

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e
Farmacologia

TESE DE DOUTORADO

**O receptor β 2-adrenérgico modula a transcrição de *Per1* no
coração via PI3K γ -ERK1/2-CREB**

Itamar Couto Guedes de Jesus
Orientadora: Silvia Guatimosim
Coorientadora: Maristela de Oliveira Poletini

Belo Horizonte, MG

Outubro/2020

Itamar Couto Guedes de Jesus

**O receptor β 2-adrenérgico modula a transcrição de *Per1* no
coração via PI3K γ -ERK1/2-CREB**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Silvia Guatimosim

Coorientadora: Maristela de Oliveira Poletini

Belo Horizonte, MG

Outubro/2020

043 Jesus, Itamar Couto Guedes de.
O receptor β 2-adrenérgico modula a transcrição de Per1 no coração via PI3K γ -ERK1/2-CREB [manuscrito] / Itamar Couto Guedes de Jesus. – 2020.
102 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Silvia Guatimosim. Coorientadora: Maristela de Oliveira Poletini.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Coração. 3. Receptores Adrenérgicos beta 2. 4. Proteína de Ligação ao Elemento de Resposta ao AMP Cíclico. 5. Relógios Biológicos. I. Guatimosim, Silvia. II. Poletini, Maristela de Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 327 DE ITAMAR COUTO GUEDES DE JESUS

Às 14:00 horas do dia 27 do mês de outubro de 2020, através de Webconferência por meio da Plataforma Zoom, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Itamar Couto Guedes de Jesus**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci**, IB/Universidade de São Paulo, **Profa. Dra. Ivanita Stefanon**, Centro Biomédico/Universidade Federal do Espírito Santo, **Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Thiago Verano Braga**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, coordenadora, e **Profa. Dra. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**O Receptor β_2 -adrenérgico Modula a Transcrição de *Per1* no Coração via *PI3K*-*ERK1/2*-*CREB***". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 27 de outubro de 2020.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Ivanita Stefanon, Usuário Externo**, em 29/10/2020, às 08:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Maria de Lauro Castrucci, Usuário Externo**, em 29/10/2020, às 09:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca, Professora do Magistério Superior**, em 29/10/2020, às 12:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Verano Braga, Professor do Magistério Superior**, em 29/10/2020, às 15:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maristela de Oliveira Poletini, Professora do Magistério Superior**, em 29/10/2020, às 15:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jader dos Santos Cruz, Chefe de departamento**, em 29/10/2020, às 16:18, 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 https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0331236** e o código CRC **64B0C768**.

Universidade Federal de Minas Gerais

Reitora: Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitoria de Pós-Graduação

Pró-Reitor: Prof. Fábio Alves da Silva Júnior

Instituto de Ciências Biológicas

Diretor: Prof. Carlos Augusto Rosa

Vice-Diretora: Prof^a. Élide Mara Rabelo

Departamento de Fisiologia e Biofísica

Chefe: Prof^a. Grace Schenatto Pereira Moraes

Subchefe: Prof. Thiago Verano Braga

Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Coordenadora: Prof^a. Silvia Guatimosim

Vice-Coodenador: Prof. Raphael Escorsim Szawka

Apoio Institucional e Financeiro

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sinalização Cardíaca em colaboração com o Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, ambos situados no Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG, e teve auxílio financeiro das seguintes instituições:

- i) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- ii) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) e
- iii) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Dedico esta tese de doutorado aos meus pais, Acivaldo e Eunice, e as minhas irmãs, Lígia, Hérica e Renata.

Sumário

I. Resumo...	i
II. Abstract...	iv
III. Lista de Figuras...	vii
IV. Lista de Tabelas...	xi
V. Lista de Abreviaturas...	xii
VI. Agradecimentos...	xv
1. Introdução...	1
2. Revisão da Literatura...	2
2.1. <i>Ritmos Circadianos e os Relógios Biológicos</i> ...	2
2.2. <i>Maquinaria Molecular do Relógio Biológico – Clock Genes</i> ...	7
2.3. <i>Sincronizadores do Relógio Biológico – Clock Input</i> ...	9
2.4. <i>Genes Controlados pelos Clock Genes – Clock Output</i> ...	12
2.5. <i>O Relógio Biológico Cardíaco</i> ...	14
2.6. <i>Ritmo Circadiano e Doenças Cardíacas</i> ...	16
2.6.1. <i>Ritmo Circadiano e Doenças Cardíacas em Humanos</i> ...	16
2.6.2. <i>Clock Genes e Doenças Cardíacas em Modelos Experimentais</i> ...	18
2.7. <i>Sincronizadores do relógio biológico cardíaco</i> ...	21
2.8. <i>Os receptores β-adrenérgicos e o coração</i> ...	22
2.9. <i>Os receptores β-adrenérgicos como reguladores dos clock genes</i> ...	24
3. Hipótese...	26

4. Justificativa...27

5. Objetivo...28

5.1. Objetivo Geral...28

5.2. Objetivos Específicos...28

6. Materiais e Métodos...30

6.1. Aspectos Éticos...30

6.2. Animais...30

6.3. Desnervação simpática periférica...30

6.4. Tratamento *in vivo* com propranolol, isoproterenol e atenolol...31

6.5. Tratamento *in vivo* com dobutamina e formoterol...34

6.6. Tratamento *in vivo* com PD 98059 e 666-15...35

6.7. Implante do sensor e registro da atividade locomotora espontânea e temperatura corporal...36

6.8. Registro da frequência cardíaca por telemetria...37

6.9. Isolamento de cardiomiócito ventricular de animais adultos e tratamento *in vitro* com isoproterenol...38

6.10. Avaliação da contratilidade celular de cardiomiócitos...39

6.11. Análise da hipertrofia cardíaca...39

6.12. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)...40

6.12.1. Extração do RNA...40

6.12.2. Tratamento do RNA com DNase...41

6.12.3. Síntese do cDNA, amplificação e quantificação do mRNA...41

6.13. Western blotting...43

6.14. Fracionamento de proteínas do citoplasma/núcleo de cardiomiócitos...45

6.15. Imunofluorescência...46

6.16. Avaliação *in vitro* da atividade do promotor CRE...47

6.17. Avaliação *ex vivo* da atividade do promotor CRE...48

6.18. Análise Estatística...48

7. Resultados...49

7.1. A desnervação simpática periférica altera a expressão e oscilação dos clock genes no coração...49

7.2. O *Per1* é sensível a alterações na sinalização β -adrenérgica no coração...56

7.3. O eixo β -AR-PI3Ky-ERK1/2 regula a transcrição de *Per1* no coração...65

7.4. A transcrição de *Per1* no coração é dependente do recrutamento do complexo CREB/CRE pela sinalização β -adrenérgica...69

7.5. O receptor β 2-adrenérgico regula positivamente a transcrição de *Per1* no coração...72

8. Discussão...76

8.1. A inervação simpática e o relógio biológico cardíaco...76

8.2. O *Per1* como alvo da sinalização β -adrenérgica no coração...80

8.3. Um fosfo-mecanismo regula a transcrição de *Per1* no coração...83

8.4. A ERK1/2 participa do recrutamento do complexo CREB/CRE e contribui para transcrição de Per1 no coração...87

8.5. Os receptores β 2-adrenérgicos são os responsáveis pela transcrição de Per1 no coração...89

9. Conclusão...92

10. Referências Bibliográficas...93

I. Resumo

Os relógios biológicos preparam o organismo frente às alterações no ambiente externo que ocorrem ao longo de 24 horas. No coração, este relógio biológico participa do controle de vários parâmetros relacionados à função cardíaca, e alterações no seu padrão de oscilação têm sido ligados ao desenvolvimento de doenças. Para que este relógio biológico funcione adequadamente o mesmo deve ser reiniciado todos os dias. Entretanto, as pistas ou sincronizadores dos *clock genes* (*Clock*, *Bmal1*, *Per1/2/3*, *Cry1/2*, *Rev-Erba* e *Ror*) que compõem o relógio biológico cardíaco ainda não são totalmente conhecidos. Neste sentido, sabe-se que *in vitro* e *ex vivo* a estimulação adrenérgica regula os *clock genes* tanto no cardiomiócito, quanto em nível do órgão por inteiro sugerindo que esta via é uma importante sincronizadora do relógio biológico cardíaco. O objetivo deste trabalho é avaliar *in vivo* se a sinalização adrenérgica é capaz de sincronizar os *clock genes* no coração. E se caso afirmativo, investigar o mecanismo molecular envolvido nesse fenômeno. Para esclarecer este hiato utilizamos neste trabalho uma abordagem experimental que combina modelos geneticamente modificados e ferramentas farmacológicas (CEUA: 236/2019). Camundongos foram tratados com a droga 6-hidroxidopamina (6-OHDA) com o objetivo de promover a desnervação simpática. A expressão dos principais *clock genes* no coração foi avaliada por PCR em tempo real em diferentes *zeitgeber time* (ZT). O tratamento com 6-OHDA induziu a diminuição na expressão do *Clock* e *Bmal1*, e alterou de circadiano para ultradiano o ritmo de oscilação do *Per1* no coração. Importante, essas alterações ocorreram em um ambiente em que o relógio biológico central estava preservado. Além disto, injeções do β -bloqueador propranolol, preveniram tanto o aumento da

frequência cardíaca que ocorre na transição entre as fases clara e escura, quanto o aumento de *Per1* observado no ZT13. Nesta condição, não foram observadas alterações nos demais clock genes investigados. Já o aumento da atividade simpática promovido na fase clara pelo tratamento com isoproterenol (ISO), foi capaz de induzir a oscilação transitória do *Per1* cardíaco. A inibição da ERK1/2 preveniu o efeito do ISO na expressão de *Per1*, assim como a inibição da PI3K γ . Em conjunto estes dois resultados apontam para *Per1* como um alvo importante da sinalização β -adrenérgica no coração e indicam que essa modulação é realizada por um fosfo-mecanismo que envolve as quinases PI3K γ e ERK1/2. Para aprofundar no conhecimento acerca do mecanismo transcricional envolvido no controle deste gene, células repórter luciferase HEK-CREB/CRE-LUC foram estimuladas com ISO. O ISO promoveu um aumento concentração-dependente na atividade do promotor CRE, que foi bloqueado por PD 98059, um inibidor da ERK1/2. Corroborando este dado, foi observado aumento na fosforilação do CREB na fração nuclear de cardiomiócitos ventriculares e de bioluminescência no coração de camundongos CRE-Luciferase Reporter tratados com ISO. Importante, a inibição de CREB atenuou o efeito do ISO no aumento da transcrição de *Per1* no coração. Em conjunto, estes resultados mostram evidências contundentes de que a sinalização adrenérgica controla a expressão de *Per1* no coração. Curiosamente, observou-se aumento na expressão proteica do receptor β 2-adrenérgico no coração no ZT13. Camundongos tratados com atenolol na transição entre as fases clara e escura, não apresentaram alteração na oscilação de *Per1* no coração entre os ZT1 e ZT13, sugerindo que o receptor β 1-adrenérgico não participa da regulação da transcrição de *Per1* no coração.

Para confirmar este dado, tratamos camundongos com agonistas específicos para o receptor β 1 (dobutamina) ou β 2-adrenérgico (formoterol) e avaliamos a expressão de *Per1*. De forma interessante, apenas o tratamento com formoterol induziu aumento da fosforilação da ERK1/2 e expressão de *Per1* no coração, sem ocorrer nenhum efeito da dobutamina nestes parâmetros. Em conjunto, estes dados demonstram que o receptor β 2-adrenérgico controla a atividade transcricional do *Per1* cardíaco via um fosfo-mecanismo mediado pela PI3Ky-ERK1/2-CREB-CRE.

