

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
PPGCBIOL

Dissertação

**Efeitos do desafio ao frio
sobre a expressão de
melanopsina, canais TRP e
peptídeos natriuréticos no
coração de camundongos**

Letícia Teresinha Resende

Ouro Preto
2023



LETÍCIA TERESINHA RESENDE

**EFEITOS DO DESAFIO AO FRIO SOBRE A EXPRESSÃO DE MELANOPSINA,
CANALIS TRP E PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS NO CORAÇÃO DE
CAMUNDONGOS**

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

Área de Concentração: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular.

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

**Ouro Preto – MG
2023**

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

R433e Resende, Letícia Teresinha.
Efeitos do desafio ao frio sobre a expressão de melanopsina, canais TRP e peptídeos natriuréticos no coração de camundongos. [manuscrito] / Letícia Teresinha Resende. - 2023.
58 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Mauro César Isoldi.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Bioquímica. 2. Canais de Potencial de Receptor Transitório. 3. Coração. 4. Melanopsina. 5. Peptídeos Natriuréticos. I. Isoldi, Mauro César. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 577.1

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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Letícia Teresinha Resende

Efeitos do desafio ao frio sobre a expressão de melanopsina, canais TRP e peptídeos natriuréticos no coração de camundongos

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

Aprovada em 27 de setembro de 2023

Membros da banca

Dr. Mauro Cesar Isoldi - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra. Sylvana Izaura Salyba Rendeiro de Noronha - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dr. Antônio José Natali - (Universidade Federal de Viçosa)

Dr. Mauro Cesar Isoldi, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 01 de novembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cesar Isoldi, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 13/12/2023, às 15:34, 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 **0641498** e o código CRC **4C42ECBC**.

AGRADECIMENTOS

“Os sonhos não envelhecem”. Aqui encerro a segunda etapa do meu grande sonho. Diante das dificuldades sigo praticando a resiliência.

Primeiramente agradeço à Deus, minha força maior para lutar.

Ao meu orientador, Professor Doutor Mauro César Isoldi, pela oportunidade, pelos inúmeros aprendizados, paciência e empenho no nosso trabalho.

Agradeço a Professora Doutora Ana Maria de Lauro Castrucci pela oportunidade em contribuir e aprender com seu Projeto Temático e ao seu aluno de doutorado, Cristhian, pela parceria.

À minha família pelo apoio, confiança, compreensão e por acreditarem no meu sucesso. Sem vocês jamais teria realizado este sonho.

À toda equipe do Laboratório de Sinalização Celular pela parceria e amizade. Em especial à Bianca, Ana Beatriz, Isabela e Alexandre. Seguimos juntos.

Agradeço a todos os amigos de Prados, Ouro Preto e BH que me apoiaram nesta jornada. Em especial, Isabella, Lays e Laura.

Aos funcionários da UFOP por toda ajuda e dedicação.

Por fim, meu grande agradecimento à UFOP, ao PPGCBIOL, ao CCA, à FINEP, à FAPEMIG APQ-02511-22, à CAPES, ao CNPq, à FAPESP e à USP por todo auxílio e financiamento no desenvolvimento desta pesquisa.

EPÍGRAFE

“Tenha fé em Deus, tenha fé na vida

Tente outra vez

Se é de batalhas que se vive a vida

Tente outra vez

Queira

Basta ser sincero e desejar profundo

Você será capaz de sacudir o mundo

Vai, tente outra vez.”

(Raul Seixas)

RESUMO

A melanopsina (OPN4) é uma opsina fotorreceptora e termorreceptora em mamíferos. Vários órgãos e tecidos expressam essa molécula, tal como o coração, um órgão que não recebe luz, e possui uma alta expressão de OPN4. Essa molécula recruta a abertura dos canais de potencial receptor transitório (TRPs). De acordo com nossa hipótese, a melanopsina e os canais TRP expressos no coração monitorariam e interpretariam a variação de temperatura interna, por meio do fluxo sanguíneo advindo da periferia e do trato respiratório. Como resposta a esse mecanismo, promoveria a expressão de alguns de seus principais hormônios peptídeos natriuréticos (NPs): ANP e BNP. Essa variação implicaria em ajustes do seu próprio metabolismo e de outros tecidos. Portanto, o presente estudo objetiva avaliar por PCR quantitativo os efeitos da exposição ao frio e da ausência do canal TRPA1 sobre a expressão gênica de *Opn4*, *Trpv1*, *Trpa1*, *Trpm8*, *Nppa* e *Nppb* em átrios e ventrículos de camundongos machos adultos C57BL/6J tipo selvagem (WT) e nocaute para *Trpa1* (*TrpA1* KO). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, expostos às temperaturas de 30°C e 22°C. Os resultados de PCR quantitativo indicaram uma maior expressão de *Opn4* nos átrios do que nos ventrículos a 30°C, nos grupos WT e *TrpA1* KO. Além disso, houve diferença significativa entre os átrios e entre os ventrículos a 30°C e 22°C em animais WT e *TrpA1* KO. Quanto aos canais TRP, o gene *Trpv1* não apresentou valores significativos entre os grupos. *Trpa1* indicou maior expressão em átrios e ventrículos a 22°C. Para *Trpm8* houve diferença significativa entre átrio e ventrículo de *TrpA1* KO a 30°C e entre os ventrículos, tanto para temperaturas, como para os genótipos, exceto para o grupo WT a 22°C. Quanto aos NPs, o gene *Nppa* foi mais expresso em ventrículos. Além disso, teve maior expressão nos átrios de *TrpA1* KO a 30°C do que a 22°C. Por fim, *Nppb* indicou maior expressão nos ventrículos do grupo WT a 30°C do que a 22°C e maior expressão nos átrios do que nos ventrículos do grupo WT a 22°C. Dessa forma, concluímos que a OPN4 e os canais TRP possam estar atuando como moléculas mediadoras na termorrecepção no coração e que a variação interna de temperatura influencia a expressão dos NPs nos átrios e ventrículos.

Palavras-chave: Canais TRP; Coração; Exposição ao frio; Melanopsina; Peptídeos natriuréticos.

ABSTRACT

Melanopsin (OPN4) is a photoreceptor and thermoreceptor opsin in mammals. Several organs and tissues express this molecule, such as the heart, an organ that does not receive light, and has a high expression of OPN4. This molecule recruits the opening of transient receptor potential (TRP) channels. According to our hypotheses, melanopsin and TRP channels expressed in the heart would monitor and interpret internal temperature variation, through blood flow from the periphery and respiratory tract. As a response to this mechanism, it would promote the expression of some of its main natriuretic peptide hormones (NPs): ANP and BNP. This variation would imply adjustments to your own metabolism and other tissues. Therefore, the present study aims to evaluate by quantitative PCR the effects of exposure to cold and the absence of the TRPA1 channel on the gene expression of *Opn4*, *Trpv1*, *Trpa1*, *Trpm8*, *Nppa* and *Nppb* in atria and ventricles of adult male C57BL/6J type mice. wild-type (WT) and *Trpa1* knockout (*TrpA1* KO). The animals were divided into 4 experimental groups, exposed to temperatures of 30°C and 22°C. Quantitative PCR results indicated a higher expression of *Opn4* in the atria than in the ventricles at 30°C, in the WT and *TrpA1* KO groups. Furthermore, there was a significant difference between the atria and between the ventricles at 30°C and 22°C in WT and *TrpA1* KO animals. As for TRP channels, the *Trpv1* gene did not show significant values between the groups. *Trpa1* indicated higher expression in atria and ventricles at 22°C. For *Trpm8*, there was a significant difference between the atrium and ventricle of *TrpA1* KO at 30°C and between the ventricles, both for temperatures and genotypes, except for the WT group at 22°C. As for NPs, the *Nppa* gene was more expressed in ventricles. Furthermore, it had higher expression in the atria of *TrpA1* KO at 30°C than at 22°C. Finally, *Nppb* indicated greater expression in the ventricles of the WT group at 30°C than at 22°C and greater expression in the atria than in the ventricles of the WT group at 22°C. Therefore, we conclude that OPN4 and TRP channels may be acting as mediating molecules in thermoreception in the heart and that internal temperature variation influences the expression of NPs in the atria and ventricles.

Keywords: TRP Channels; Heart; Cold exposure; Melanopsin; Natriuretic peptides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma – Delineamento Experimental	28
Figura 2 – Expressão do gene <i>Opn4</i> em explantes cardíacos de camundongos.....	33
Figura 3 - Expressão do gene <i>Trpv1</i> em explantes cardíacos de camundongos.....	34
Figura 4 - Expressão do gene <i>Trpa1</i> em explantes cardíacos de camundongos.....	35
Figura 5 - Expressão do gene <i>Nppa</i> em explantes cardíacos de camundongos.....	35
Figura 6 - Expressão do gene <i>Nppa</i> em explantes cardíacos de camundongos.....	36
Figura 7 - Expressão do gene <i>Nppb</i> em explantes cardíacos de camundongos.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de <i>primers</i> para PCR quantitativo	32
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK	Monofosfato de adenosina
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AVC	Acidente vascular cerebral
BCP	1-bromo-3-cloropropano
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
Ca ²⁺	Cálcio
CCA	Centro de Ciência Animal
CNP	Peptídeo natriurético tipo C
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DCVs	Doenças cardiovasculares
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
IpRGCs	Células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina
K ⁺	Potássio
MFN2	Proteína mitofusina 2
Na ⁺	Sódio
NO	Óxido nítrico
NPR-A	Receptores dos peptídeos natriuréticos do tipo A
NPR-B	Receptores dos peptídeos natriuréticos do tipo B
NPs	Peptídeos natriuréticos
NSQ	Núcleo supraquiasmático
OPN2	Rodopsina
OPN3	Encefalopsina
OPN4	Melanopsina
PKG	Proteína quinase G
proANP	Pró-hormônio de ANP
proBNP	Pró-hormônio de BNP
qPCR	PCR quantitativo
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TFEB	Fator de transcrição EB

