; OKUDA, Y.; KOJIMA, T.; NOUTOMI, K.; HASHIMOTO, S.; ODA, H.. Regular Feeding Plays an Important Role in Cholesterol Homeostasis Through the Liver Circadian Clock. **Circulation Research**, [S.L.], v. 105, n. 6, p. 545-548, 11 set. 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.109.199034>.

YANAGIHARA, H.; ANDO, H.; HAYASHI, Y.; OBI, Y.; FUJIMURA, A.. High-Fat Feeding Exerts Minimal Effects on Rhythmic mRNA Expression of Clock Genes in Mouse

Peripheral Tissues. **Chronobiology International**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 905-914, jan. 2006. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07420520600827103>.

YANG, S.; SHIEH, K. Implications of Circadian Rhythms on Metabolic Disorders. **Tzu Chi Medical Journal**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.285-288, dez. 2009. Medknow. [http://dx.doi.org/10.1016/s1016-3190\(09\)60057-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1016-3190(09)60057-4).

YOUNG, M. E.; BREWER, R.A.; PELICIARI-GARCIA, R. A.; COLLINS, H. E.; HE, L.; BIRKY, T. L.; PEDEN, B. W.; THOMPSON, E. G.; AMMONS, B.-J.; BRAY, M. S.. Cardiomyocyte-Specific BMAL1 Plays Critical Roles in Metabolism, Signaling, and Maintenance of Contractile Function of the Heart. **Journal Of Biological Rhythms**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 257-276, ago. 2014. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0748730414543141>.

YOUNG, M. E.; RAZEGHI, P.; CEDARS, A. M.; GUTHRIE, P. H.; TAEGTMEYER, H.. Intrinsic Diurnal Variations in Cardiac Metabolism and Contractile Function. **Circulation Research**, [S.L.], v. 89, n. 12, p. 1199-1208, 7 dez. 2001. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/hh2401.100741>.

YOUNG, M. E.. Diurnal Variation in Cardiac Metabolism. **The Scientist's Guide To Cardiac Metabolism**, [s.l.], p.123-137, 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-802394-5.00009-1>.

YOUNG, M. E.. Temporal partitioning of cardiac metabolism by the cardiomyocyte circadian clock. **Experimental Physiology**, [S.L.], v. 101, n. 8, p. 1035-1039, 30 jul. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/ep085779>.

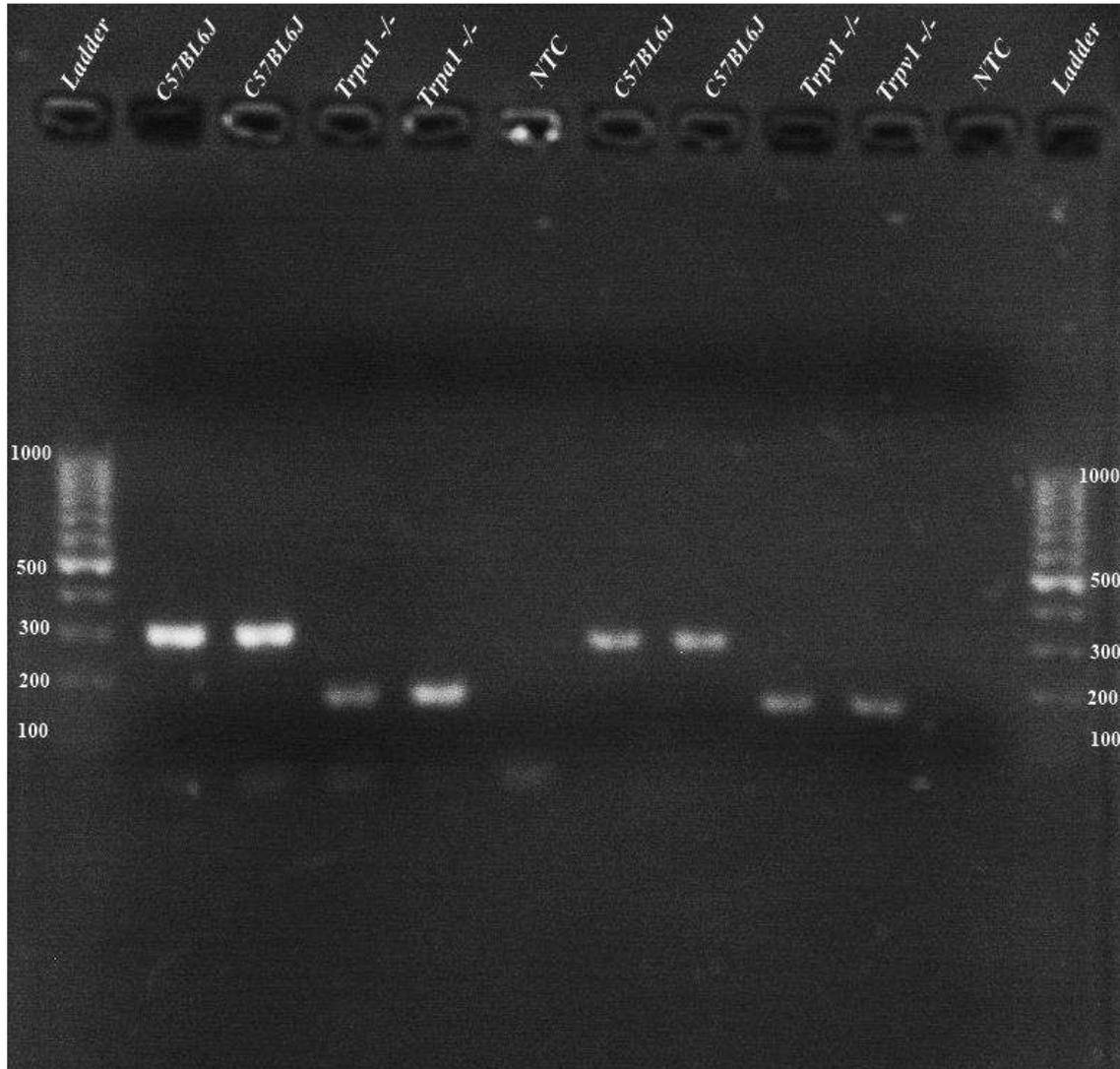
YUE, Z.; XIE, J.; YU, A. S.; STOCK, J.; DU, J.; YUE, L.. Role of TRP channels in the cardiovascular system. **American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology**, [S.L.], v. 308, n. 3, p. 157-182, 1 fev. 2015. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00457.2014>.