Palavras-chaves: *clock genes*, coração, sinalização adrenérgica, CREB, receptor β 2-adrenérgico.

II. Abstract

Biological clock enables the organism to anticipate and adapt to changes in environmental conditions that occur over the period of 24 hours. In the heart, its intrinsic biological clock participates in the control of several parameters related to cardiac function, and changes in its oscillation pattern have been linked to the development of diseases. In order for this clock machinery to work properly it needs to be reinitiated in a daily basis. However, the synchronizers of clock genes (*Clock*, *Bmal1*, *Per1/2/3*, *Cry1/2*, *Rev-Erba* and *Ror*) in the heart are not well known. In this sense, it is known that in vitro and ex vivo adrenergic stimulation regulates the clock genes in the cardiomyocyte level, as well as in the whole organ suggesting that this pathway plays an important role synchronizing the clock genes in the heart. Our goal in this work is to assess in vivo the role of adrenergic signaling as a modulator of clock genes in the heart, and if so to investigate the downstream mechanisms involved in this phenomenon. To address this gap, we used a combination of genetically engineered mice models and pharmacological tools (CEUA: 236/2019). 6-hydroxydopamine (6-OHDA) was injected in mice to promote cardiac sympathetic denervation, and clock gene expression was evaluated at different zeitgeber time (ZT). Accordingly, 6-OHDA mice downregulated *Clock* and *Bmal1*, and changed *Per1* oscillation pattern in the heart from circadian to ultradian. Importantly, these changes occurred in a condition, in which the central biological clock was preserved. In addition, injection of the β -blocker propranolol prevented both the increase in heart rate that occurs in the transition between the light and dark phases, and the increase in *Per1* observed in the ZT13. Under this condition, there were no changes in expression levels in

the other clock genes evaluated. The increase in sympathetic activity promoted in the light phase by treatment with isoproterenol (ISO) was able to induce the transient oscillation of cardiac *Per1*. The inhibition of ERK1/2 prevented the effect of ISO on the expression of *Per1*, as well as the inhibition of PI3K γ . Together these two results point to *Per1* as an important target of β -adrenergic signaling in the heart and highlighting the role of phospho-mechanism mediated by PI3K γ and ERK1/2 kinases in this process. To deepen the knowledge regarding the transcriptional mechanism involved in the control of *Per1*, HEK-CREB / CRE-LUC luciferase reporter cells were stimulated with ISO. ISO promoted a concentration-dependent increase in CRE promoter activity, which was inhibited by PD 98059, an ERK1/2 inhibitor. Corroborating these data, an increase in CREB phosphorylation in the nuclear fraction of ventricular cardiomyocytes was seen, as well as enhanced bioluminescence was detected in the heart of CRE-Luciferase Reporter mice treated with ISO. Importantly, CREB inhibition partially prevented the upregulation of *Per1* by ISO in the heart. Thus, these results show overwhelming evidence that adrenergic signaling controls *Per1* expression in the heart. Along these lines, we detected an increase in protein expression of the β 2-adrenergic receptor in the heart at ZT13. Moreover, mice treated with atenolol during the transition between the light and dark phases, presented normal *Per1* oscillation in the heart between ZT1 and ZT13, suggesting that the β 1-adrenergic receptor does not participate in the regulation of *Per1* transcription in the heart. To confirm this data, we used specific agonists for the β 1 (dobutamine) or β 2-adrenergic (formoterol) receptors. Notably, treatment of mice with formoterol induced an increase in ERK1/2 phosphorylation and *Per1* expression, while dobutamine showed no

effects. Altogether, our findings show that β 2-adrenergic receptors control the transcriptional activity of *Per1* in the heart via a PI3Ky-ERK1/2-CREB-CRE-mediated phospho-mechanism.

Keywords: clock genes, heart, adrenergic signaling, CREB, β 2-adrenergic receptor.

III. Lista de Figuras

Figura 1: Esquema ilustrativo de variáveis fisiológicas que apresentam ritmo circadiano. ...**3**

Figura 2: Esquema ilustrativo dos diferentes sinais fisiológicos que mantêm a comunicação entre o núcleo supraquiasmático e os relógios periféricos. ...**6**

Figura 3: Esquema ilustrativo das inter-relações entre os principais componentes do relógio biológico. ...**9**

Figura 4: Esquema ilustrativo do mecanismo envolvido na sincronização do relógio biológico central através do sinal luminoso. ...**11**

Figura 5: Esquema ilustrativo dos principais sincronizadores dos relógios biológicos central e periféricos. ...**12**

Figura 6: Registro da frequência cardíaca (BPM) de forma não-invasiva em homens adultos e saudáveis ao longo de 24 horas (*clock time*). ...**15**

Figura 7: Distribuição do número de episódios de isquemia do miocárdio em humanos ao longo do dia. ...**17**

Figura 8: Imagens representativas de cortes transversais de coração de camundongos *Wild-Type* (A) e *Bmal1^{-/-}* (B). ...**19**

Figura 9: Esquema ilustrativo das principais vias intracelulares ativadas pelo receptor β -adrenérgico no cardiomiócito ventricular. ...**24**

Figura 10: Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no tratamento com a 6-OHDA em camundongos. ...**31**

Figura 11: Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no tratamento com propranolol e registro da frequência cardíaca. ...**32**

Figura 12: Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no tratamento com isoproterenol e registro da frequência cardíaca. ...**33**

Figura 13: a) Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no tratamento crônico com isoproterenol. b) Esquema temporal dos momentos circadianos em que os coração foram coletados após o tratamento crônico com isoproterenol. ...**33**

Figura 14: Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no tratamento com atenolol. ...**34**

Figura 15: Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no tratamento com dobutamina e formoterol. ...**35**

Figura 16: Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no pré-tratamento com os inibidores PD 98059 e 666-15, antes da injeção de isoproterenol. ...**36**

Figura 17: Exemplo da análise da contratilidade celular de cardiomiócito ventricular de camundongo utilizando o programa IonWizard. ...**39**

Figura 18: Exemplo da realização da análise da área celular de cardiomiócitos utilizando o software Zen 2012. ...**40**

Figura 19: 6-OHDA promove redução do ganho de peso corporal e não altera a razão peso do coração/tíbia esquerda em camundongos. ...**49**

Figura 20: O tratamento com 6-OHDA promove diminuição na expressão da TH no ventrículo esquerdo de camundongos. ...**50**

Figura 21: O tratamento com 6-OHDA não altera a expressão da ChAT e VACHT no coração de camundongos. ...**51**

Figura 22: A desnervação simpática do coração altera a expressão e oscilação dos clock genes cardíaco. ...**53**

Figura 23: O tratamento intraperitoneal com 6-OHDA não altera a expressão da TH no cérebro de camundongos. ...**54**

Figura 24: 6-OHDA não altera a atividade locomotora espontânea e a temperatura corporal de camundongos. ...**55**

Figura 25: Aumento da função contrátil de cardiomiócitos ventriculares de camundongo é observado no ZT13. ...**57**

Figura 26: O bloqueio β -adrenérgico previne a flutuação da frequência cardíaca e o aumento na expressão de *Per1* durante a transição da fase clara para escura em camundongos. ...**59**

Figura 27: O tratamento com isoproterenol durante a fase clara aumenta a frequência cardíaca de camundongos. ...**60**

Figura 28: O estímulo β -adrenérgico durante a fase clara promove um aumento transitório de *Per1* no coração. ...**61**

Figura 29: Cardiomiócitos ventriculares tratados com ISO apresentam aumento na expressão de *Per1*. ...**62**

Figura 30: O tratamento crônico com isoproterenol causa hipertrofia cardíaca. ...**63**

Figura 31: Tratamento crônico de camundongos com ISO previne aumento da expressão de *Per1* no ZT13. ...**64**

Figura 32: Esquema ilustrativo mostrando as alterações observadas na oscilação/expressão do *Per1* no coração de camundongo após o tratamento com 6-OHDA, propranolol, isoproterenol agudo e isoproterenol crônico. ...**65**

Figura 33: A ativação de ERK1/2 é importante para a *upregulation* de *Per1* no coração. ...**66**

Figura 34: A regulação da expressão de *Per1* pelos receptores β -adrenérgicos depende da atividade quinase da PI3K γ**67**

Figura 35: A expressão e a atividade de receptores β -adrenérgicos está preservada em camundongos PI3K γ ^{KD/KD}. ...**68**

Figura 36: O complexo CREB/CRE é ativado pela sinalização β -adrenérgica. ...**70**

Figura 37: A ERK1/2 participa da ativação do complexo CREB/CRE promovido pela sinalização β -adrenérgica. ...**71**

Figura 38: A sinalização β -adrenérgica ativa o promotor CRE e regula a expressão de *Per1* cardíaco. ...72

Figura 39: A expressão do receptor β 2-adrenérgico cardíaco é maior durante o ZT13. ...73

Figura 40: O bloqueio β 1-adrenérgico não impede o aumento na expressão do *Per1* no ZT13. ...74

Figura 41: Os receptores β 2-adrenérgicos regulam positivamente a transcrição do *Per1* cardíaco através da via de sinalização ERK1/2-CREB/CRE. ...75

Figura 42: Esquema ilustrativo da cascata de sinalização desencadeada pelos receptores β 2-adrenérgicos, que culmina na transcrição de *Per1* no coração. ...91

IV. Lista de Tabelas

Tabela 1: Modelos geneticamente modificados e seus respectivos impactos na estrutura e função cardíaca. Tabela adaptada de: Crnko *et. al.*, 2019. ...20

Tabela 2: Lista com as sequências dos primers utilizados no RT-qPCR. ...42

Tabela 3: Lista dos anticorpos primários utilizados para o *western blotting*. ...45

Tabela 4: Lista dos anticorpos secundários utilizados para o *western blotting*.
...45

V. Lista de Abreviaturas

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

ALE: atividade locomotora espontânea

AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ATE: atenolol

CaMK: calmodulina quinase

ChAT: colina acetiltransferase

CK1 ϵ : do inglês *casein kinase 1 epsilon*

CREB: do inglês *cAMP-response element binding*

CTR: controle

DB: do inglês *digestion buffer*

DBH: dopamina β -hidroxilase

DMEM: do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DOB: dobutamina

EGR1: do inglês *early growth response 1*

FBS: do inglês *fetal bovine serum*

FC: frequência cardíaca

FOR: formoterol

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

GDP: guanosina difosfato

GTP: guanosina trifosfato

HCN4: canal ativado por hiperpolarização e nucleotídeo cíclico

HRP: do inglês *horseradish peroxidase*

i.p.: intraperitoneal

ISO: isoproterenol

LUC: luciferase

MAPK: do inglês *mitogen-activated protein kinase*

NMDA: N-metil D-Aspartato

NSQ: núcleo supraquiasmático

PBS: do inglês *phosphate buffered saline*

PKA: proteína quinase A

PKG: proteína quinase G

PLN: do inglês *phospholamban*

PRO: propranolol

PVDF: membrana de *polyvinylidene fluoride*

RNA: ácido ribonucleico

RyR: do inglês *ryanodine receptor*

Ser16: serina 16

TAC: do inglês *transverse aortic coarctation*

TBS-T: do inglês *tris-buffered saline*

TC: temperatura corporal

TH: tirosina hidroxilase

Thr17: treonina 17

u.a.: unidades arbitrárias

VAcHT: transportador vesicular de acetilcolina

VE: ventrículo esquerdo

YFP: do inglês *yellow fluorescent protein*

β1-AR: receptor β1-adrenérgico

β2-AR: receptor β2-adrenérgico

VI. Agradecimentos

Há 10 anos atrás, durante as aulas de Fisiologia Humana no primeiro semestre do curso de Fisioterapia, decidi que queria ser doutor em Fisiologia. Tomei essa decisão assistindo as aulas do professor Dr. Daniel Dabauê e da professora Dra. Virginia Mara, os quais me deixaram fascinados pelo mundo da Fisiologia Humana e com a carreira acadêmica. Por algum motivo sabia que para alcançar este sonho, teria que percorrer um longo caminho, trabalhar muito, abrir mão de muitas coisas e ser persistente no que estava fazendo. Esta jornada pode ser dividida geograficamente em 2 estados: Sergipe e Minas Gerais. Nestes dois lugares, muitos me ajudaram a crescer cientificamente. Aqui fica meu sincero agradecimento a estas pessoas:

Sergipe:

Professora **Dra. Evaleide Diniz de Oliveira**, minha primeira orientadora, responsável por abrir as portas do Laboratório de Biofísica do Coração (LBC- Universidade Federal de Sergipe), onde desenvolvi meu primeiro projeto de iniciação científica.