TRPA	Canais de potencial receptor transitório anquirina
TRPC	Canais de potencial receptor transitório canônico ou clássico
TRPM	Canais de potencial receptor transitório melastatina
TRPML	Canais de potencial receptor transitório mucolipina
TRPN	Canais de potencial receptor transitório sem potencial mecanorreceptor
TRPP	Canais de potencial receptor transitório policistina
TRPV	Canais de potencial receptor vaniloide
TRPs	Canais de potencial receptor transitório
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
USP	Universidade de São Paulo
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO TEÓRICA	16
2.1 EXPOSIÇÃO AO FRIO E CORAÇÃO.....	16
2.2 PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS	18
2.3 MELANOPSINA	21
2.4 CANAIS TRPS	23
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL.....	28
4.2 ACLIMATAÇÃO À TERMONEUTRALIDADE	29
4.3 EXPOSIÇÃO ÀS TEMPERATURAS DE 22°C E 30°C	29
4.4 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS.....	29
4.5 PCR QUANTITATIVO	30
4.5.1 Extração do RNA	30
4.5.2 RT- PCR (reação de transcriptase reversa)	30
4.5.3 PCR quantitativo (qPCR)	31
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5 RESULTADOS	33
5.1 NÍVEL DE EXPRESSÃO DO GENE <i>OPN4</i> EM EXPLANTES DE ÁTRIO E VENTRÍCULO APÓS DESAFIO DE FRIO MODERADO	33
5.2 NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS GENES DOS CANAIS <i>TRPV1</i> , <i>TRPA1</i> E <i>TRPM8</i> EM EXPLANTES DE ÁTRIO E VENTRÍCULO APÓS DESAFIO DE FRIO MODERADO	34
5.3 NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS GENES DOS PRÓ-HORMÔNIOS <i>NPPA</i> E <i>NPPB</i> EM EXPLANTES DE ÁTRIO E VENTRÍCULO APÓS DESAFIO DE FRIO MODERADO	36

6 DISCUSSÃO.....	38
7 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXOS.....	56
ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	56
ANEXO B - VALIDAÇÃO DA GENOTIPAGEM <i>TRPA1</i> KO.....	57
ANEXO C - CURVA DE <i>MELTING</i> REFERENTE A AMPLIFICAÇÃO DO <i>NPPA</i>	58

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa aqui apresentada é um ramo do Projeto Temático intitulado “*Derrubando um paradigma? Melanopsina, um fotorreceptor canônico, atuando como sensor para ajuste do relógio em órgãos não expostos à luz, e sua possível interação com canais TRP: estudo transdisciplinar envolvendo aspectos fisiológicos e patológicos*”. O projeto foi aprovado e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob o nº 2017/24615-5, sob coordenação da Prof^a. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci (IB-USP), no qual o Prof. Dr. Mauro César Isoldi (UFOP) participa como professor associado.

Um subgrupo de células localizadas na retina, denominadas células ganglionares retinianas (ipRGC), incidem para o núcleo supraquiasmático (NSQ) através do trato retino-hipotalâmico e expressam um fotorreceptor denominado melanopsina (OPN4). Este fotorreceptor uma vez ativado por fótons recruta a abertura dos canais de potencial transitório (TRP) (BERSON, 2002).

A OPN4 é um fotorreceptor responsável pela foto-recepção e transdução de estímulos não visuais da retina (PROVENCIO; ROLLAG; CASTRUCCI, 2002). A OPN4, além de fotorreceptora, é também um sinalizador de temperatura e de radiação UV em mamíferos. Portanto, o dogma de que opsinas só percebem luz foi desfeito (MORAES *et al.*, 2017).

Os canais de potencial receptor transitório (TRP) são canais catiônicos dependentes de voltagem, permeáveis ao Ca^{2+} . Diversos canais TRP já foram identificados como sensores térmicos, cada um com sua faixa dinâmica para ativação por temperatura (PERTUSA *et al.*, 2012). Somando a isso, temos que o coração, um órgão que não recebe luz, possui alta expressão de OPN4, além de expressar diferentes canais TRP (YUE *et al.*, 2015), o que parece indicar uma nova função para o órgão.

Ademais, já foi demonstrado que mudanças de temperatura ambiente influenciam no coração, a produção e a liberação dos hormônios peptídeos natriuréticos (NPs). Isso já foi demonstrado em camundongos que foram expostos a 22°C. Esses animais apresentaram uma maior liberação de NPs e expressão de seus receptores para esses hormônios no tecido adiposo, o que favoreceu a transformação dele do branco para o marrom, fenômeno conhecido como *browning* (SENGENES *et al.*, 2000; BORDICCHIA *et al.*, 2012). Portanto, para camundongos,

a temperatura ambiente de 22°C representa uma zona de desafio de frio, considerando a zona termoneutra a 30°C. A termoneutralidade é definida pela temperatura, na qual organismo não perca e nem ganhe calor, ou seja, que se encontre dentro de uma faixa de homeostase metabólica (BLIGH; JOHNSON, 1973) e foi determinada para genótipos aqui utilizados por meio de calorimetria indireta (dados do grupo, ainda não publicados).

Nessa perspectiva e de acordo com nossas hipóteses, a OPN4 e os canais TRP expressos no coração monitorariam e interpretariam a variação de temperatura e, como resposta, o coração promoveria a expressão de alguns de seus hormônios NPs. Essa variação implicaria em ajustes no seu próprio metabolismo e de outros tecidos. Dessa forma, avaliar a expressão desses hormônios e das moléculas mediadoras, OPN4 e canais TRP, perante o desafio de frio e ausência do canal TRPA1, ajudará a entender não só esse novo mecanismo ligado ao coração, como também possíveis desequilíbrios fisiológicos que poderiam influenciar no aspecto patológico. Portanto, devido ao aumento das doenças cardiovasculares (DCVs) como principal causa de morbidade e mortalidade global (FAN *et al.*, 2023), o coração torna-se o órgão central de interesse nessas investigações.

2 REVISÃO TEÓRICA

2.1 EXPOSIÇÃO AO FRIO E CORAÇÃO

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

Os átrios direito e esquerdo são responsáveis por receber o sangue dos tecidos corporais e dos pulmões respectivamente. Atuam como reservatórios temporários, acumulando o sangue antes de ser bombeado para os ventrículos (AIRES, 2018 p.433). No entanto, os ventrículos são responsáveis por ejetar o sangue para as artérias. O ventrículo direito impulsiona o sangue com dióxido de carbono para os pulmões para que seja realizada a hematose. Já o ventrículo esquerdo recebe o sangue oxigenado rico em nutrientes, advindo do átrio esquerdo, e o ejeta para a artéria aorta (SILVERTHORN, 2017 p.443-446). O coração é um órgão composto por diferentes tipos de células, incluindo cardiomiócitos, células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos cardíacos, cada uma desempenhando um papel específico na contratilidade, condução elétrica e manutenção do tecido cardíaco (GERALD; DORN, 2010; BERS, 2002).

Além das câmaras cardíacas, o coração possui válvulas que se fecham e se abrem em razão das mudanças de pressão. Tais válvulas desempenham um papel fundamental na prevenção do movimento retrógrado do sangue durante o processo do ciclo cardíaco (MATHEW; KANMANTHAREDDY, 2023). As válvulas mitral e tricúspide são chamadas de *válvulas atrioventriculares* devido à sua localização entre os átrios e os ventrículos, cujo sua principal função é impedir o fluxo sanguíneo retrógrado para os átrios durante a sístole ventricular. Por outro lado, as válvulas aórtica e pulmonar são conhecidas como *válvulas semilunares*, que se localizam entre os ventrículos e as artérias, cuja sua função é impedir o fluxo sanguíneo retrógrado para os ventrículos durante a diástole (VACA; BORDONI, 2022).

As fases de relaxamento e contração cardíacas são chamadas de diástole e sístole, respectivamente. Tais mecanismos são alterados de acordo com as mudanças na pressão do sangue que chega e que é ejetado ao longo do ciclo

cardíaco (BONNEMAIN; NIDO; ROCHE, 2022). Na circulação sanguínea, as veias desempenham a função de transporte do sangue em direção ao coração, enquanto as artérias possuem a tarefa de distribuí-lo (MOHRMAN; HELLER, 2007 p.21-23).

Portanto, a coordenação sinérgica entre as quatro câmaras cardíacas desempenha um papel fundamental na segurança de um fluxo sanguíneo apropriado e na eficiência da distribuição de oxigênio e nutrientes em todo o organismo. Deste modo, a adequada funcionalidade desse órgão salienta a importância dessas estruturas na proteção da saúde cardiovascular e no correto desempenho fisiológico do organismo (SILVERTHORN, 2017 p.437-438).

Em pesquisas que envolvem DCVs, os camundongos C57BL/6J são uma das linhagens mais utilizadas, por serem um modelo cujo funcionalidade do coração se assemelha aos outros mamíferos, incluindo os seres humanos (FUCHS *et al.*, 2018).

Conforme mencionado inicialmente, o coração é um órgão vital responsável pela circulação sanguínea e pela manutenção da homeostase do organismo (GILSBACH *et al.*, 2014). Para desempenhar suas funções de maneira eficiente, uma complexa rede de genes e hormônios regula tanto sua estrutura quanto sua função (ROOIJ; OLSON, 2007). Desse modo, fatores ambientais externos, tal como a temperatura, podem influenciar na expressão gênica e hormonal, e conseqüentemente na estrutura e função do coração.

A temperatura do ambiente atua sobre os organismos vivos, no metabolismo, sobrevivência, reprodução, desenvolvimento e taxa de crescimento (HUDA *et al.*, 2022). Para se adaptarem às variações de temperatura, os organismos utilizam processos de aclimação e adaptação genética (COLLIER *et al.*, 2018). A aclimação envolve mudanças reversíveis na expressão de genes ou na atividade enzimática, permitindo que os organismos se ajustem a novas condições térmicas.

A exposição a ambientes frios provoca uma série de modificações no organismo humano e animal. Um exemplo dessas modificações é a vasoconstrição. Tal processo ocorre quando há uma rápida redução da temperatura periférica e uma intensa contração dos vasos sanguíneos nas extremidades, abrangendo todo o organismo, incluindo o coração (CASTELLANI; TIPTON, 2015). Essa condição pode ser identificada no coração por danos em sua estrutura e função, perturbações no metabolismo, aumento do estresse oxidativo, inflamação e apoptose (PORTES *et al.*, 2023).

Ademais, estudos têm demonstrado que o frio pode afetar a função cardíaca, caracterizando um fator de risco para ocorrência de DCVs, como o infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) (SHETH *et al.*, 1999), e fibrilação atrial (NGUYEN *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2022). Em países como a Coreia do Sul, Japão, Estados Unidos, Alemanha, dentre outros, estudos epidemiológicos demonstraram que no período do inverno o risco de AVC é aumentado (GAO *et al.*, 2019; VAIČIULIS *et al.*, 2023). E a exposição prolongada a temperaturas frias pode resultar em consequências adversas e prejudiciais ao sistema cardiovascular (GIBELIN, 2015).