ZAHNER, M.R.; LI, D.-P.; CHEN, S.-R.; PAN, H.-L.. Cardiac vanilloid receptor 1-expressing afferent nerves and their role in the cardiogenic sympathetic reflex in rats. **The Journal Of Physiology**, [S.L.], v. 551, n. 2, p. 515-523, set. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2003.048207>.

ZHANG, E. e; LIU, Y.; DENTIN, R.; PONGSAWAKUL, P. y; LIU, A. C; HIROTA, T.; A NUSINOW, D.; SUN, X.; LANDAIS, S.; KODAMA, Y.. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 16, n. 10, p. 1152-1156, 19 set. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2214>.

ANEXOS

ANEXO A: VALIDAÇÃO DA GENOTIPAGEM (GEL)



Na validação da genotipagem (Gel) foi extraído o DNA dos animais e amplificados os fragmentos correspondentes ao TRPA1 e TRPV1 selvagem em ambos os casos próximos a 300 bp. A banda está suprimida e aparece um pouco menor (200 bp), referente à amplificação do cassete inserido durante a estratégia de nocauteamento.

ANEXO B: PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DO GENÓTIPO TRPV1 KO

22/08/2019

Master Protocol Details



[Return to Protocol Search](#)

Stock Number: 003770

Strain Name: B6.129X1-Trpv1^{tm1.Jul}/J

Allele: Trpv1^{tm1.Jul}

Protocol Name: Trpv1^{tm1.Jul}_Alternate 1

Method: Standard PCR

Version: 1.2

Created: 19-May -2017

Updated: 24-May -2017

Expected Results:

Mutant = 176 bp
Heterozygote = 176 bp and 289 bp
Wild type = 289 bp

Gel Image

Image	Image file
	View

Protocol Primers

Primer	5' Label	Sequence 5' → 3'	3' Label	Primer Type	Note
19922		TGG CTC ATA TTT GCC TTC AG		Wild type Forward	Reaction A
19923		CAG CCC TAG GAG TTG ATG GA		Common	Reaction A
oIMR1627		TAA AGC GCA TGC TCC AGA CT		Mutant Forward	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
19922	.5	uM
19923	.5	uM
oIMR1627	.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

This genotyping protocol is used for the following strains:

Stock Number	Strain Name
<u>003770</u>	B6.129X1-Trpv1 ^{tm1.Jul} /J

ANEXO C: PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DA GENÓTIPO TRPA1 KO

22/08/2019

Master Protocol Details



[Return to Protocol Search](#)

Stock Number: 006401

Strain Name: B6-129P-Trpa1^{tm1Kykwl}/J

Allele: Trpa1^{tm1Kykwl}

Protocol Name: Trpa1^{tm1Kykwl}

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

Image	Image file
	View

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

Cycling

Reaction Component	Final Concentration	Unit	Step #	Temp °C	Time	Note
ddH2O	up to final volume		1	94	2 min	
Kapa 2G HS buffer	1.3	X	2	94	20sec	
MgCl2	2.6	mM	3	65	15sec	-0.5 C per cycle decrease
dNTP KAPA	.26	mM	4	68	10sec	
oIMR8645	.5	uM	5			repeat steps 2-4 for 10 cycles (Touchdown)
oIMR8646	.5	uM	6	94	15sec	
oIMR9179	.5	uM	7	60	15sec	
oIMR9180	.5	uM	8	72	10sec	
Glycerol	6.5	%	9			repeat steps 6-8 for 28 cycles
Dye	1	X	10	72	2 min	
Kapa 2G HS taq polymerase	.03	U/ul	11	10		hold
DNA	50-200	ng				

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



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "OS EFEITOS DO MEIO HIPERLIPÍDICO NOS GENES DO RELÓGIO EM CULTURA DE CARDIOMIÓCITOS", protocolada sob o CEUA nº 4825230419 (ID 000197), sob a responsabilidade de **Mauro Cesar Isoldi e equipe; Denise Coutinho de Miranda; Ana Beatriz Rezende Paula** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 17/05/2019.

We certify that the proposal "THE EFFECTS OF THE HYPERLIPID MEDIUM ON THE CLOCK GENES IN CARDIOMYOCYTE CULTURE", utilizing 280 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 4825230419 (ID 000197), under the responsibility of **Mauro Cesar Isoldi and team; Denise Coutinho de Miranda; Ana Beatriz Rezende Paula** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 05/17/2019.

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

Vigência da Proposta: de **04/2019** a **12/2022**

Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Centro de Ciência Animal**

Espécie: **Camundongos Isogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

Idade: **1 a 3 dias**

N: **280**

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **1 a 5 g**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Sinalização Celular - ICEB II, UFOP.

Ouro Preto, 17 de fevereiro de 2020

Profa. 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-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