Aos meus amigos, **Thássio, Jucy, Evaldo e Michel**. Trabalhamos, produzimos, aprendemos e nos divertimos muito. Que época boa a que passamos juntos no LBC!

Professora **Dra. Sandra Lauton Santos**, orientadora do meu Trabalho de Conclusão de Curso.

Minas Gerais:

Professora **Dra. Silvia Guatimosim**, obrigado por vários motivos, dentre eles destaque: me aceitar como integrante do Laboratório de Sinalização Cardíaca, pela orientação oferecida durante meu mestrado e doutorado, pelo tempo investido em minha formação e por ter contribuído com muita qualidade para minha base de pesquisador que irei carregar por toda minha carreira científica.

Aos ex-integrantes do Laboratório de Sinalização Cardíaca, **Pedro e Amanda**, por me ensinarem o isolamento de cardiomiócito adulto, técnica essencial para o desenvolvimento do meu mestrado e doutorado.

Professora **Dra. Fabiana Alves**, por ter me ensinado com muita paciência e qualidade a técnica de RT-qPCR.

Aos alunos de iniciação científica que me acompanharam: **Kariny, Samara, Letícia, Elizeu e Marcos**.

A **Flávia**, pela amizade, companhia e ajuda em vários momentos da construção dessa tese.

A Professora **Dra. Maristela Poletini**, por me apresentar os *clock genes* e a coorientação deste trabalho.

A todos os **colaboradores** deste e de todos os outros trabalhos que construímos juntos. Obrigado!

1. Introdução

Os relógios biológicos orquestram o ritmo circadiano de diferentes funções fisiológicas. No coração, este relógio exerce influência sobre a função cardíaca em vários níveis, desde a regulação gênica até a oscilação da frequência cardíaca ao longo do dia. Anteriormente, Durgan *et al*, 2005 e Beesley *et al.*, 2016, mostraram *in vitro* e *ex vivo*, respectivamente, que a sinalização adrenérgica altera a expressão de componentes do relógio biológico no cardiomiócito/coração. No entanto, ainda não é conhecido se o braço simpático do sistema nervoso autônomo, ou mais especificamente a sinalização adrenérgica pode atuar como um sincronizador fisiológico do relógio biológico cardíaco *in vivo*, e se caso positivo, o mecanismo molecular envolvido neste processo. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo central de responder estas duas perguntas. Para isto, utilizamos um conjunto de intervenções farmacológicas e animais geneticamente modificados para investigar o papel *in vivo* e *in vitro* da sinalização adrenérgica na transcrição dos *clock genes* cardíacos. Como conclusão, propomos uma cascata de sinalização intracelular dependente de PI3K γ -ERK1/2-CREB/CRE como o mecanismo responsável pela comunicação funcional que existe entre o receptor β 2-adrenérgico cardíaco e a transcrição de *Per1* no coração.

2. Revisão da Literatura

2.1. Ritmos Circadianos e os Relógios Biológicos

Ritmos circadianos (do latim *cerca*: cerca + *diem*: dia) são oscilações diárias de eventos biológicos presentes em todos os seres vivos. Estas oscilações apresentam três características fundamentais: *i*) período de aproximadamente 24 horas, mesmo na ausência de sincronizadores ou pistas externas; *ii*) ajuste do seu período e fase às mudanças externas (ex: ciclo dia/noite) e *iii*) um período fixo mesmo quando desafiados por uma faixa de temperaturas fisiológicas (Edery 2000; Zhang, *et al.*, 2014). São exemplos de variáveis fisiológicas com perfil circadiano: o ciclo sono-vigília, a temperatura corporal, a liberação de diferentes hormônios e a concentração plasmática de glicose (Fig. 1).

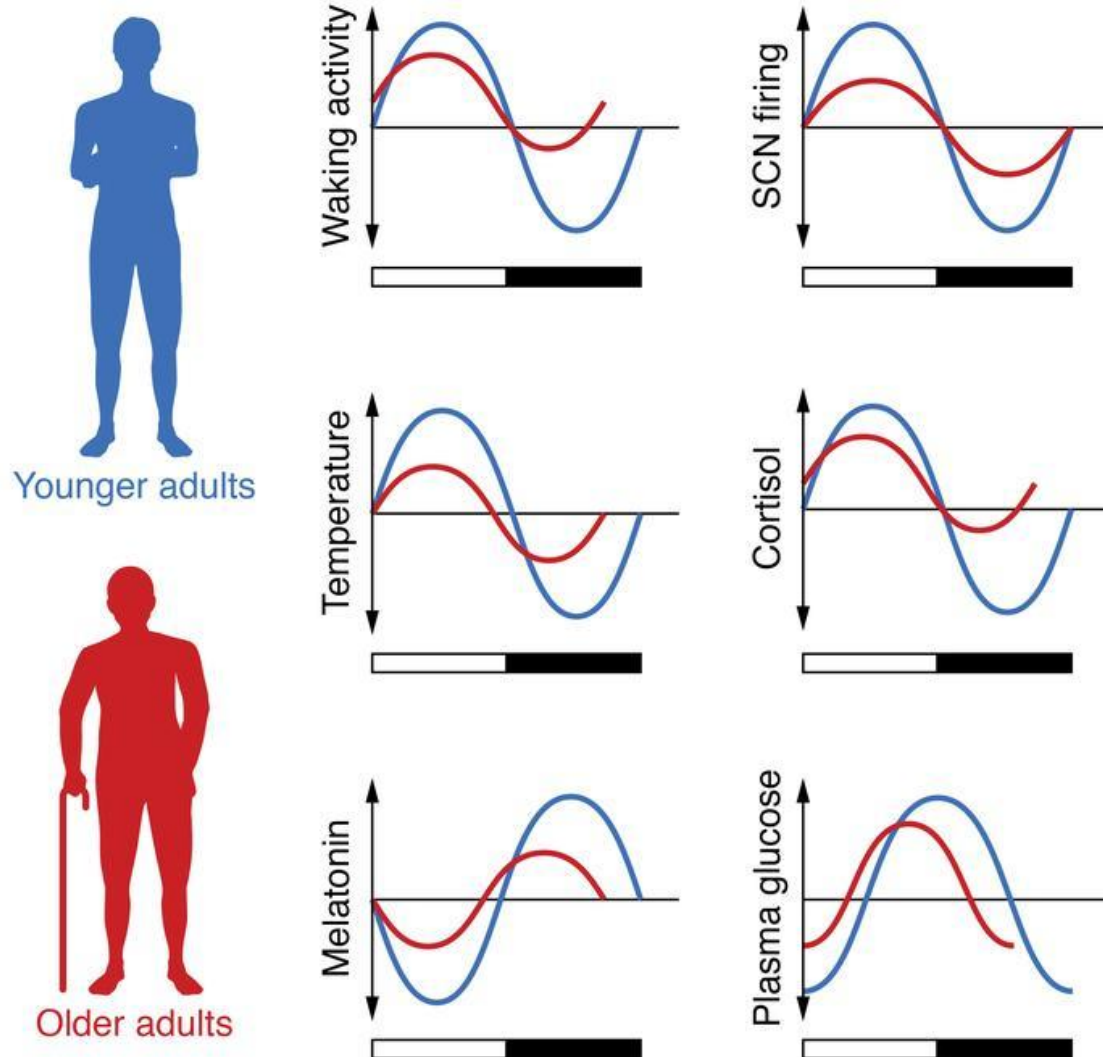


Figura 1: Esquema ilustrativo de variáveis fisiológicas que apresentam ritmo circadiano. As linhas azuis representam a oscilação destes ritmos em homens jovens e as linhas vermelhas a oscilação em homens idosos. Nos gráficos, as barras brancas representam o dia e as barras pretas representam a noite. Esquema retirado de Hood e Amir, 2017.

Este padrão circadiano de diferentes funções fisiológicas é considerado um ganho evolutivo extremamente importante para os mamíferos, que passaram a antecipar suas funções biológicas e assim se prepararem para os desafios a serem enfrentados durante o ciclo dia-noite. O controle circadiano das funções biológicas ocorre em vários níveis, desde a regulação gênica até a regulação do ciclo sono-vigília, e em conjunto contribuem para alinhar as funções biológicas internas com as mudanças no ambiente externo.

Em mamíferos o ritmo circadiano está sob comando do relógio biológico, que pode ser dividido em dois eixos: *i*) o relógio primário ou central e *ii*) os relógios periféricos, presentes em praticamente todas as células. O relógio central compreende cerca de 10 a 20 mil neurônios situados no núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo (Brown e Piggins, 2007). A capacidade dos neurônios do NSQ manterem sincronia de fase em preparações *in vitro*, o diferencia dos relógios periféricos, os quais, por sua vez, necessitam de um sinal externo para esta finalidade (Hastings *et al.*, 2018). Grande parte do conhecimento acerca do relógio central como importante regulador do ritmo circadiano advém de trabalhos que lesionaram e/ou transplantaram o NSQ. Neste contexto, em um dos primeiros estudos que mostraram a importância do NSQ para geração de eventos biológicos circadianos, Aguilar-Roblero *et al.*, 1986, causaram uma lesão eletrolítica bilateral do NSQ em ratos machos da linhagem *Wistar* e avaliaram o ciclo circadiano através da quantidade de água consumida ao longo de 24 horas. Interessante é o fato de que cerca de 60% dos ratos que sofreram a lesão, perderam o comportamento diário de consumir água, sugerindo dessa forma que a lesão bilateral do NSQ resulta na perda da ritmicidade em roedores. Curiosamente, quando os ratos lesionados foram transplantados com um núcleo intacto, obtidos de fetos da mesma espécie, o ritmo circadiano destes animais foi recuperado. Além deste estudo, uma série de outros trabalhos confirmou que o NSQ é uma região importante na manutenção do ritmo circadiano em mamíferos (Saitoh *et al.*, 1990; LeSauter e Silver, 1999).

Os relógios biológicos periféricos estão presentes em, virtualmente, todos os tipos celulares dos mamíferos (Takahashi *et al.*, 2008). Estes relógios

controlam localmente os eventos celulares e, atuando em conjunto com o relógio biológico central, ajustam as funções fisiológicas de acordo com a demanda do organismo. Durante muito tempo, acreditou-se que o NSQ seria uma região indispensável para o funcionamento dos relógios periféricos. No entanto percebeu-se que neste modelo de organização, dificilmente estímulos externos seriam capazes de influenciar o funcionamento dos relógios periféricos.