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

Portanto, é importante destacar que a exposição ao frio em períodos curtos ou longos, pode causar modificações significativas nos organismos, especialmente no coração, resultando em remodelamento fisiológico cardíaco, afetando a estrutura e a função deste órgão. Desse modo, compreender e explorar os mecanismos subjacentes é fundamental na identificação de estratégias eficazes para prevenir e tratar complicações decorrentes da exposição ao frio.

2.2 PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS

Os NPs são hormônios sintetizados e secretados pelas células cardíacas, os cardiomiócitos. Tais hormônios exercem uma variedade de efeitos que abrangem diversos sistemas do corpo (SHI *et al.*, 2021). As propriedades cardiometabólicas desses NPs são diversas e incluem a melhoria da vasodilatação, aumento da excreção de sódio (Na⁺), inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e estímulo à mobilização e oxidação de lipídios. Além disso, também estão associados a produção de calor pelo tecido adiposo marrom, ao *browning* dos adipócitos brancos e ao aprimoramento da sensibilidade à insulina. (SARZANI *et al.*, 2022).

Os NPs realizam atividades parácrinas e autócrinas no tecido cardíaco, desempenhando um papel importante na prevenção de diversas condições, tais como hipertrofia, fibrose, arritmias e cardiomiopatias. (RUBATTU *et al.*, 2019).

Bold e colaboradores (1981) realizaram os primeiros estudos, com ratos, envolvendo os NPs. O primeiro membro da família dos NPs descoberto foi o peptídeo natriurético atrial (ANP). O segundo foi o peptídeo natriurético cerebral (BNP), descoberto em pesquisas com cérebro suíno (SUDOH *et al.*, 1988). No entanto, estudos posteriores identificaram sua expressão no coração, mais especificamente nos ventrículos (MUKOYAMA *et al.*, 1990). O terceiro membro da família dos NPs, o peptídeo natriurético tipo C (CNP), foi descoberto em 1991 a partir de extratos de cérebro suíno, com base em sua capacidade de promover relaxamento do músculo liso (SUDOH *et al.*, 1990). Tais descobertas contribuíram para o reconhecimento do coração como um órgão endócrino, cuja família de hormônios inclui os três peptídeos de grande importância para a função cardíaca (PANDEY, 2023).

Os NPs são produzidos a partir de proteínas precursoras que contêm pré e pró-hormônios inativos. Posteriormente, ocorrem modificações intracelulares nos pró-hormônios (proANP e proBNP), resultando na clivagem desses precursores em suas formas ativas, ANP e BNP, respectivamente (POTTER *et al.*, 2009). O proANP é predominantemente expresso em resposta ao estiramento das paredes atriais em condições fisiológicas normais (SARZANI *et al.*, 2022) e seu armazenamento ocorre em grânulos de secreção presentes nos cardiomiócitos. Quando há um aumento na pressão sanguínea nas aurículas cardíacas, devido ao excesso de volume ou pressão do sangue, as células atriais sofrem estiramento. A liberação do proANP ocorre em resposta a ativação dos receptores de estiramento nas células atriais. Após a liberação de proANP, ele é clivado pela enzima corina dando origem ao ANP na sua forma ativa, ou seja, circulante na corrente sanguínea (DONG *et al.*, 2010). Por outro lado, o proBNP é expresso principalmente nas câmaras ventriculares (SUDOH *et al.*, 1988). Após o estiramento nas paredes ventriculares, o proBNP é ativado e liberado. A enzima furina é responsável pelo processo de clivagem de proBNP gerando o BNP na sua forma ativa (NISHIKIMI *et al.*, 2015). Logo, observa-se a presença de ANP e BNP em níveis circulantes, com sua expressão e liberação sendo reguladas em resposta ao estresse mecânico (KUWAHARA; NAKAO, 2010). É fundamental salientar que o CNP não exibe propriedades natriuréticas e é predominantemente sintetizado em células vasculares. Além disso, esse peptídeo desempenha principalmente um papel de estimulação do crescimento dos ossos

longos. Embora também possa exercer outras funções ainda não compreendidas. (PANDEY, 2005; SUGA *et al.*, 1992).

Interessantemente, NPs são também secretados em resposta a ativação do sistema simpático pelo frio ambiental: catecolaminas ligam-se a receptores adrenérgicos β 1 no coração, o que eleva os níveis de NPs plasmáticos em resposta. Sua ação nos tecidos adiposos branco e marrom estimula a termogênese, resposta homeostática para a manutenção da temperatura corpórea.

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

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

Evidências da literatura científica mostram que o ANP tem a função de reduzir a hipertrofia cardíaca e a pressão arterial em condições fisiológicas normais. Em um estudo realizado por Forte e colaboradores (2022), foi demonstrado que a autofagia (mecanismo de digestão intracelular responsável por reparar danos citoplasmáticos; [LEVINE; KROEMER, 2008]) está envolvida com efeitos protetores de *Nppa* em cardiomiócitos, tanto in vitro como in vivo. Foi observado que ANP exógeno ativa rapidamente a autofagia por meio do receptor NPR-A e da sinalização da proteína quinase G (PKG), além de aumentar a autofagia cardíaca em camundongos. O ANP endógeno, secretado pelos próprios cardiomiócitos, em resposta à privação de glicose ou hipóxia, também estimula a autofagia. Essa ativação da autofagia preserva a viabilidade celular, reduzindo a hipertrofia e limitando o tamanho do infarto em modelos de isquemia-reperfusão. Por outro lado, a inibição da autofagia reverte os efeitos protetores de ANP, enquanto a ativação do fator de transcrição EB (TFEB) está envolvida na mediação desses efeitos. Portanto, os autores sugerem que ANP é um modulador extracelular da autofagia no coração (FORTE *et al.*, 2022).

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

Dessa forma, a perturbação na produção ou expressão dos NPs pode desencadear distúrbios cardiovasculares, resultando em alterações na função e estrutura do coração.

2.3 MELANOPSINA

Os ciclos de claro e escuro na Terra são delineados por dois períodos: a fase com temperaturas mais elevadas e alta incidência de radiação ultravioleta (UV) e a

fase com baixas temperaturas e radiação UV (GUERRERO-VARGAS *et al.*, 2017). De acordo com a teoria “Fuga da Luz” de Pittendrigh (1993), a fuga da luz pelos organismos durante a evolução dependeu justamente da fotorrecepção e da procura de temperaturas mais amenas. Portanto, temperatura e luz são estímulos ambientais que influenciam simultaneamente os organismos.

Assim, o surgimento de moléculas fotorreceptoras propiciou vantagens aos organismos que as desenvolveram. Surgiram as opsinas, que são proteínas fotorreceptoras que tornam neurônios sensíveis a luz. Estão acopladas à proteína G e associadas a um cromóforo derivado da vitamina A, permitindo a transdução da luz (LAMMEL; DÖLEN; MALENKA, 2016). As opsinas visuais e não visuais de vertebrados classificadas com base na natureza da proteína G com que se acoplam são: OPN1 (em cones) e OPN2 (rodopsina) (proteína Gt); OPN3 (encefalopsina) (proteína Gi/Go) e OPN4 (melanopsina) (proteína Gq) (POLETINI *et al.*, 2015). Dentre as opsinas não visuais, a mais estudada é a OPN4 devido a sua capacidade de detectar luz no comprimento de onda azul (470nm) e temperatura (MORAES *et al.*, 2017). Ela foi clonada a partir da rã africano *Xenopus laevis*, onde medeia a dispersão de grânulos de melanina na pele induzida pela luz (ISOLDI *et al.*, 2005).

A luz ativa um subgrupo de células localizadas na retina, denominadas células ganglionares retinianas (ipRGC) que incidem, morfológicamente, para o NSQ, considerado o marcapasso central (BERSON, 2002; PROVENCIO; ROLLAG; CASTRUCCI, 2002; HUGHES *et al.*, 2016;). Essas células desempenham um papel importante na regulação do ritmo circadiano, que controla os ciclos de sono-vigília, além de outros processos fisiológicos relacionados à luz (TAM *et al.*, 2021). A membrana das células ganglionares retinianas expressa a OPN4, um fotopigmento responsável pela fotorrecepção e transdução de estímulos não visuais da retina. Consiste em uma proteína que se liga covalentemente ao cromóforo 11- cis-retinaldeído, que quando estimulado pela luz, é isomerizado em all-transretinaldeído, induzindo uma mudança na conformação da OPN4 e desencadeando uma cascata de fototransdução (WONG, 2009). Essa cascata de fototransdução foi descoberta por Isoldi e colaboradores (2005), pesquisadores integrantes do projeto temático, ao qual este estudo se encontra vinculado.

Estudos demonstraram que a OPN4 além de fotorreceptora, é também um sinalizador de temperatura e de radiação UV em mamíferos. (PÉREZ-CEREZALES *et al.*, 2015; DE ASSIS; MORAES; CASTRUCCI, 2017). Portanto, a expressão de

OPN4 pode ser influenciada tanto pela luz, quanto pela temperatura e encontrada em diversos órgãos e tecidos (PÉREZ-CEREZALES *et al.*, 2015). Como exemplo temos o coração, um órgão que não recebe luz e possui alta expressão de OPN4, além de expressar diferentes canais TRP (DÍAZ *et al.*, 2015; RANDALL *et al.*, 2015; YUE *et al.*, 2015; HUGHES *et al.*, 2016). Portanto, a expressão de OPN4 no coração é nossa principal ferramenta de investigação neste estudo. Acreditamos que essa proteína esteja exercendo a função termorreceptora em um órgão não-visual, em interação com os TRP, que são canais ativados por diversas faixas de temperaturas (POLETINI *et al.*, 2015).

2.4 CANAIS TRPS

Um dos mecanismos de adaptação dos organismos às mudanças ambientais é pelos TRPs, uma classe de proteínas integrais de membrana (FREICHEL *et al.*, 2017). Os canais TRP são membros de uma família de canais iônicos presentes em células de organismos pluricelulares (SAMANTA; HUGHES; MOISEENKOVA-BELL, 2018). São ativados por uma ampla gama de estímulos, como sensação térmica, fotorrecepção, quimiosensação, mecanosensação e nocicepção (SPEKKER, KÖRTÉSI, VÉCSEI, 2022). Tais canais atuam como transdutores de sinal nas células, modulando o potencial de membrana e a concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}). Portanto, sua presença em diferentes tipos de células e tecidos desempenha importantes funções em diversos processos fisiológicos.