Na busca de melhor entender a dependência dos relógios periféricos em relação ao NSQ, Husse *et al.*, 2014, desenvolveram um camundongo geneticamente modificado, que apresenta perturbação do relógio biológico apenas no NSQ ($Syt10^{Cre/Cre}/Bmal1^{fl/-}$) e dessa forma investigaram a influência desta perturbação sobre o comportamento dos relógios periféricos. De forma interessante, os pesquisadores observaram que o funcionamento incorreto do relógio biológico central, não interferiu com a oscilação dos relógios presentes na adrenal, fígado, rins e coração, quando os camundongos eram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12:12 horas. Além disso, experimentos realizados *in vitro*, ou seja, em um ambiente sem interferência do NSQ, têm mostrado que diferentes tipos celulares como o hepatócito (Dibner *et al.*, 2010) e o cardiomiócito (Crnko *et al.*, 2019), apresentam um ritmo preservado em suas funções celulares, sugerindo um mecanismo autônomo de funcionamento. Desta forma, hoje o NSQ pode ser definido como um maestro de uma orquestra composta por vários relógios, responsável por determinar o período e a fase dos ritmos de atividade/repouso. Por meio de diferentes sinais, como o controle da temperatura, sinais neuroendócrinos transmitidos através do sistema nervoso autônomo, entre outros, o NSQ contribui para a sincronização

dos diferentes relógios periféricos (Fig. 2), e este trabalho harmônico resulta no desenvolvimento adequado de ritmos sistêmicos (Patke *et al.*, 2020).

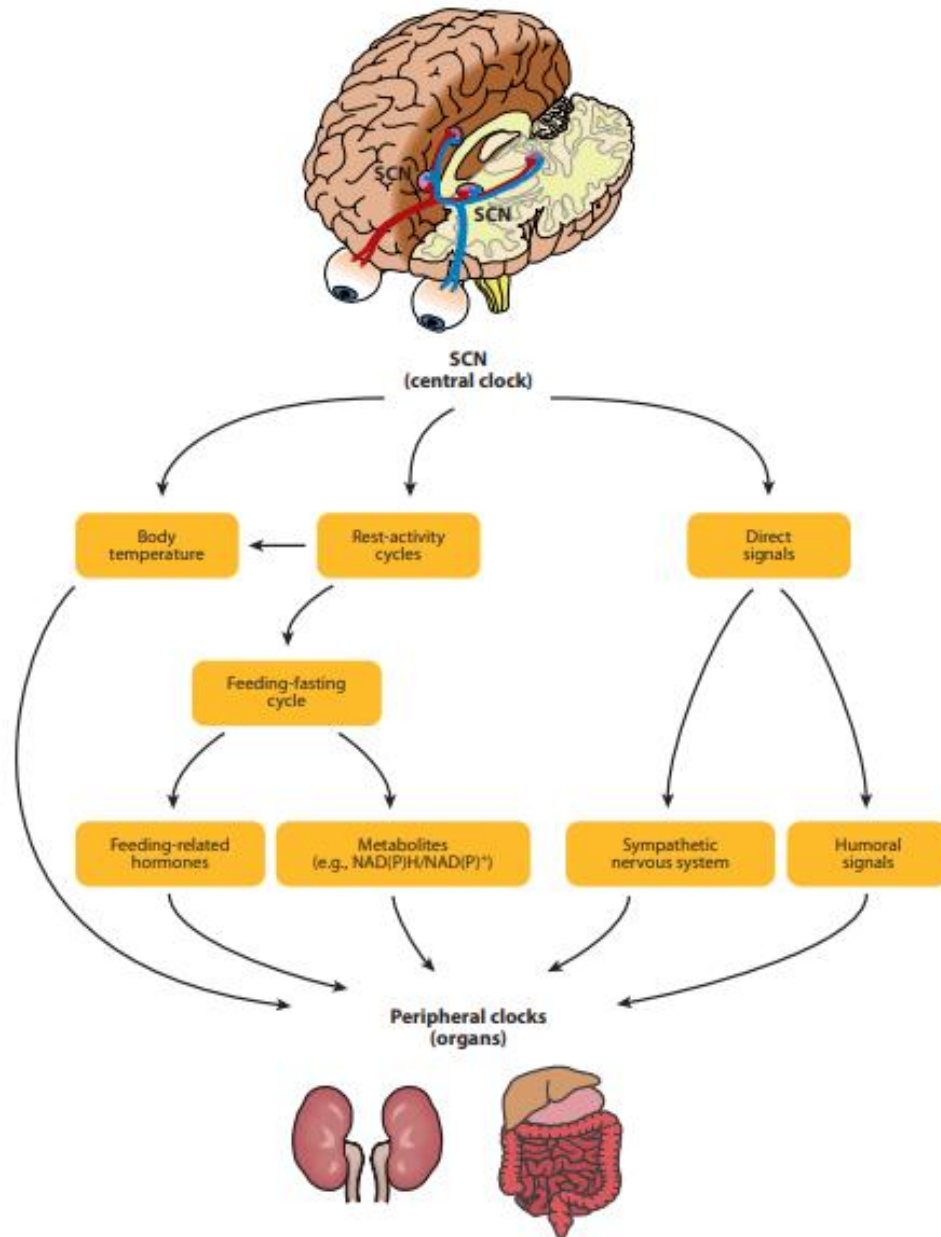


Figura 2: Esquema ilustrativo dos diferentes sinais fisiológicos que mantêm a comunicação entre o núcleo supraquiasmático (NSQ) e os relógios periféricos. O relógio biológico central, situado no núcleo supraquiasmático comunica-se com os relógios biológicos periféricos, por meio de sinais distintos, como a temperatura corporal, alterações neuroendócrinas, dentre outros mecanismos. Esquema retirado de Dibner *et al.*, 2010.

2.2. Maquinaria Molecular do Relógio Biológico – Clock Genes

No plano molecular, o relógio biológico é formado por um conjunto de genes conhecidos como *clock genes*. Estes *clock genes* formam um complexo transcricional-traducional que se autorregulam por meio de alças de retroalimentação positiva e negativa (Fig. 3). O funcionamento deste relógio resulta na expressão rítmica de genes envolvidos num amplo espectro de funções biológicas como o metabolismo e divisão celular (ver seção 2.4) (etapa (6), figura 3).

A alça principal do complexo molecular dos relógios biológicos é formada pelos componentes: CLOCK (*Circadian Locomotor Output Cycles Protein Kaput*), BMAL1 (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-like Protein 1*), PER1,2,3 (*Period Circadian Protein Homologue 1,2 and 3*) e o CRY1,2 (*Cryptochrome 1 and 2*). Nas células de mamíferos, as proteínas CLOCK e BMAL1 formam um heterodímero que transloca do citoplasma para o núcleo, aonde se liga a região E-box (*Enhancer Box*, CACGTG) presente nos promotores dos genes *PER* e *CRY* (etapa (1), Fig. 3) promovendo o aumento na expressão das proteínas PER e CRY. Consequentemente, PER e CRY acumulam-se no citoplasma celular, onde formam heterodímeros, que se movem do citoplasma para o núcleo, onde irão bloquear a atividade do complexo CLOCK/BMAL1 (etapa (2), Fig. 3). As proteínas PER e CRY, quando acumuladas no citoplasma, podem ser direcionadas para via de degradação proteica ubiquitina-proteassoma (etapa (3), Fig. 3). Todos estes processos duram em torno de 24 horas (Shearman *et al.*, 2000; Preitner *et al.*, 2002).

A alça alternativa deste complexo é formada pelas proteínas REV-ERB α e ROR, que também são reguladas positivamente pelo complexo CLOCK/BMAL1 (etapa (4), Fig. 3). REV-ERB α e ROR competem pelo sítio de

ligação RORE presente na região promotora do *BMAL1*, podendo por sua vez, reprimir (REV-ERB α) ou ativar (ROR) a transcrição do *BMAL1* (etapa (5), Fig. 3) (Shearman *et al.*, 2000; Preitner *et al.*, 2002).

Além destas duas alças, a atividade deste complexo molecular pode ser modulada através de mudanças pós-transcricionais ou pós-translacionais, como a metilação, modificações em histonas, microRNAs e poliadenilação (Mendoza-Viveiros *et al.*, 2017).

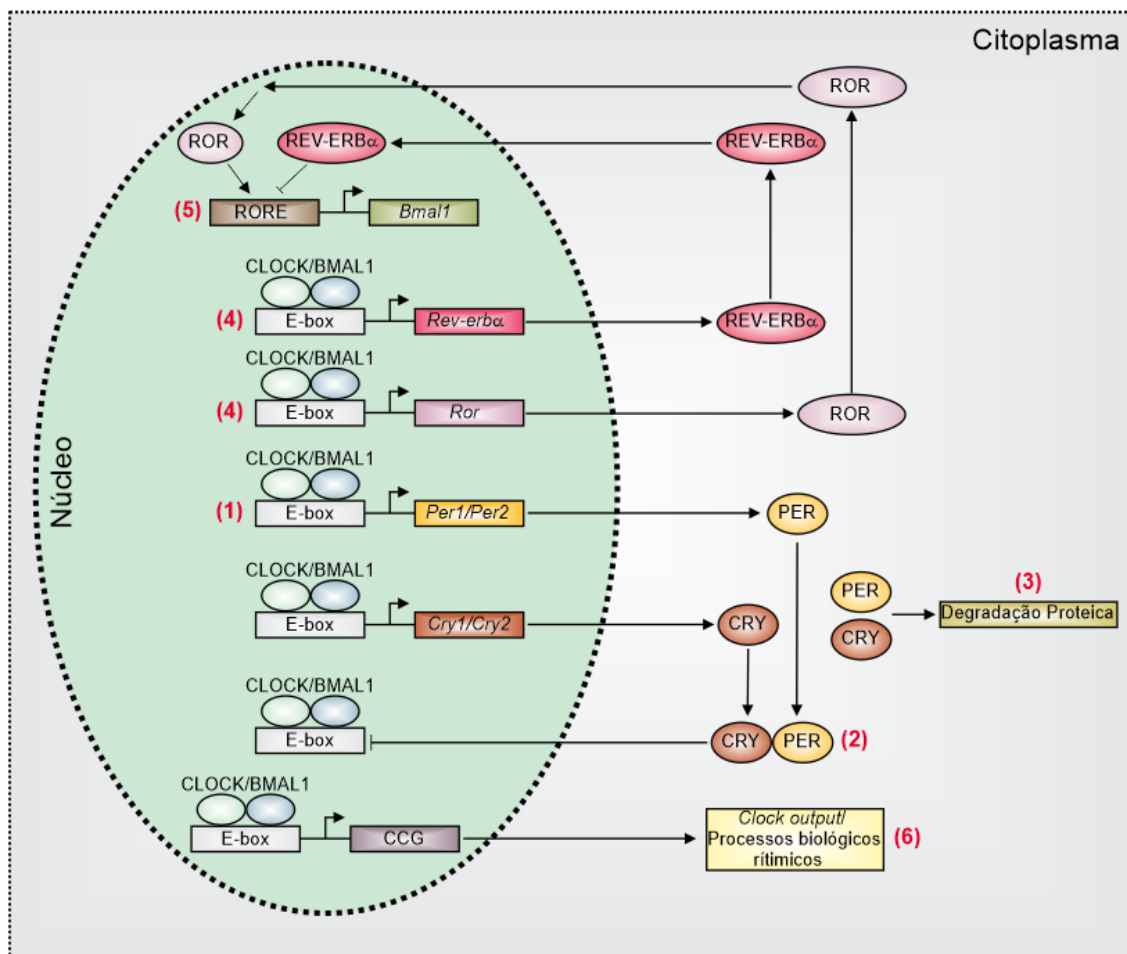


Figura 3: Esquema ilustrativo das interrelações entre os principais componentes do relógio biológico. Os *clock genes* formam um complexo transcricional-traducional que trabalha ao longo de 24 horas, contribuindo para oscilação rítmica de genes envolvidos em diferentes funções celulares. A sequência de ações descrita no texto está apresentada em ordem de 1-6 numerada na figura. Setas com as pontas agudas representam eventos de ativação. Traços com ponta cega indicam eventos de inibição.

2.3. Sincronizadores do Relógio Biológico – Clock Input

Sincronizadores, também conhecidos como *zeitgeber* (do alemão *zeit*: tempo + *geber*: doador), agentes de arrastamento (*entraining agents*) ou ainda *clock input*, são pistas capazes de alterar o funcionamento dos relógios biológicos (Pilorz *et al.*, 2018).

O principal sincronizador do relógio biológico central é a luz. O sinal luminoso, quando percebido pelas células fotossensíveis ganglionares da retina, ricas no pigmento fotossensível melanopsina, inicia uma cascata de eventos que em última instância resultarão na sincronização do relógio central. As células ganglionares da retina após perceberem o estímulo fótico, transmitem essa informação para o NSQ através do trato retino-hipotalâmico. No NSQ, neurotransmissores como o glutamato, se ligam aos receptores NMDA ou AMPA, e promovem um aumento na concentração intracelular de cálcio. Este aumento de cálcio, é responsável por ativar uma série de quinases incluindo a PKA, MAPK, PKG e CaMK, que podem, por sua vez, fosforilar e ativar o fator de transcrição, CREB, envolvido na transcrição do *PER1* e *PER2* (Fig. 4) (Brown *et al.*, 2007; Reppert e Weaver, 2001). Outros fatores de transcrição como o cFOS (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002) e EGR1 (Riedel *et al.*, 2018), podem ser regulados por estímulos luminosos e contribuem para regulação dos *clock genes* no NSQ.

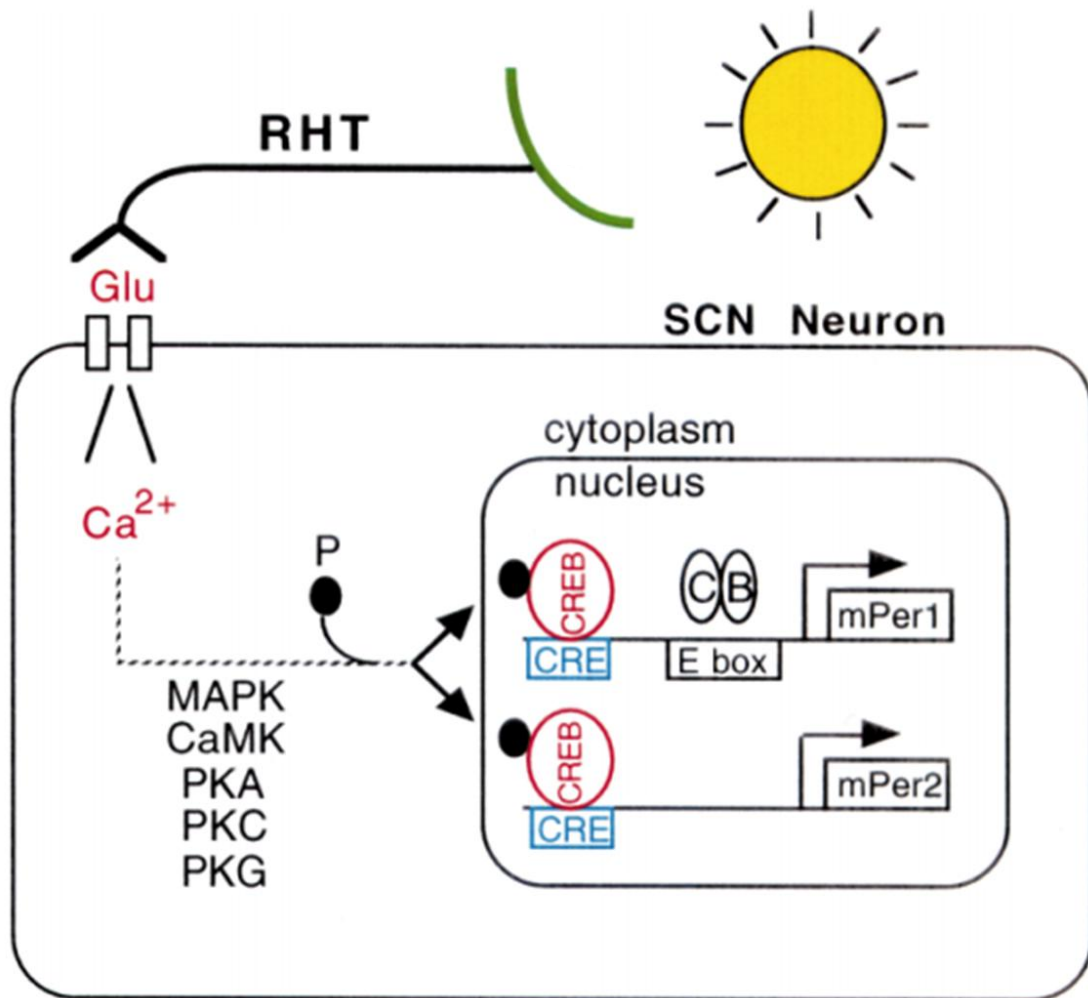


Figura 4: Esquema ilustrativo do mecanismo envolvido na sincronização do relógio biológico central através do sinal luminoso. Glu = glutamato. C = CLOCK. B = BMAL1. Esquema adaptado de Reppert e Weaver, 2001.

Além da luz existem outros sincronizadores não fóticos, como a atividade física, a interação social, além da alimentação (principal sincronizador do relógio biológico periférico), que em conjunto contribuem para o correto funcionamento dos relógios periféricos (Fig. 5).

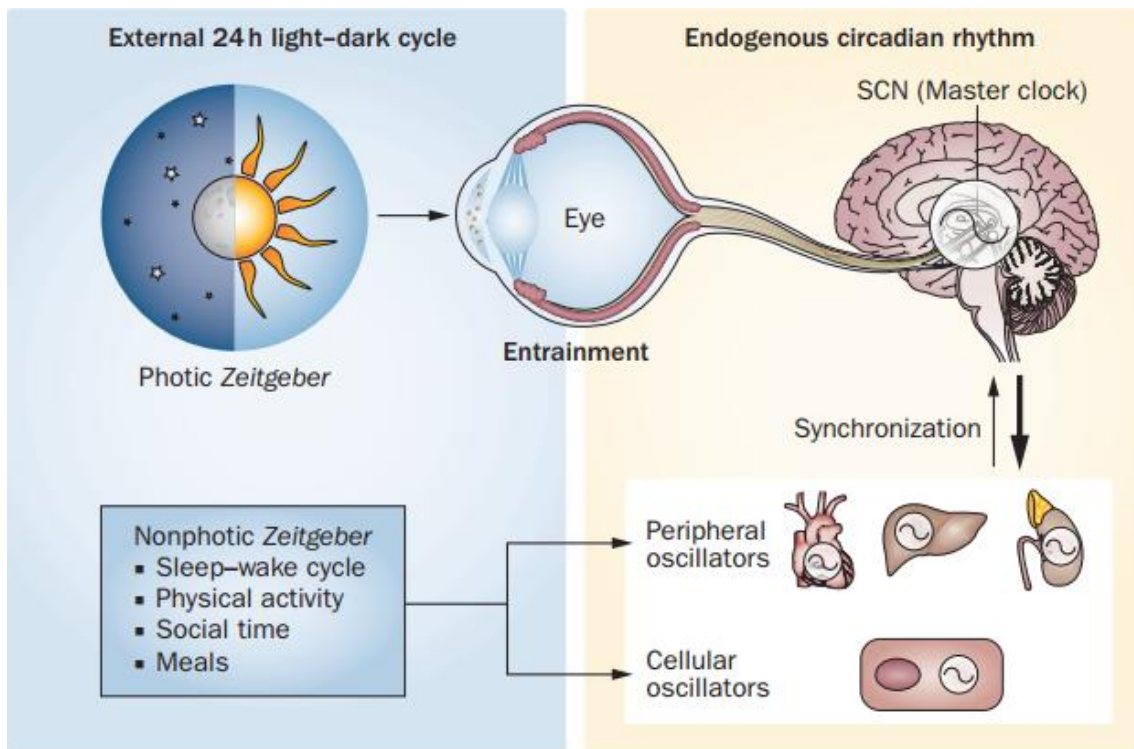


Figura 5: Esquema ilustrativo dos principais sincronizadores dos relógios biológicos central e periféricos. O sincronizador fótico, ou estímulo luminoso é responsável pela sincronização do relógio biológico central. Os sincronizadores não fóticos, como a atividade física e a alimentação, são responsáveis pela sincronização dos diferentes relógios periféricos. Esquema retirado de Buttgerit *et al.*, 2015.

2.4. Genes Controlados pelos Clock Genes – Clock Output

Os *clock genes* regulam de maneira rítmica a expressão de genes envolvidos em diversas funções celulares, os chamados genes controlados pelos *clock genes* ou *clock output*. Zhang *et al.*, 2014, analisaram o transcriptoma de 12 órgãos de camundongos ao longo de 24 horas. Por meio de técnicas de ponta, como o RNA-seq e o DNA array, foi observado que 43% dos genes codificadores de proteínas apresentaram oscilação circadiana em pelo menos um órgão. Em uma estimativa, que levou em consideração as características fisiológicas específicas de cada tecido e a heterogeneidade celular, os autores propuseram que cerca de 50% de todos os genes de

camundongos oscilam em algum órgão. O mais curioso é que cerca de 50% dos medicamentos mais vendidos nos Estados Unidos e considerados essenciais pela Organização Mundial de Saúde, tem como alvo algum gene ou proteína com oscilação rítmica, como levantado pelos autores do trabalho.

Hoje, acredita-se que cerca de 10% dos genes presentes nos mamíferos, são regulados diretamente pelos *clock genes* (Panda *et al.*, 2002; Storch *et al.*, 2002). Essa regulação ocorre, em parte, por meio do heterodímero transcricional CLOCK/BMAL1 que além de ter papel importante nas alças de *feedback* dos *clock genes*, também pode controlar de forma rítmica a expressão de outros alvos ao ligar-se a regiões E-box presentes em diferentes genes.

A regulação rítmica de genes poderá, por sua vez, influenciar o proteoma celular. Por exemplo, o proteoma cardíaco oscila ao longo de 24 horas. Através da análise de amostras de tecido cardíaco de camundongo, submetidos às análises de gel de eletroforese 2D e espectrometria de massa associada a cromatografia líquida, Podobed *et al.*, 2014, verificaram que cerca de 8% de todas as proteínas presentes no coração sofrem influência do horário do dia. Essa observação foi validada quando intervenções no ciclo luminoso dos animais foram capazes de alterar o perfil de proteínas vistas ao longo do dia. Ainda assim, ao comparar o proteoma cardíaco de animais selvagens (*Wild-Type*, C57Bl/6) com o proteoma de animais geneticamente modificados que apresentam uma mutação nos *clock genes* apenas na célula muscular cardíaca (CCM), os autores observaram que perturbações na maquinaria dos *clock genes* neste tipo celular, foram suficientes para modificar o perfil proteico de todo o tecido cardíaco. Especialmente, proteínas chaves na regulação de

vias metabólicas do coração, como a família da proteína aldeído desidrogenase e o fator de crescimento similar à insulina, que se mostraram alteradas nestes modelos, apresentando-se como alvos sensíveis a mudanças circadianas.