Os canais TRP são agrupados em sete famílias com base em sua homologia de sequências de aminoácidos, sendo, TRPC (canônico ou clássico), TRPV (vanilóide), TRPM (melastatina), TRPN (sem potencial mecanorreceptor C), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina) e TRPA (anquirina) (POLETINI *et al.*, 2015). A maioria desses canais é permeável ao Ca^{2+} com exceção do TRPM4 e M5 que são permeáveis a cátions monovalentes (YUE *et al.*, 2015).

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

O canal TRPV1, pertencente à subfamília *vanilóide*, foi identificado como um receptor responsável pela detecção de dor e calor (CATERINA *et al.*, 1997). A expressão deste canal é encontrada em diversos tipos de tecidos e células, tais como fibras aferentes cardíacas (GAO *et al.*, 2023). A ativação do canal TRPV1 ocorre mediante inúmeros estímulos químicos e físicos, dentre eles, elevadas temperaturas ($> 43^{\circ}\text{C}$) (KASHIO; TOMINAGA, 2022). Devido a sua capacidade de ser ativado por uma ampla gama de estímulos, o canal TRPV1 é considerado um receptor polimodal, cuja ativação é potencializada quando exposto à maior presença desses estímulos (BENÍTEZ-ANGELES *et al.*, 2020). Wang e colaboradores (2022) demonstraram em um estudo com camundongos *in vivo* que o TRPV1 alivia os danos causados pela hipertrofia no miocárdio, resultando em diminuição do diâmetro interno do ventrículo esquerdo ao fim das fases de sístole e diástole. Enquanto *in vitro*, observou-se que o TRPV1 reduziu a área dos cardiomiócitos e melhorou a função mitocondrial, proporcionando uma intervenção favorável para a homeostase das mitocôndrias, sendo ações atribuídas à ativação da proteína quinase, ativada por monofosfato de adenosina e proteína mitofusina 2 (AMPK-MFN2). Esses resultados condizem com o indício de que o canal TRPV1, quando ativado em resposta a eventos de hipertrofia cardíaca, atua como um fator de proteção (WANG *et al.*, 2022).

O canal TRPA1, pertence à subfamília *anquirina* dos canais TRP (JAQUEMAR; SCHENKER; TRUEB, 1999). É um canal catiônico não seletivo, permeável ao Ca^{2+} , Na^{+} e potássio (K^{+}) (ZYGMUNT; HÖGESTÄTT, 2014). O TRPA1 também é considerado um receptor polimodal devido sua ativação mediada por estímulos químicos, frio, dentre outros e é expresso em diversos tecidos, incluindo o cardíaco (MEENTS; CIOTU; FISCHER, 2019). Em um estudo conduzido por Aubdool e colaboradores (2014), com camundongos C57BL/6 submetidos a exposição ao frio agudo, observou-se que o canal TRPA1 exerceu o papel de sensor de frio. Os resultados indicaram que a vasoconstrição inicial decorrente do frio foi mediada pela geração de superóxido, dependente da ativação de TRPA1. Este processo estimulou os adrenoceptores e promoveu a fosforilação da cadeia leve de miosina por meio da Rho-quinase, posteriormente à ativação de TRPA1. Além disso, o componente subsequente de restauração do fluxo sanguíneo também dependeu da ativação de TRPA1 e foi mediado pelos neuropeptídeos vasodilatadores CGRP e substância P, ambos derivados do nervo sensorial, bem como pelo óxido nítrico

(NO), derivado da atividade da nNOS. Portanto, os resultados sugerem que o TRPA1 auxilia na melhoria da resposta vascular durante a exposição ao frio (AUBDOOL *et al.*, 2014).

Atualmente, a função do canal TRPA1 como sensor de frio tem gerado debates que levantam a possibilidade de sua ativação ocorrer também em resposta ao calor em algumas espécies. A faixa de ativação por determinadas temperaturas deste canal pode variar de acordo com cada espécie, por exemplo, em humanos é de 17°C a 20°C e em camundongos é 16°C aproximadamente (WANG *et al.*, 2023b; ZHANG *et al.*, 2022). Mais estudos são necessários para aprofundar o conhecimento nesse campo e investigar os mecanismos subjacentes à ativação do canal TRPA1 em diferentes condições térmicas e espécies.

O canal TRPM8, pertence à subfamília *melastatina* dos TRP. É permeável ao Ca²⁺, Na⁺ e K⁺, mas sua permeabilidade principal é ao Ca²⁺ (PEIER *et al.*, 2002). Sua função está diretamente ligada à detecção e transdução de temperaturas mais baixas (YIN *et al.*, 2022) como temperaturas menores que 27°C e compostos químicos que estimulam uma sensação de frescor, como o mentol e a icilina, caracterizando-o também como um canal polimodal (PLAZA-CAYÓN; GONZÁLEZ-MUÑIZ; MARTÍN-MARTÍNEZ, 2022). Um estudo de Huang e colaboradores (2022), mostrou evidências de que a administração do mentol em camundongos portadores de AVC isquêmico, resulta na ativação do canal TRPM8. Essa ativação pode estar relacionada à capacidade de redução nos danos causados pelo AVC isquêmico nesses animais (HUANG *et al.*, 2022). Ademais, Thapa e colaboradores (2022) demonstraram que camundongos expostos a condições de frio apresentaram elevada expressão do canal TRPM8. Esta expressão desempenha um papel direto na resposta de termorregulação, devido à exposição ao frio. Portanto, o aumento dos níveis de TRPM8 após a exposição ao frio parecem representar uma resposta de natureza protetora, com o intuito elevar a temperatura corporal central, afim de combater o ambiente frio.

Em suma, TRPV1, TRPA1 e TRPM8 são expressos no coração e considerados canais polimodais, podendo ser ativados por diversos estímulos (KASHIO; TOMINAGA, 2022). É importante ressaltar que as funções e os mecanismos de ativação dos canais TRP ainda não estão completamente esclarecidos. Isso indica a complexidade desse sistema e a necessidade de aprofundar os estudos sobre eles (WANG *et al.*, 2023a).

Nessa perspectiva, alterações na expressão dos canais TRP podem exercer um papel significativo nas doenças que envolvem o sistema cardiovascular (MORAES; WEBB; SILVA, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição ao frio e da ausência do canal TRPA1 sobre a expressão de melanopsina, canais TRP e peptídeos natriuréticos no coração de camundongos.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Analisar a expressão gênica de *Opn4*, *Trpa1*, *Trpv1*, *Trpm8*, *Nppa* e *Nppb* nos átrios e ventrículos de camundongos C57BL/6J e *TrpA1* KO expostos a temperatura termoneutra a 30°C e desafio de frio a 22°C

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

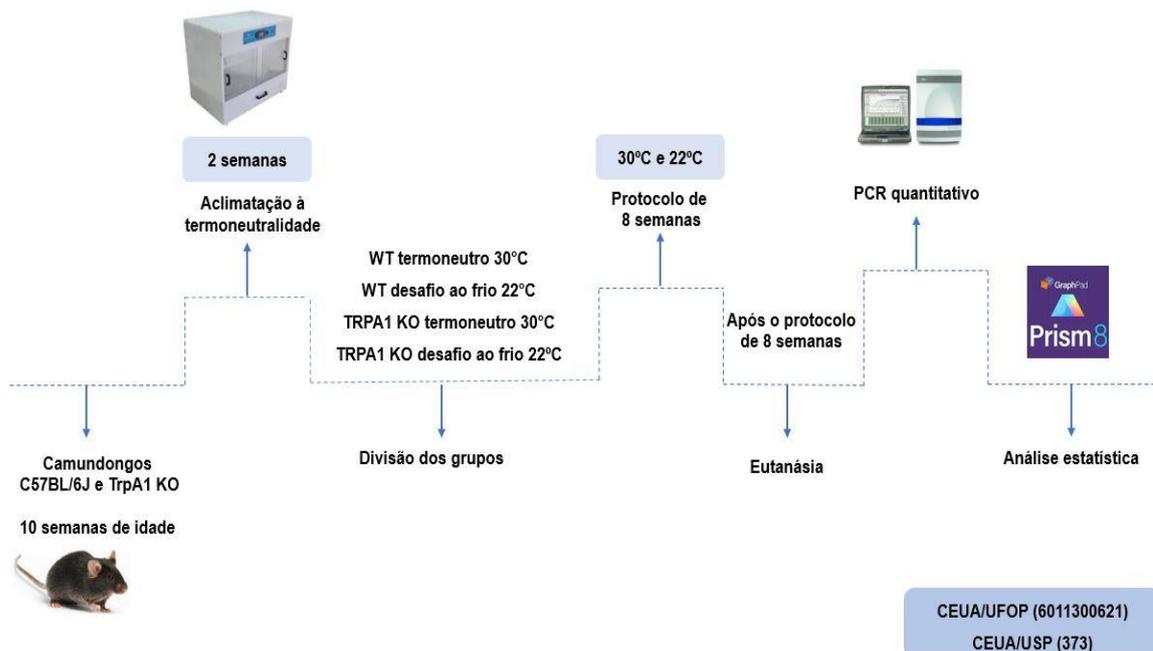
Todos os procedimentos foram realizados conforme os Princípios Éticos apresentados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

O projeto foi aprovado pelos comitês de ética da UFOP sob o protocolo nº 6011300621 (ANEXO A) e do IB-USP sob o protocolo nº 373.

Foram utilizados 36 animais com 10 semanas de idade, sendo camundongos machos isogênicos da linhagem C57BL/6J e camundongos nocautes para *Trpa1* (ANEXO B). Os animais foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e pelo Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP).

A sequência temporal dos experimentos é apresentada na FIG.1. Os experimentos realizados com os animais cedidos pela USP, ocorreram no laboratório de Fisiologia Comparada do Instituto de Biociências até o momento da eutanásia. Os corações desses animais foram enviados para o laboratório de Sinalização Celular da UFOP para realização das análises.

Figura 1 – Fluxograma - Delineamento Experimental



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 ACLIMATAÇÃO À TERMONEUTRALIDADE

Todos os animais foram submetidos ao procedimento de aclimação à termoneutralidade (30°C), em estufa UTA, por um período de 2 semanas. Durante este período, os animais foram alojados em caixas de polietileno (3 animais por caixa), em regime de luminosidade claro/escuro (12h/12h), com ração normal e água *ad libitum*.