2.5. O Relógio Biológico Cardíaco

O ciclo dia/noite influencia diretamente a função cardíaca (Rana *et al.*, 2020). Um exemplo clássico desta influência pode ser visualizado em registros da frequência cardíaca (FC), como observado, por exemplo, na figura 6 onde é apresentada a oscilação da FC registrada ao longo de 24 horas em homens adultos e saudáveis. O perfil de oscilação da FC nestes indivíduos foi caracterizado por maiores valores durante o dia, seguido por uma queda acentuada no período noturno (Black *et al.*, 2019). Estudos têm mostrado que mudanças na atividade do sistema nervoso autônomo que ocorrem ao longo do dia (Black *et al.*, 2019), bem como propriedades intrínsecas do coração (Wang *et al.*, 2019), são responsáveis por esta flutuação da FC. Além da FC, outros parâmetros relacionados à função cardíaca, como a contratilidade do miocárdio, oscilam ao longo de 24 horas, adaptando o coração a demanda exigida (Durgan e Young, 2010). Estas oscilações circadianas na função do coração não se restringem aos humanos, ocorrendo também em roedores, como o camundongo.

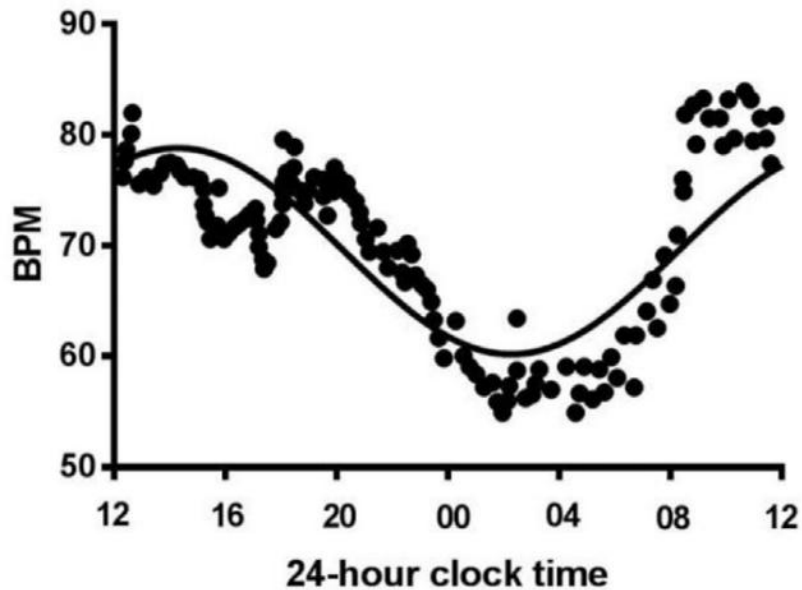


Figura 6: Registro da frequência cardíaca (BPM) de forma não-invasiva em homens adultos e saudáveis ao longo de 24 horas (*clock time*). O eixo y apresenta os valores de frequência cardíaca e o eixo x apresenta o horário do dia. Figura retirada de Black *et al.*, 2019.

A partir da observação que os *clock genes* estão presentes nas células que compõem o coração, como o cardiomiócito, alguns trabalhos têm investigado como essa maquinaria molecular influencia o funcionamento do coração durante o ciclo dia/noite. Curtis *et al.*, 2007 observaram que camundongos nocautes para o *Bmal1* (*Bmal1*^{-/-}) não apresentam a oscilação fisiológica da frequência cardíaca ao longo de 24 horas, caracterizada pelo aumento dos valores durante a fase escura em roedores. Neste sentido, camundongos nocautes para o *Bmal1* apenas no cardiomiócito (*iCSΔBmal1*), têm redução na frequência cardíaca e prolongamento do intervalo RR e do complexo QRS (Schroder *et al.*, 2013).

Embora estes achados sugiram uma importante participação do BMAL1 sobre a oscilação e regulação da frequência cardíaca, ainda permanecia obscuro um mecanismo molecular envolvido neste controle. Em um elegante

trabalho, Wang *et al.*, 2019, exploraram mais afundo o papel do BMAL1 no coração. Os autores observaram que o canal ativado por hiperpolarização e nucleotídeo cíclico (HCN4), proteína indispensável para gênese e manutenção da atividade elétrica do coração, apresenta um comportamento circadiano a nível gênico, proteico e funcional. Curiosamente, camundongos *Bmal1*^{-/-} perdem a oscilação do HCN4 entre as fases clara e escura, sugerindo um papel regulador importante para *Bmal1* sobre a oscilação do HCN4. De fato, experimentos de análise de imunoprecipitação da cromatina, indicaram que existem regiões de ligação para o BMAL1 no promotor do gene *HCN4*, elucidando desta forma a nível transcricional como o BMAL1 contribui para oscilação circadiana da frequência cardíaca.

2.6. Ritmo Circadiano e Doenças Cardíacas

2.6.1. Ritmo Circadiano e Doenças Cardíacas em Humanos

O horário do dia está intimamente relacionado à ocorrência de mortes causadas por problemas de origem cardiovascular (Muller *et al.*, 1987; Manfredini *et al.*, 2004). Esta relação pode ser visualizada no gráfico de distribuição do número de episódios de isquemia do miocárdio ao longo das 24 horas. Em humanos, estes eventos acontecem com maior frequência durante as primeiras horas do dia (Fig. 7) (Hastings *et al.*, 2003). Uma explicação plausível para este fenômeno pode estar numa série de acontecimentos que ocorrem em paralelo durante a manhã, como o aumento na frequência cardíaca, pressão arterial, tônus vascular, entre outros, que em conjunto contribuem para a maior incidência de eventos cardíacos nas primeiras horas do dia (Manfredini *et al.*, 1996).

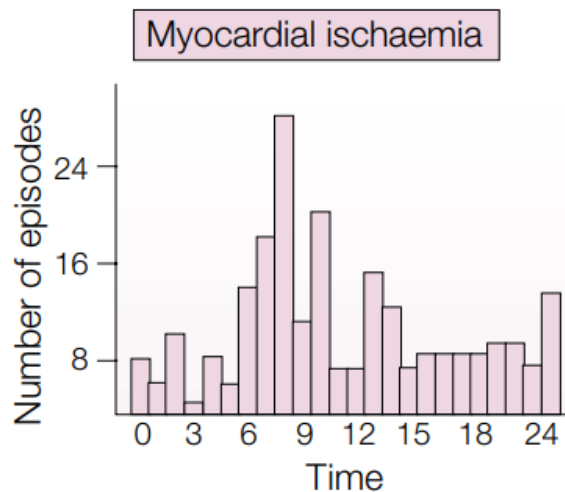


Figura 7: Distribuição do número de episódios de isquemia do miocárdio em humanos ao longo do dia. Figura retirada de: Hastings *et al.*, 2003.

Uma vez observado que o ritmo circadiano é um importante regulador da função cardíaca, é preditivo supor que desordens no relógio biológico podem estar relacionadas ao surgimento de doenças cardíacas. De fato, a Organização Mundial de Saúde definiu que o trabalho por turno (*shift work*) é um risco para o desenvolvimento de doenças, incluindo as que afligem o coração (OMS, 2002). Em uma meta-análise realizada com 34 estudos, que abrangeram mais de 2 milhões de pessoas, foi observado aumento da incidência de infarto do miocárdio, eventos coronários, e outras doenças cardiovasculares, em indivíduos que trabalhavam por turno (Vyas *et al.*, 2012). Este grupo de indivíduos apresenta um maior risco de desenvolver tais doenças, devido a alterações no controle autonômico cardíaco, perturbação no perfil de oscilação da pressão arterial ao longo de 24 horas e alterações no perfil metabólico, que acontecem como consequência do mau funcionamento do relógio biológico (Martino e Young, 2015).

2.6.2. Clock Genes e Doenças Cardíacas em Modelos Experimentais

Diferentes modelos de animais geneticamente modificados têm expandido o conhecimento acerca do papel dos *clock genes* nas doenças cardíacas. Um modelo clássico, que representa muito bem a importância do relógio biológico como uma peça fundamental na comunicação entre o ambiente externo e o ambiente interno, é o hamsters *+tau*. Este animal apresenta uma mutação no *locus* autosomal *tau*, responsável por codificar a proteína CK1 ϵ . A CK1 ϵ é uma quinase responsável por fosforilar o PER1, e desta forma regular sua localização celular e direcionamento para via de degradação. Desta forma, a CK1 ϵ regula o período circadiano (Lowrey *et al.*, 2000), o qual é reduzido a 22 h nestes mutantes. Este animal, quando colocado num ambiente com período de 24 h, apresenta diminuição nos parâmetros contráteis, hipertrofia dos miócitos e aumento da fibrose cardíaca. Importante, todas essas alterações são revertidas quando os hamsters passam a ser mantidos num período de 22 h (Martino *et al.*, 2008). Sendo assim, este modelo destaca a importância da sincronia que deve existir entre o ambiente externo e os *clock genes*, para manutenção da fisiologia cardíaca.

Perturbações pontuais nos *clock genes* também repercutem negativamente na estrutura e função do coração. A deleção do gene *Bmal1*, por exemplo, conduz o camundongo *Bmal1*^{-/-} a uma situação de cardiomiopatia dilatada, caracterizada pelo alargamento das câmaras cardíacas, que ocorre em paralelo com a diminuição na espessura da parede dos ventrículos e redução acentuada no desempenho contrátil a partir do terceiro mês de vida (Lefta *et al.*, 2012) (Fig. 8).

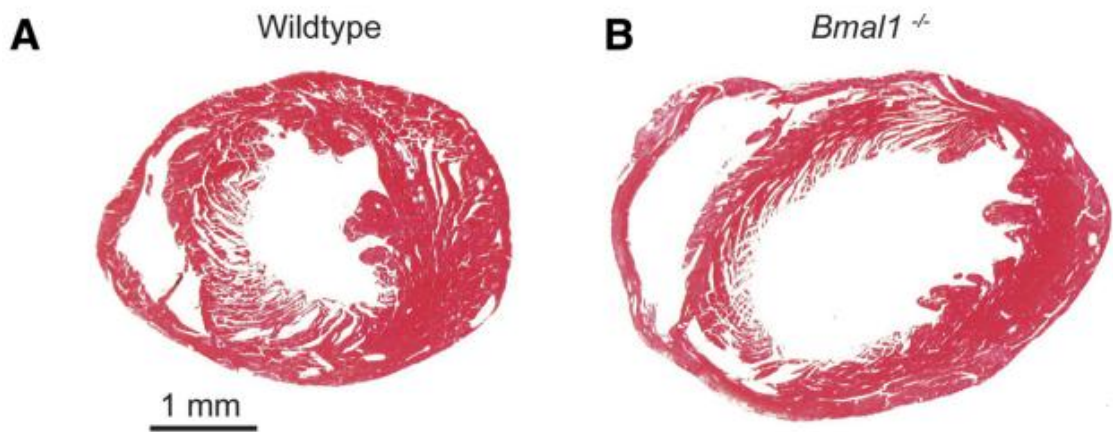


Figura 8: Imagens representativas de cortes transversais de coração de camundongos *Wild-Type* (A) e *Bmal1^{-/-}* (B). Os corações foram coletados quando os animais tinham 6 meses de idade. As lâminas contendo os cortes de coração foram coradas com tricômico de Masson. Imagens retiradas de: Lefta *et al.*, 2012.

Além do camundongo *Bmal1^{-/-}*, alterações em outros componentes da maquinaria dos *clock genes*, promovem efeitos adversos ao coração. A tabela 1 resume uma parte dos trabalhos realizados em diferentes modelos geneticamente modificados, que analisaram o impacto destas alterações sobre a função e estrutura do coração.

Tabela 1: Modelos geneticamente modificados e seus respectivos impactos na estrutura e função cardíaca. Tabela adaptada de: Crnko *et al.*, 2019.

Modelo geneticamente modificado	Principais Impactos para o coração	Referência
<i>Dbp^{-/-} Hlf^{-/-} Tef^{-/-}</i>	Hipertrofia cardíaca e disfunção do ventrículo esquerdo	Anea <i>et al.</i> , 2009
CCM	Menor tolerância a injúria de isquemia/reperfusão	Durgan <i>et al.</i> , 2010
CCM + <i>Bmal1^{-/-}</i> no cardiomiócito	Maior hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol	Durgan <i>et al.</i> , 2011
	1 - Perda do ritmo fisiológico da duração da repolarização ventricular.	
<i>Klf15^{-/-}</i>	2 – Aumento na susceptibilidade a arritmias ventriculares	Jeyaraj <i>et al.</i> , 2012

Dbp = albumin D-site binding protein, *HLF* = hepatic leukemia factor, *TEF* = thyrotroph embryonic factor, *CCM* = Cardiomyocyte-specific circadian Clock Mutant e *Klf15* = *krüppel-like factor 15*.

Levando em consideração o papel dos *clock genes* sobre a função cardíaca e seu envolvimento em diferentes doenças cardiovasculares, estes genes têm sido estudados como potencial alvo terapêutico no tratamento de doenças cardíacas. Neste sentido, Zhang *et al.*, 2017, observaram que o SR9009, um agonista do REV-ERB, foi capaz de bloquear a hipertrofia celular promovida pela fenilefrina em cardiomiócitos de ratos neonatos. Em experimentos *in vivo*, os autores confirmaram o efeito anti-hipertrófico do

SR9009, o qual impediu o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida pela coarctação da aorta transversa (TAC) em camundongos. O efeito anti-hipertrófico do SR9009 pode ser explicado, em parte, por sua capacidade de reprimir a atividade transcricional de genes pró-hipertróficos, como o *MEF2a* e *MEF2c*.

2.7. Sincronizadores do relógio biológico cardíaco

Os sincronizadores fisiológicos dos *clock genes* no coração ainda são poucos conhecidos. Um candidato em potencial é o sistema nervoso simpático. Essa hipótese é amparada em três pontos principais: (i) o tecido cardíaco é rico em inervação simpática; (ii) a atividade simpática e concentração plasmática de noradrenalina flutuam ao longo do dia; e (iii) já foi descrito que a expressão dos *clock genes* é alterada em diferentes tecidos após o tratamento *in vivo* e *in vitro* com o neurotransmissor deste sistema, a noradrenalina.

Neste sentido, Durgan *et al.*, 2005 demonstraram que a noradrenalina promove a oscilação dos *clock genes* (*Bmal1*, *Rev-Erba* e *Per2*) e do gene controlado pelos *clock genes*, o *Dbp*, em cultura de cardiomiócitos adultos. Corroborando estes achados, o agonista β -adrenérgico, isoproterenol (ISO), amplificou a oscilação do PER2 no tecido cardíaco de camundongos PER2::LUC (Beesley *et al.*, 2016). Curiosamente, estes achados *in vitro* e *ex vivo*, respectivamente, não foram corroborados pelos dados *in vivo* mostrados por Reilly *et al.*, 2007. Para investigar a participação da sinalização adrenérgica sobre oscilação dos *clock genes* em diferentes tecidos periféricos, incluindo o coração, os autores deste trabalho utilizaram um camundongo geneticamente modificado, que não expressa a enzima responsável por converter a dopamina

em noradrenalina, a dopamina β -hidroxilase (*Dbh*^{-/-}). Por este motivo o camundongo *Dbh*^{-/-} apresenta uma redução drástica de noradrenalina e adrenalina. No *Dbh*^{-/-}, a oscilação do *Per1*, *Per2* e *Dbp* permaneceu inalterada na aorta, coração e fígado, sugerindo dessa forma que a sinalização adrenérgica não participa *in vivo* da sincronização dos *clock genes* em tecidos periféricos.

2.8. Os receptores β -adrenérgicos e o coração

O braço simpático do sistema nervoso autônomo comunica-se com o coração através dos receptores adrenérgicos. O principal receptor adrenérgico expresso no coração, é o do tipo β -adrenérgico (β -AR), que pode apresentar-se nas isoformas β_1 , β_2 ou β_3 . O tecido cardíaco, por sua vez, é predominantemente enriquecido pela isoforma β_1 (que compreende cerca de 75-80% de todos os β -AR presentes), seguido pelo β_2 -AR (15-18%) e em pequena porcentagem pelo β_3 -AR (2-3%) (Lympelopoulos *et al.*, 2013). Quando estimulados pela noradrenalina, estes receptores ativam uma cascata de sinalização intracelular que culminará na regulação do inotropismo (contratilidade), cronotropismo (frequência), lusitropismo (relaxamento) e dromotropismo (velocidade de condução dos impulsos elétricos) cardíaco. Todos estes efeitos resultam no aumento do desempenho cardíaco, preparando o organismo para a resposta de luta-ou-fuga.

Os β -AR são receptores com 7 domínios transmembranares acoplados a proteína G, constituída pelas subunidades α , β e γ . No estado basal, ou seja, quando não há ligação entre o neurotransmissor e o receptor, a subunidade G α está acoplada intracelularmente a guanidina difosfato (GDP). Quando

estimulados por agonistas, os β -AR sofrem uma mudança conformacional acompanhado por uma alteração alostérica da proteína G, que libera o GDP e se liga a guanidina trifosfato (GTP). Essa troca permite que a subunidade $G\alpha$ se desligue do dímero $\beta\gamma$ e ative a adenilato ciclase (AC). Esta enzima é responsável por produzir um importante segundo mensageiro, o AMP cíclico (AMPc), que por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA) (Grimm *et al.*, 2010; Santulli *et al.*, 2016). Essa quinase, fosforila várias proteínas intracelulares envolvidas, por exemplo, no mecanismo contrátil do miócito cardíaco, como, a fosfolambam (PLN), receptores de rianodina (RyR) e canais de cálcio do tipo L (Bers, 2002) (Fig. 9). Além disto, a ativação dos receptores β -adrenérgicos no coração está envolvida na transcrição de diferentes genes.

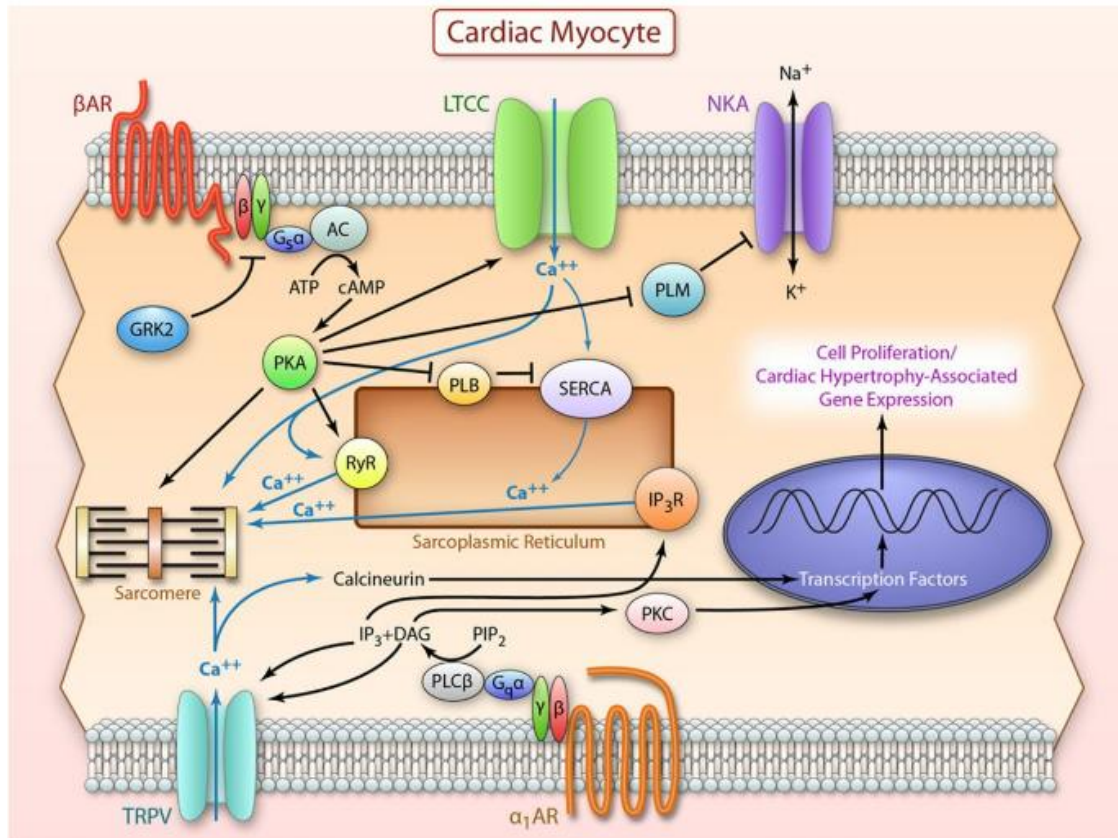


Figura 9: Esquema ilustrativo das principais vias intracelulares ativadas pelo receptor β -adrenérgico no cardiomiócito ventricular. Estas diferentes vias estão envolvidas na contratilidade do cardiomiócito e regulação da transcrição gênica. Esquema retirado de: Lymeropoulos *et al.*, 2013.

2.9. Os receptores β -adrenérgicos como reguladores dos *clock genes*

As respostas celulares a estimulação dos receptores β -adrenérgicos são várias, e incluem a regulação dos *clock genes*. Neste sentido, vários trabalhos têm demonstrado em tecidos e tipos celulares distintos, como em osteoblastos (Hirai *et al.*, 2014), glândula pineal (Wongchitrat *et al.*, 2011) e fígado (Terazono *et al.*, 2003), que os *clock genes* são alvos da sinalização β -adrenérgica.

Curiosamente, a participação de cada isoforma dos β -AR na regulação destes genes, ainda permanece desconhecida. Eventualmente, esta participação estará relacionada à abundância de cada isoforma em diferentes

locais. Por exemplo, já foi demonstrado em células humanas do epitélio brônquico, que a estimulação dos receptores β 2-adrenérgicos com o procaterol e fenoterol, aumenta a expressão do *Per1* nestas células (Takata *et al.*, 2005). No tecido cardíaco, apesar de já ter disso demonstrado que a sinalização β -adrenérgica está envolvida na transcrição dos *clock genes*, ainda não se sabe qual/quais subtipo(s) destes receptores estão envolvidas neste processo.

3. Hipótese

A hipótese deste trabalho é que o sistema nervoso autônomo simpático atue através dos receptores β -adrenérgicos como um sincronizador fisiológico do relógio biológico cardíaco.