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

Após a aclimação, os animais foram individualizados e randomizados aleatoriamente em 4 grupos experimentais:

- WT termoneutro 30°C;
- WT desafio ao frio 22°C;
- TRPA1 KO termoneutro 30°C;
- TRPA1 KO desafio ao frio 22°C.

A exposição à termoneutralidade e ao desafio de frio deu-se por meio da manutenção dos animais em estufa UTA a 30°C e em sala experimental com temperatura constante de 22°C, por um período de 8 semanas.

4.4 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS

A eutanásia foi realizada seguindo as normas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

Ao final da oitava semana de experimento, todos os animais foram submetidos à eutanásia via decapitação, sem o uso de anestesia prévia. Em seguida, o coração foi removido por meio de incisão torácica, lavado com solução tampão PBS, secos por absorção em papel filtro e pesados por uma balança de precisão (Gehaka model BK300, precision 0.01 g). Posteriormente, foi realizada a separação dos átrios e ventrículos e armazenamento dos tecidos em freezer -80°C até o momento das análises.

4.5 PCR QUANTITATIVO

4.5.1 Extração do RNA

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

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

A concentração de RNA foi determinada fazendo a leitura no equipamento Nanodrop 1000 (ND-1000). A razão de OD260/OD280 foi considerada boa acima de 1,6.

4.5.2 RT- PCR (reação de transcriptase reversa)

A reação de RT-PCR foi realizada com $1\mu\text{g}$ de RNA total, utilizando $1\mu\text{L}$ de *random primers* $100\text{ng}/\mu\text{L}$ e $1\mu\text{L}$ de dNTPs Mix 10mM (*Invitrogen*, EUA), em reação com volume final de $13\mu\text{L}$ ajustado com água DEPC. As amostras foram aquecidas por 5 min a 65°C (termociclador Eppendorf) e, em seguida, transferidas para cuba com gelo, adicionando-se $7\mu\text{L}$ do mix [$4\mu\text{L}$ de tampão para PCR (5x), $1\mu\text{L}$ de DTT

(0,1 M), 1 μ L de inibidor de ribonuclease (40 U/ μ L), 0,5 μ L da enzima *Superscript III Reverse Transcriptase* (200 U/ μ L, Life Technologies, EUA) e 0,5 μ L de água DEPC] para um volume final de 20 μ L em cada tubo. A mistura foi homogeneizada, gentilmente e, após breve centrifugação, incubada por 5 min a 25°C, seguido por 50 min a 50°C. A reação foi inativada por incubação a 70°C por 15 min (termociclador Eppendorf). O cDNA sintetizado foi usado nas subseqüentes reações de PCR quantitativo.

4.5.3 PCR quantitativo (qPCR)

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

Os *primers* foram diluídos em água *DNase/RNase-free* para se obter a solução estoque de concentração igual a 10⁻⁴M. Os primers foram então diluídos 10X (10 μ L em 90 μ L de água *DNase/RNase-free*), dando uma solução intermediária de 10⁻⁵M. A concentração final nos poços de qPCR foi de 300nM (TABELA 1). Nas reações de qPCR utilizamos 1 μ L cDNA para uma reação de 10 μ L/poço.

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

Os resultados de qPCR foram analisados através do método de $\Delta\Delta$ CT. Os valores de CT foram extraídos a partir do ajuste do *threshold*, para encontrar o Δ CT foi calculada a diferença entre o valor de CT para o gene de interesse e o valor de CT para *β -actina* da mesma amostra de cDNA (ambos correspondendo à média de poços duplicados do mesmo cDNA). A seguir, obteve-se o $\Delta\Delta$ CT subtraindo a média do grupo ventrículo C57BL/6J (30°C) dos valores encontrados para cada amostra dos grupos átrios e ventrículos de todos os genótipos, sendo essa diferença colocada como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta$ CT). Esses valores foram utilizados nas análises estatísticas no *software* GraphPad Prism 8.0.1.

As respectivas sequências de *primers* são apresentadas no TAB. 1.

Tabela 1 - Sequência de *primers* para PCR quantitativo

Primer	Sequência	Concentração final
<i>Opn4</i>	Forward: 5'-ACATCTTCATCTTCAGGGCCA-3'	300nM
	Reverse: 5'-ACTCACCGCAGCCCTCAC-3'	
<i>TrpA1</i>	Forward: 5'-GGTCCAACATAACCGCATAGA-3'	300nM
	Reverse: 5'-AGGGCAACACGAAGATGATAC-3'	
<i>TrpV1</i>	Forward: 5'-CAGAGACCTGTGTCGGTTTATG-3'	300nM
	Reverse: 5'-CATGTTGAGCAGGAGGATGTAG-3'	
<i>TrpM8</i>	Forward: 5'-TACGCTTGTCCTGTGACACC-3'	300nM
	Reverse: 5'-TCCAGTGAGAATCCACGCAC-3'	
<i>Nppa</i>	Forward: 5'-GCTTCGGGGGTAGGATTGAC-3'	300nM
	Reverse: 5'-CACACCACAAGGGCTTAGGA-3'	
<i>Nppb</i>	Forward: 5'-GAGTCCTTCGGTCTCAAGGC-3'	300nM
	Reverse: 5'-ACTTCAGTGC GTTACAGCCC-3'	
<i>β-actina</i>	Forward: 5'- GATCAAGATCATTGCTCCTCCTG-3'	300nM
	Reverse: 5'- AGGGTGTA AACGCAGCTCA-3'	

Fonte: Elaborado pela autora

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

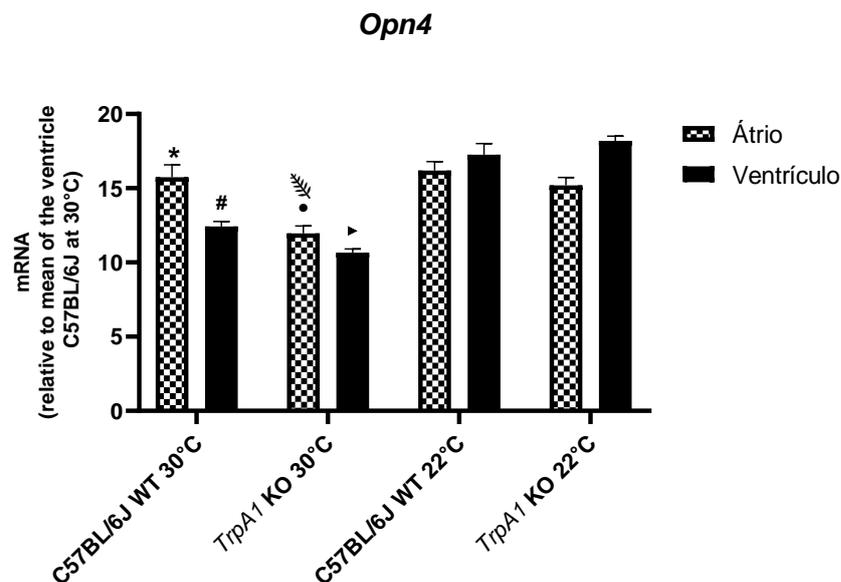
Todos os resultados foram apresentados como média \pm EPM. Para comparações entre os grupos, foi utilizada a ANOVA *Two-Way*, seguida de pós teste de Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido por $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas usando o *software* GraphPad Prism (versão 8.0.1).

5 RESULTADOS

5.1 NÍVEL DE EXPRESSÃO DO GENE *OPN4* EM EXPLANTES DE ÁTRIO E VENTRÍCULO APÓS DESAFIO DE FRIO MODERADO

Os átrios do grupo C57BL/6J WT a 30°C apresentaram maior expressão deste gene do que no grupo *TrpA1 KO* a 30°C (FIG. 2). A expressão de *Opn4* nos ventrículos do grupo C57BL/6J WT a 30°C é significativamente maior quando comparado com o grupo *TrpA1 KO* a 30°C (FIG. 2). A expressão em átrios do grupo *TrpA1 KO* a 30°C foi maior do que em ventrículos na mesma temperatura (FIG. 2). A expressão em átrios do grupo *TrpA1 KO* 22°C foi maior do que no grupo *TrpA1 KO* 30°C (FIG. 2). A expressão em ventrículos do grupo *TrpA1 KO* 22°C foi maior quando comparado com o *TrpA1 KO* 30°C (FIG. 2).

Figura 2 - Expressão do gene *Opn4* em explantes cardíacos de camundongos.

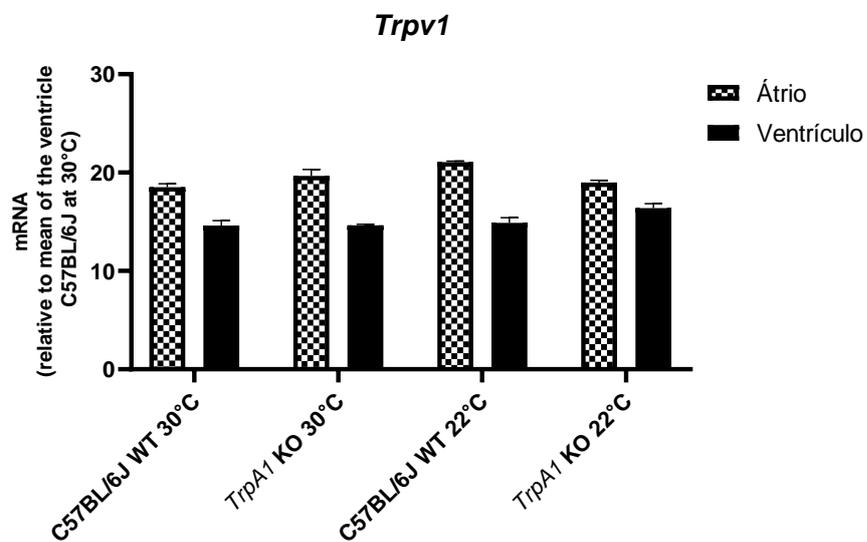


Expressão gênica realizada por PCR quantitativo. Análises estatísticas realizadas por ANOVA *Two-Way*, seguida por pós teste de Bonferroni. Valores em média \pm EPM. Significância foi estabelecida para $p < 0,05$. Simbologia: * átrio do grupo C57BL/6J WT 30°C vs átrio do grupo *TrpA1 KO* 30°C ($p=0,0164$); # ventrículo do grupo C57BL/6J WT 30°C vs ventrículo do grupo *TrpA1 KO* 30°C ($p=0,0003$); • átrio do grupo *TrpA1 KO* 30°C vs ventrículo do mesmo grupo *TrpA1 KO* 30°C ($p=0,0054$); † átrio do grupo *TrpA1 KO* 30°C vs átrio do grupo *TrpA1 KO* 22°C ($p=0,0190$); ‡ ventrículo do grupo *TrpA1 KO* 30°C vs ventrículo do grupo *TrpA1 KO* 22°C ($p<0,0001$). Fonte: Elaborado pela autora

5.2 NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS GENES DOS CANAIS *TRPV1*, *TRPA1* E *TRPM8* EM EXPLANTES DE ÁTRIO E VENTRÍCULO APÓS DESAFIO DE FRIO MODERADO

A FIG. 3 representa a expressão do gene *Trpv1* no coração. Como pode ser observado não houve diferenças significativas entre as câmaras cardíacas ou entre os grupos na expressão deste gene.

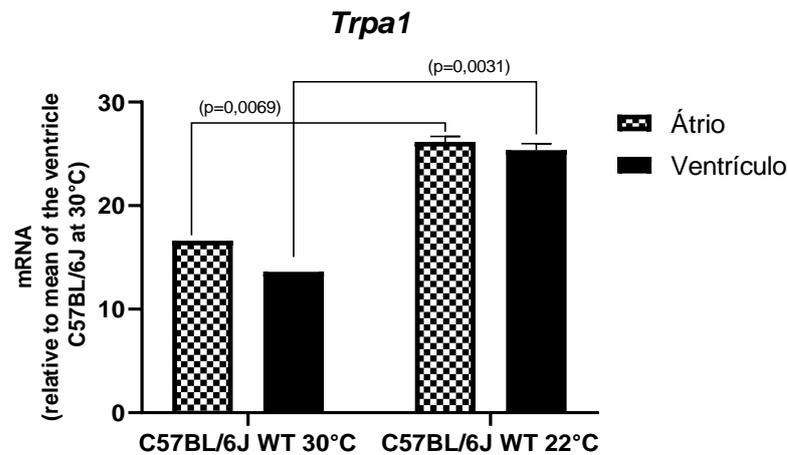
Figura 3 - Expressão do gene *Trpv1* em explantes cardíacos de camundongos.



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

A FIG. 4 representa a expressão do gene *Trpa1* no coração. Este gene teve maior expressão nos átrios do que nos ventrículos do grupo C57BL/6J a 22°C do que a 30°C (FIG. 4).

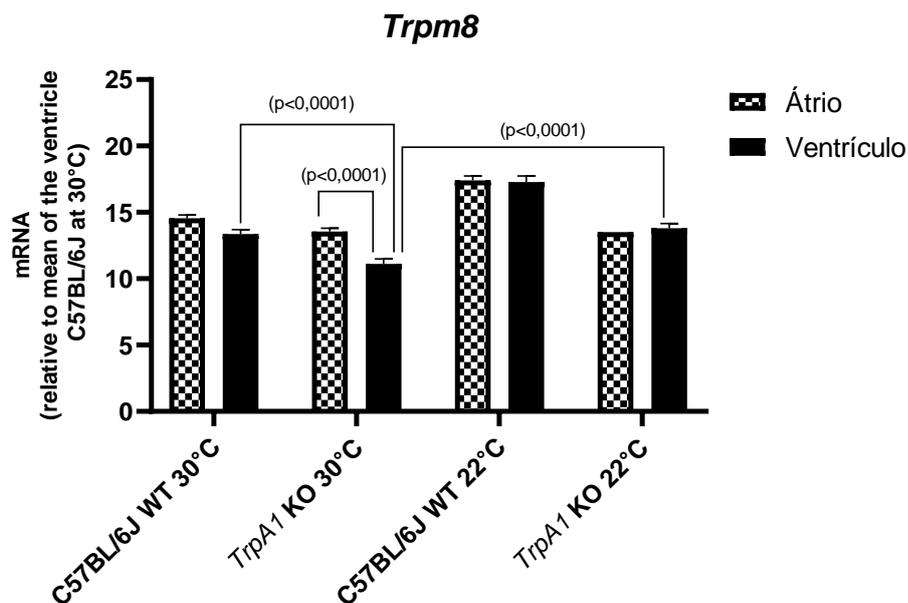
Figura 4 - Expressão do gene *Trpa1* em explantes cardíacos de camundongos.



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

A FIG. 5 representa a expressão do gene *Trpm8* no coração. Os ventrículos do grupo C57BL/6J WT a 30°C apresentaram maior expressão deste gene quando comparado com o grupo *TrpA1 KO* de mesma temperatura, o qual foi menor que o ventrículo do mesmo genótipo a 22°C (FIG.5) A expressão em átrios do grupo *TrpA1 KO* a 30°C foi maior do que em ventrículos na mesma temperatura (FIG.5).

Figura 5 - Expressão do gene *Trpm8* em explantes cardíacos de camundongos.

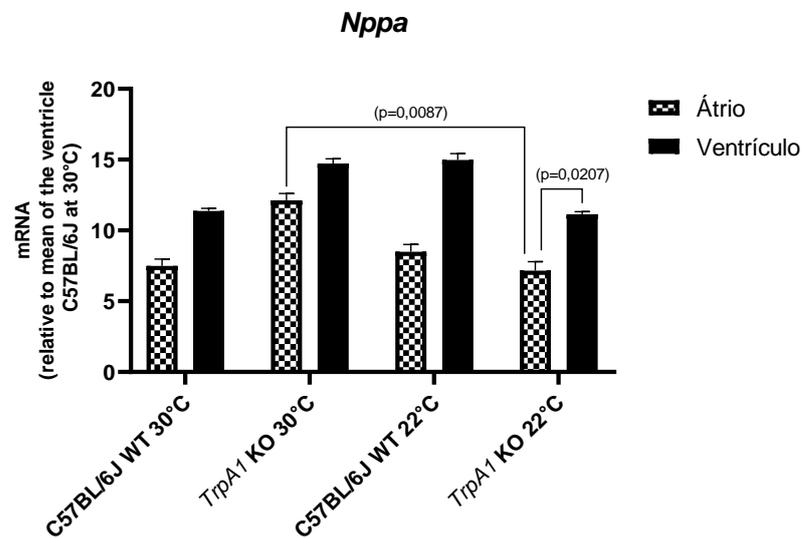


Expressão gênica realizada por PCR quantitativo. Análises estatísticas realizadas por ANOVA *Two-Way*, seguida por pós teste de Bonferroni. Valores em média \pm EPM. Significância foi estabelecida para $p < 0,05$. Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS GENES DOS PRÓ-HORMÔNIOS *NPPA* E *NPPB* EM EXPLANTES DE ÁTRIO E VENTRÍCULO APÓS DESAFIO DE FRIO MODERADO

A FIG. 6 representa a expressão do gene *Nppa* no coração. Os átrios do grupo *TrpA1 KO* a 30°C apresentaram maior expressão de *Nppa* do que no grupo *TrpA1 KO* a 22°C (FIG. 6). E a expressão em ventrículos do grupo *TrpA1 KO* a 22°C foi maior do que em átrios de mesma temperatura (FIG. 6).

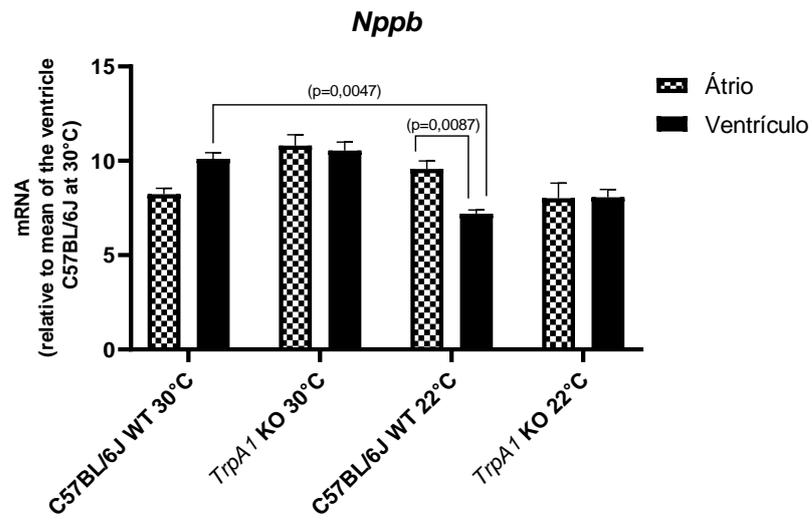
Figura 6 - Expressão do gene *Nppa* em explantes cardíacos de camundongos.



Expressão gênica realizada por PCR quantitativo. Análises estatísticas realizadas por ANOVA *Two-Way*, seguida por pós teste de Bonferroni. Valores em média ± EPM. Significância foi estabelecida para $p < 0,05$. Fonte: Elaborado pela autora.

A FIG. 7 representa a expressão do gene *Nppb* no coração. A expressão nos ventrículos do grupo C57BL/6J WT a 30°C é significativamente maior do que no grupo C57BL/6J WT a 22°C (FIG. 7). E a expressão em átrios do grupo C57BL/6J WT a 22°C foi maior do que em ventrículos de mesma temperatura (FIG. 7).

Figura 7 - Expressão do gene *Nppb* em explantes cardíacos de camundongos.



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

6 DISCUSSÃO

O presente estudo analisou, em camundongos C57BL/6J, a expressão gênica de OPN4, canais TRP e NPs no coração frente a variação de temperatura, 30°C (termoneutralidade) e 22°C (desafio de frio), e a ausência do canal TRPA1. Esse canal é considerado um receptor polimodal, cuja expressão no tecido cardíaco e uma de suas ativações são mediadas por estímulos de frio (MEENTS; CIOTU; FISCHER, 2019). Portanto, o TRPA1 pode auxiliar na melhoria da resposta vascular durante a exposição ao frio, estando envolvido no processo de vasodilatação e alterações da pressão arterial, da mesma forma que sua ausência pode prejudicar tais processos (AUBDOOL *et al.*, 2014).

Baseado na descoberta de que a OPN4 além de ser um fotorreceptor, também atua como um termo sensor (PÉREZ-CEREZALES *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2017;), temos uma ampliação significativa de sua função. No coração de mamíferos, observa-se uma alta expressão de OPN4 e também a expressão de canais TRP sensíveis a inúmeros estímulos, dentre eles as variações de temperatura (FREICHEL *et al.*, 2017).

Nossas ideias iniciais são baseadas na possibilidade de o coração atuar como um termo sensor, devido à interação entre OPN4 e os canais TRP. Tal interação permitiria a percepção da temperatura do fluxo sanguíneo advindo do trato respiratório e da periferia. O coração interpretaria essas variações de temperatura, fornecendo sinais que levam à expressão de seus principais hormônios, os NPs.

As opsinas, incluindo a rodopsina, historicamente consideradas responsáveis exclusivamente pela detecção de luz (SHEN *et al.*, 2011), têm sido objeto de estudos que sugerem sua atuação adicional em outras funções sensoriais, tal como a temperatura. Estudos em moscas *Drosophila* mostraram que as opsinas, incluindo a rodopsina e a OPN4, podem desempenhar papéis como termo sensores em associação com canais TRP, mesmo na ausência de luz (LEE; MONTELL, 2013). Em um estudo com peixe *zebrafish* (*Danio rerio*), foi observado que essas opsinas apresentaram níveis moderados a altos de expressão no coração. No entanto, o estudo não especificou em qual câmara cardíaca essas opsinas foram mais expressas, em átrios ou no ventrículo (DAVIES *et al.*, 2015).

Nossos achados apontam que a expressão de *Opn4* no coração de camundongos C57BL/6J a 30°C foi significativamente maior em átrios do que em

ventrículos. Além disso, ao comparar a termoneutralidade com o desafio de frio em camundongos *TrpA1 KO*, observou-se uma expressão significativamente maior de *Opn4* nos átrios quando expostos ao desafio de frio. Dessa maneira, nosso estudo mostra alterações significativas em relação a OPN4 principalmente nos átrios, que são as câmaras cardíacas responsáveis por receber o fluxo sanguíneo proveniente da periferia e do trato respiratório. Entre as diferentes funções atualmente atribuídas aos átrios, a função de “sensor” não é novidade. Já foi elucidada na literatura a existência de receptores denominados mecanorreceptores, localizados nas paredes atriais, conhecidos por serem de baixa pressão. Estes mecanorreceptores, quando ativados, desencadeiam respostas reflexas imediatas com o objetivo de ajustar a pressão arterial (BISHOP; MALLIANI; THORÉN, 1983). Além disso, outro importante mecanismo fisiológico que tem origem no átrio é o batimento cardíaco, sendo iniciado pela geração de um potencial de ação no nodo sinusal, localizado na parede lateral superior do átrio direito (CHEN *et al.*, 2022).

Portanto, nossos achados corroboram dados encontrados na pesquisa de dissertação de mestrado de Paula (2020; em processo de preparação para publicação) que se encontra vinculada ao projeto temático e é membro do nosso laboratório. Os estudos de Paula (2020) foram realizados com camundongos C57BL/6J selvagens, *TrpA1 KO* e *TrpV1 KO* expostos a termoneutralidade (30°C) por duas semanas. Os resultados do qPCR indicaram uma maior expressão de *Opn4* nos átrios em relação aos ventrículos, tanto em animais selvagens quanto em *TrpA1 KO*, embora sem diferença estatisticamente significativa (PAULA, 2020).

Levando-se em conta o que foi visto, mesmo com toda a escassez de informação na literatura a respeito da expressão de *Opn4* no coração, em nosso estudo observamos que a expressão desse gene ocorre tanto nos átrios quanto nos ventrículos, sendo mais significativa nos átrios. Esse achado reforça nossa hipótese de que a OPN4 desempenha função de termo sensibilidade e possivelmente está interagindo com os canais TRP na percepção da temperatura.

Em suma, a OPN4 pode ser ativada por luz ou temperatura (MORAES *et al.*, 2017). Ademais, o processo de fototransdução de OPN4 nas células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina (ipRGCs), desencadeia uma cascata de sinalização dependente de proteína G tipo Gq/11. Logo a fosfolipase C (PLC β 4) é ativada, proporcionando a abertura dos canais TRP por PIP2 e permitindo a entrada de Ca²⁺ intracelular. Esse influxo iônico desencadeia eventos intracelulares, gerando

potenciais de ação nas ipRGCs. Tais potenciais de ação são transmitidos ao NSQ no hipotálamo, culminando com a liberação de glutamato, ajustando o relógio biológico central ao ciclo claro-escuro, o qual regula o ritmo circadiano. Dessa maneira, essa interação é importante para a transdução do sinal de luz em um sinal elétrico e na modulação da maquinaria molecular do relógio, podendo afetar diversas funções biológicas (ISOLDI *et al.*, 2005; POLETINI *et al.*, 2015).

Portanto, uma vez estimulada a OPN4, canais TRP são ativados promovendo o influxo de Ca^{2+} celular (YUE *et al.*, 2015). Os canais TRP encontram-se presentes em muitos órgãos e tecidos, tal como o coração.

Por conseguinte, como já descrito pela literatura, uma das formas de ativação do canal TRPV1 é a elevação da temperatura (KASHIO; TOMINAGA, 2022). Em relação a expressão de *Trpv1* observada em nosso estudo, não encontramos diferenças significativas entre os grupos, tanto para as temperaturas expostas, como para os diferentes genótipos. Embora esses resultados não tenham mostrado diferenças significativas, é essencial continuar investigando esse canal levando em conta que a expressão proteica e sua ativação podem se alterar por processos pós-transcricionais (BENÍTEZ-ANGELES *et al.*, 2020). Tais mecanismos não foram explorados por esse estudo, mas estão envolvidos em processos patológicos e de proteção para o coração (WANG *et al.*, 2022). Novas pesquisas nesse campo contribuirão para uma melhor compreensão de seu papel no contexto cardiovascular.

Ao contrário do canal TRPV1, a ativação do canal TRPA1 dá-se pelo frio (MEENTS; CIOTU; FISCHER, 2019). Em nosso estudo, a expressão deste canal foi identificada tanto em átrios quanto em ventrículos, porém camundongos expostos ao desafio de frio (22°C), apresentaram maior expressão desse gene quando comparado com os animais expostos a 30°C. Esses achados reforçam que tanto a transcrição como a ativação do TRPA1 podem ocorrer perante a redução da temperatura ambiente, podendo auxiliar na melhoria da resposta vascular (AUBDOOL *et al.*, 2014).

Ma e Wang (2022) investigaram o papel do TRPA1 na fibrose cardíaca relacionada à idade. Foram utilizados no estudo camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para *Trpa1*, com 12 e 52 semanas de idade. Os resultados apontaram que os camundongos nocautes para *Trpa1* mais velhos apresentaram aumento da fibrose cardíaca, dilatação ventricular e disfunção cardíaca, em comparação a

camundongos selvagens de mesma idade que expressavam o canal. Além disso, a expressão de genes relacionados à fibrose foi afetada nos camundongos de 52 semanas de idade nocautes para *Trpa1*. Dadas essas informações, é possível concluir que o canal TRPA1 exerce um papel protetor no coração frente a determinadas condições patológicas e que sua ausência contribui para o agravamento do quadro.

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

Assim como o canal TRPA1, uma das formas de ativação do canal TRPM8 ocorre por estímulos de frio (YIN et al.,2022). Em nosso estudo, a expressão de *Trpm8* no coração ocorreu tanto em átrios quanto em ventrículos, sendo que em ventrículos de camundongos *Trpa1 KO* houve maior expressão no desafio de frio. E os camundongos em termoneutralidade, apresentaram maior expressão nos átrios.

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

3, RhoA e ROCK2 durante a reperfusão normotérmica. Em suma, a reperfusão hipotérmica a 25°C demonstrou proteger o miocárdio contra a lesão de isquemia/reperfusão, através da ativação do canal TRPM8 e inibição da via de sinal RhoA/ROCK2 relacionada ao estresse oxidativo.

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

Nosso estudo mostra que o canal TRPM8 se encontra expresso em átrios e ventrículos e que durante o desafio de frio, os camundongos nocautes apresentaram maior expressão de *Trpm8*. Isso nos leva a hipótese descrita na literatura (MULLER; MORALES; REGGIO, 2019; KUDSI *et al.*, 2022) de que canais TRP, particularmente TRPA1 e TRPM8, podem atuar como canais de compensação quando a atividade de um deles está inativa. Tais mecanismos são fundamentais para a manutenção da homeostase celular e fisiológica, permitindo que as células e os organismos se adaptem a mudanças e preservem sua funcionalidade adequada mesmo diante de perturbações ou mutações. É importante ressaltar que esse canal também desempenha um papel protetor para o coração, quando este órgão está exposto a condições desfavoráveis (IZQUIERDO *et al.*, 2021).

Dessa forma, observamos em nossos achados que a expressão dos genes dos canais TRPV1, TRPA1 e TRPM8 ocorreu tanto em átrios, quanto em ventrículos. Além disso, os átrios tiveram maior expressão do que os ventrículos, o que corrobora para nossa hipótese de que possivelmente tais canais estejam interagindo com a OPN4 para percepção da temperatura do fluxo sanguíneo aferente ao coração.

Os NPs são os principais hormônios do coração e desempenham um papel importante na regulação da pressão arterial e do volume sanguíneo, bem como na função cardíaca (CORTE *et al.*, 2023). Um dos fatores que pode influenciar a expressão de NPs é a temperatura. Um estudo de Bordicchia e colaboradores (2012), mostrou que camundongos expostos a temperaturas frias apresentaram níveis elevados de NPs circulantes. Os NPs atuam no tecido adiposo, ativando a termogênese para a manutenção da temperatura corpórea. Uma vez que a

expressão de pró-hormônios dos NPs deve ser afetada pela temperatura ambiente, analisamos a expressão dos genes *Nppa* e *Nppb* em átrios e ventrículos dos animais expostos a termoneutralidade e desafio de frio.

Em nossos achados, a expressão de precursores de NPs indicou que *Nppa* é expresso em átrios e ventrículos, sendo significativamente diferentes entre camundongos *TrpA1 KO* a 30°C e 22°C. Em contrapartida, a expressão de *Nppb* teve diferença significativa entre camundongos C57BL/6J WT 30°C e 22°C. Tais achados demonstram que a expressão dos NPs no coração varia significativamente conforme a temperatura ambiente à qual os camundongos foram expostos e nas diferentes câmaras cardíacas.

Öztop e colaboradores (2019) investigaram os efeitos dos NPs na função cardíaca durante a hibernação de esquilos terrestres da Anatólia (*Spermophilus xanthoprimum*). Os resultados demonstraram que os esquilos hibernadores reduzem a temperatura corporal, os batimentos cardíacos e o consumo de oxigênio, mas não sofrem problemas cardiovasculares. Além disso, os NPs foram encontrados em diferentes câmaras cardíacas durante a hibernação. Portanto, sugere-se que os achados contribuem para nossa hipótese de que o coração esteja atuando como um órgão de monitoramento da temperatura.

A expressão de *Nppa* e *Nppb* no coração traz benefícios ao órgão cardíaco, ajudando a manter a homeostase e protegendo o organismo contra desequilíbrios nos fluidos e na pressão arterial. Um exemplo disso é a expressão de *Nppb* em situações de estresse cardíaco, nas quais o coração desempenha um papel crucial na preservação da homeostase e na prevenção desses desequilíbrios, que podem ocorrer na insuficiência cardíaca ou em outras DCVs. (NAKAGAWA; NISHIKIMI; KUWAHARA, 2018).

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

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

Diante das evidências apresentadas, sugerimos que a OPN4 em conjunto com os canais TRP expressos nas câmaras atriais do coração, possam estar detectando variações na temperatura da corrente sanguínea. Essa percepção, por sua vez, poderia desencadear a liberação dos NPs neste órgão, resultando na modulação do metabolismo local. Tais sugestões reforçam a hipótese de que o coração desempenha a função de monitoramento da temperatura corporal. Estes achados contribuem para o campo da fisiologia cardiovascular, fornecendo novas perspectivas de pesquisa e compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos no controle térmico em nível sistêmico. Vale enfatizar, entretanto, que essa mesma liberação de NPs acontece via ativação do simpático pelo frio ambiental, o que não pode ser excluído. Ressalta-se, assim, a necessidade de estudos adicionais em explantes das câmaras cardíacas ou cardiomiócitos para validar e aprofundar os mecanismos subjacentes a essa interação.

Em paralelo a esta pesquisa, foram avaliados estes mesmos protocolos em camundongos alimentados com *high-fat diet* (HFD, dados ainda não publicados). Posteriormente, em conjunto, será analisada a diferença de expressão gênica observada em animais alimentados por dieta normal e HFD.

7 CONCLUSÃO

Os dados da presente pesquisa, fornecem evidências que contribuem para nossa hipótese de que há uma interação entre o fotorreceptor e termo sensor OPN4 com os canais TRP. Ambos atuando juntos como prováveis sensores de temperatura no coração. Tais mecanismos sensoriais podem desempenhar um papel significativo na detecção e resposta às variações térmicas do fluxo sanguíneo advindo do trato respiratório e da periferia. A expressão desses sensores é significativamente maior nos átrios, influenciando assim a expressão e secreção dos NPs nas câmaras cardíacas. No entanto, são necessárias mais análises para que se possa compreender como as câmaras cardíacas respondem a tais flutuações de temperatura, o que nos levará a investigar os mecanismos envolvidos nessas vias de sinalização.

Além disso, esse estudo sugere que a ausência do canal TRPA1 exerceu influência na regulação da expressão do canal TRPM8, dada a natureza desses canais como sensores de temperaturas frias. É possível que a ausência do canal TRPA1 tenha desencadeado uma reorganização adaptativa no organismo, uma vez que esse canal estava ausente. Desse modo, podendo atuar como um mecanismo compensatório na modulação da expressão do canal TRPM8. Em contrapartida, o canal TRPV1 não demonstrou um efeito significativo sobre a ausência de TRPA1, o que está em consonância com sua função de sensor de calor. Tais observações fomentam a compreensão de uma possível interação entre esses canais que na ausência de um, o outro pode assumir as demandas requeridas.

REFERÊNCIAS

- ANDREI, S. R., *et al.* Stimulation of TRPA1 attenuates ischemia-induced cardiomyocyte cell death through an eNOS-mediated mechanism. **Channels**, v. 13, n. 1, p. 192-206, 1 jan. 2019.
- AUBDOOL, A. A., *et al.* TRPA1 is essential for the vascular response to environmental cold exposure. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 11 dez. 2014.
- AIRES, M. de M. **Fisiologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
- BENÍTEZ-ANGELES, M., *et al.* TRPV1: structure, endogenous agonists, and mechanisms. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3421, 12 maio 2020.
- BENNETT, B. D., *et al.* Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 34, p. 23060–23067, 1991.
- BERS, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198-205, jan. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/415198a>
- BERSON, D. M; DUNN, F. A; TAKAO, M. Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. **Science**, v. 295, n. 5557, p.1070-1073, 8 fev. 2002.
- BISHOP, V. S.; MALLIANI, A.; THORÉN, P. Cardiac Mechanoreceptors. **Comprehensive Physiology**, p. 497-555, dez. 1983. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.cp020315>.
- BLIGH, J.; JOHNSON, K. G. Glossary of terms for thermal physiology. **Journal of Applied Physiology**, v. 35, n. 6, p. 941-961, 1973.
- BOLD, A. J., *et al.* A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sciences**, v. 28, n. 1, p. 89-94, 5 jan. 1981.
- BONNEMAIN, J.; NIDO, P. J. del; ROCHE, E. T. Direct Cardiac Compression Devices to Augment Heart Biomechanics and Function. **Annual Review Of Biomedical Engineering**, v. 24, n. 1, p. 137-156, 6 jun. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-bioeng-110220-025309>.
- BON-MATHIER, A. C., *et al.* Brain Natriuretic Peptide Protects Cardiomyocytes from Apoptosis and Stimulates Their Cell Cycle Re-Entry in Mouse Infarcted Hearts. **Cells**, v. 12, n. 1, p. 7, 20 dez. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/cells12010007>.

BORDICCHIA, M., *et al.* Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p.1022-1036, 1 mar. 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DÍAZ, N. M.; MORERA, L. P.; GUIDO, M. E. Melanopsin and the non-visual photochemistry in the inner retina of vertebrates. **Photochem Photobiol**, v. 92, n. 1, p. 29-44, 2016.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ISOLDI, M. C., *et al.* Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 102, n. 4, p. 1217-1221, 14 jan. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409252102>.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MATHEW, P.; KANMANTHAREDDY, A. **Prosthetic Heart Valve**. Treasure Island: Statpearls Publishing, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536987/>.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PERTUSA, M. *et al.* Mutagenesis and temperature-sensitive little machines. **Mutagenesis**, p. 221-246, 2012.

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

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

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

POLETINI, M. O., *et al.* TRP channels: a missing bond in the entrainment mechanism of peripheral clocks throughout evolution. **Temperature**, v. 2, n. 4, p. 522-534, 30 dec. 2015.

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

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

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

RANDALL, A. S., *et al.* Speed and sensitivity of phototransduction in *Drosophila* depend on degree of saturation of membrane phospholipids. **J Neurosci**, v. 35, n. 6, p. 2731-2746, 2015.

- ROOIJ, E.; OLSON, E. N. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 177, n. 9, p. 2369–2376, 2007.
- ROSE, R. A; GILES, W. R. Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 2, p. 353–366, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.144253>
- RUBATTU, S., *et al.* Molecular Implications of Natriuretic Peptides in the Protection from Hypertension and Target Organ Damage Development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 798, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20040798>
- SAMANTA, A., HUGHES, T. E. T., MOISEENKOVA-BELL, V. Y. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 87, p. 141–165, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_6
- SARZANI, R., *et al.* Role of Cardiac Natriuretic Peptides in Heart Structure and Function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 14415, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms232214415>
- SHEN, W. L., *et al.* Function of rhodopsin in temperature discrimination in *Drosophila*. **Science**, v. 331, n. 6022, p. 1333–1336, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1198904>
- SHETH, T., *et al.* Increased winter mortality from acute myocardial infarction and stroke: the effect of age. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 33, n. 7, p. 1916–1919, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(99\)00137-0](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(99)00137-0)
- SHI, F., *et al.* Diet-dependent natriuretic peptide receptor C expression in adipose tissue is mediated by PPAR γ via long-range distal enhancers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 297, n. 2, aug. 2021.
- SENGENES, C., *et al.* Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. **FASEB J**, v. 14, p. 1345-1351, 2000.
- SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 7^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- SPEKKER, E., KÖRTÉSI, T., VÉCSEI, L. TRP Channels: Recent Development in Translational Research and Potential Therapeutic Targets in Migraine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 700, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24010700>
- SUDOH, T., *et al.* A new natriuretic peptide in porcine brain. **Nature**, v. 332, n. 6159, p. 78–81, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/332078a0>
- SUDOH, T., *et al.* C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. **Biochemical and Biophysical Research**

Communications, v. 168, n. 2, p. 863–870, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)92401-k](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)92401-k)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

YUE, Z., *et al.* Role of TRP channels in the cardiovascular system. **American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology**, v. 308, n. 3, p. H157-H182, 1 fev. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00457.2014>.

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

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

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

ANEXOS

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



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DO DESAFIO AO FRIO SOBRE A EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS NOS ÁTRIOS DIREITO E ESQUERDO EM CAMUNDONGOS COM CAQUEXIA: PAPEL DA MELANOPSINA E DOS CANAIS TRPs NA TERMORRECEPÇÃO", protocolada sob o CEUA nº 6011300621 (ID 000650), sob a responsabilidade de **Mauro Cesar Isoldi e equipe; Leticia Teresinha Resende** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 15/10/2021.

We certify that the proposal "EFFECTS OF THE COLD CHALLENGE ON THE EXPRESSION OF NATRIURETIC PEPTIDES IN THE RIGHT AND LEFT ATRIAS IN CACHEXIC MICE: ROLE OF MELANOPIN AND TRP CHANNELS IN TERMO-RECEPTION", utilizing 76 Isogenics mice (76 males), protocol number CEUA 6011300621 (ID 000650), under the responsibility of **Mauro Cesar Isoldi and team; Leticia Teresinha Resende** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 10/15/2021.

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

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

Origem:	Centro de Ciência Animal	sexo:	Machos	idade:	8 a 10 semanas	N:	76
Espécie:	Camundongos isogênicos			Peso:	15 a 20 g		
Linhagem:	C57BL/6						

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Centro de Ciência Animal UFOP.

Ouro Preto, 15 de outubro de 2021

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

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

ANEXO B - VALIDAÇÃO DA GENOTIPAGEM *TRPA1* KO

22/08/2019

Master Protocol Details


[Return to Protocol Search](#)

Stock Number: 006401

Strain Name: B6-129P-Trpa1^{tm1Kykwl}JAllele: *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
ddH ₂ O	up to final volume		1	94	2 min	
Kapa 2G HS buffer	1.3	X	2	94	20sec	
MgCl ₂	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 C - CURVA DE MELTING REFERENTE A AMPLIFICAÇÃO DO NPPA