4. Justificativa

O relógio biológico presente no coração possui um papel fundamental no controle da fisiologia cardíaca. Este conceito é validado ao observar que os *clock genes*, participam diretamente da oscilação circadiana da frequência cardíaca. Além disto, perturbações pontuais dos *clock genes* no miócito cardíaco, conduzem o coração a um estado patológico, caracterizado pelo remodelamento estrutural e perda de função cardíaca.

No entanto, apesar de já existirem trabalhos mostrando a expressão e o papel fisiopatológico dos *clock genes* no coração, ainda permanece desconhecido quem são os sincronizadores fisiológicos do relógio biológico cardíaco. Esta informação é de extrema importância por algumas razões, dentre elas destacam-se: (i) expandirá o conhecimento acerca dos mecanismos adaptativos do coração frente a diferentes estímulos ao longo de um ciclo circadiano; (ii) jogará luz sobre os possíveis mecanismos que contribuem para o incorreto funcionamento do relógio biológico cardíaco observado em algumas doenças e (iii) permitirá que novas estratégias sejam desenvolvidas afim de evitar as consequências causadas pelo mau funcionamento do relógio biológico cardíaco.

5. Objetivo

5.1. Objetivo Geral

Investigar o papel da sinalização adrenérgica sobre a oscilação dos *clock genes* no coração e o mecanismo molecular envolvido neste efeito.

5.2. Objetivos Específicos

i) Avaliar o efeito da desnervação simpática periférica sobre a oscilação dos *clock genes* (*Clock*, *Bmal1*, *Per1* e *Cry1*) no coração ao longo de 24 horas.

ii) Avaliar a atividade locomotora espontânea e temperatura corporal ao longo de 24 horas em camundongos controle e que sofreram desnervação simpática periférica.

iii) Avaliar a expressão do *Clock*, *Bmal1* e *Per1* nos ZT1 e ZT13 no coração de camundongos controle e tratados com propranolol.

iv) Avaliar o efeito temporal do tratamento agudo com isoproterenol sobre a expressão do *Clock*, *Bmal1*, *Per1* e *Cry1* no coração.

v) Avaliar a expressão do *Clock*, *Bmal1* e *Per1* nos ZT1 e ZT13 em corações de camundongos saudáveis e com hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.

vi) Investigar a participação da ERK1/2 no efeito do isoproterenol sobre a expressão de *Per1* no coração.

vii) Avaliar *in vitro* a expressão de *Per1* em cardiomiócitos ventriculares controles e tratados com isoproterenol.

viii) Investigar a participação da PI3K γ no efeito do isoproterenol sobre a expressão de *Per1* no coração.

ix) Investigar a participação do complexo CREB/CRE no efeito do isoproterenol sobre a expressão de *Per1* no coração.

x) Investigar qual subtipo de receptores β -adrenérgicos está envolvido na indução da transcrição do *Per1* cardíaco.

6. Materiais e Métodos

6.1. Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o número de protocolo: 236/2019.

6.2. Animais

Neste estudo foram utilizados: (i) camundongos machos C57BL/6J obtidos no Biotério Central da UFMG, (ii) camundongos machos Myh7-YFP^{+/-} cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. William Pu (Harvard University, Estados Unidos), (iii) camundongos fêmeas C57BL/6 albinos CRE-Luciferase Reporter obtidos em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Carlos Navegantes (Departamento de Fisiologia, USP/Ribeirão Preto) e (iv) camundongos machos PI3K γ ^{KD/KD} obtidos em colaboração com o Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG).

Todos os animais tinham a idade entre 10-14 semanas, foram mantidos em gaiolas coletivas apropriadas (entre 2-5 animais por gaiola) no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB/UFMG), num ciclo claro luminoso de 12 horas (12 horas de claridade, 12 horas de escuro), temperatura controlada (22-23 °C) e recebendo água e comida *ad libitum*.

6.3. Desnervação simpática periférica

Camundongos C57BL/6J foram tratados via injeção intraperitoneal (i.p.) com 6-hidroxidopamina (6-OHDA, #H4381, Sigma-Adrich) na dose de 100 mg/kg. Os animais do grupo controle foram tratados com salina (NaCl, 0,9%,

250 μ l, i.p.). As injeções foram administradas nos dias 1 e 3, e no dia 5 os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical em quatro horários diferentes: ZT0 (luzes do biotério acendem), ZT6, ZT12 (luzes do biotério apagam) e ZT18. Os corações foram rapidamente removidos e transferidos para nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80°C . Quando apropriado, os corações foram embebidos em Tissue-Tek (#4583, Sakura), armazenados em freezer -20°C e posteriormente utilizados para experimentos de imunofluorescência (Fig. 10).

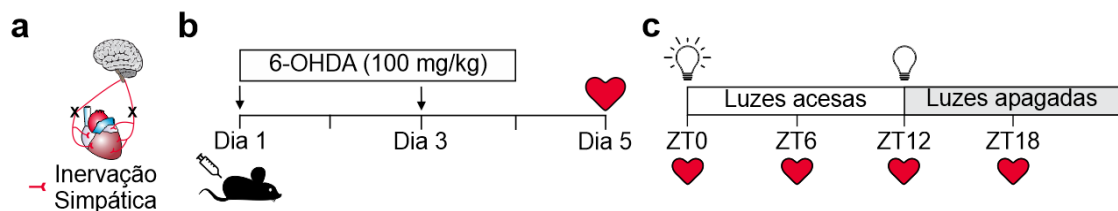


Figura 10: Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no tratamento com a 6-OHDA em camundongos. a) Esquema ilustrativo da comunicação entre o sistema nervoso autônomo e o coração através da inervação simpática. b) Esquema temporal do tratamento com 6-OHDA. c) Esquema temporal dos horários em que os corações foram coletados após o tratamento com a 6-OHDA.

Na eutanásia do ZT6, além dos corações, foi coletado o cérebro dos animais tratados com salina ou 6-OHDA para avaliação da expressão proteica da tirosina hidroxilase (TH) por *western blotting*.

6.4. Tratamento *in vivo* com propranolol, isoproterenol e atenolol

1) Camundongos C57BL/6J foram tratados via injeção i.p. com propranolol (PRO, #P0884, Sigma-Aldrich) na dose de 10 mg/kg. Os animais do grupo controle foram tratados com salina (NaCl, 0,9%, 250 μ l, i.p.). Ambos os grupos foram tratados 2 vezes ao dia: a primeira injeção foi administrada no ZT6, e a segunda injeção foi administrada no ZT10. Desde o início do

tratamento, a frequência cardíaca dos animais foi registrada por telemetria. A eutanásia por deslocamento cervical ocorreu no ZT13, os corações foram rapidamente removidos e transferidos para nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80°C (Fig. 11).

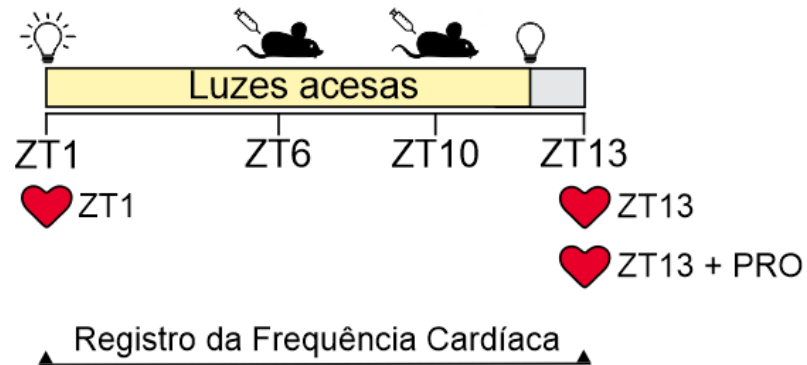


Figura 11: Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no tratamento com propranolol e registro da frequência cardíaca.

2) Camundongos C57BL/6J foram tratados com 1 injeção i.p. de isoproterenol (ISO, #I5627, Sigma-Aldrich) na dose de 4 mg/kg. Os animais do grupo controle foram tratados com salina (NaCl, 0,9%, 250 µl, i.p.). As injeções de salina ou isoproterenol foram administradas no ZT1 e os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical 1, 2 ou 4 horas após as respectivas injeções. Desde o início do tratamento, a frequência cardíaca dos animais foi registrada por telemetria. Os corações foram rapidamente removidos e transferidos para nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80°C (Fig. 12).

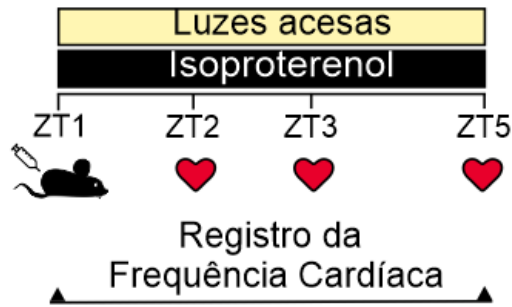


Figura 12: Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no tratamento com isoproterenol e registro da frequência cardíaca.

3) Em um terceiro delineamento experimental, camundongos Myh7-YFP^{+/-} foram tratados durante oito dias consecutivos com injeções i.p. diárias de isoproterenol na dose de 20 mg/kg. Os animais do grupo controle foram tratados com salina (NaCl, 0,9%, 250 µl, i.p.). Importante, as injeções de salina e isoproterenol foram administradas em horários diferentes ao longo dos 8 dias de tratamento. No dia 9, animais de ambos os grupos experimentais foram eutanasiados por deslocamento cervical nos ZT1 ou ZT13. Os corações foram rapidamente removidos e transferidos para nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80°C. Quando apropriado, os corações foram embebidos em Tissue-Tek (#4583, Sakura), armazenados em freezer -20° e posteriormente utilizados para experimentos de imunofluorescência (Fig. 13).

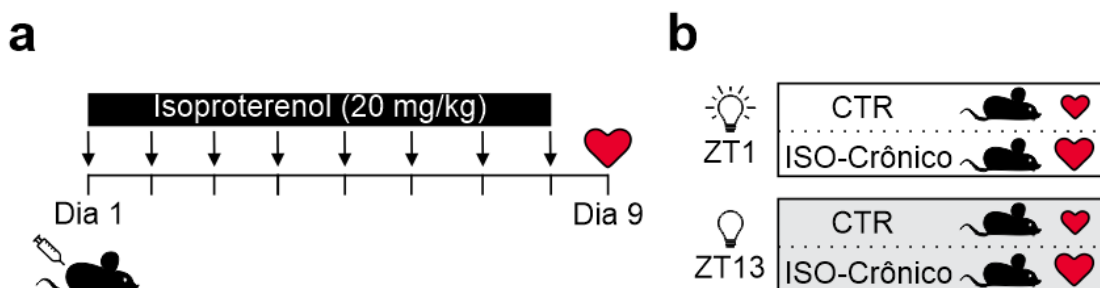


Figura 13: a) Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no tratamento crônico com isoproterenol. b) Esquema temporal dos horários em que os corações foram coletados após o tratamento crônico com isoproterenol.

4) Camundongos C57BL/6J foram tratados via injeção i.p. com atenolol (ATE, #7655, Sigma-Aldrich) na dose de 10 mg/kg. Os animais do grupo controle foram tratados com salina (NaCl, 0,9%, 250 µl, i.p.). Ambos os grupos foram tratados 2 vezes ao dia: a primeira injeção foi administrada no ZT6, e a segunda injeção foi administrada no ZT10. A eutanásia por deslocamento cervical ocorreu no ZT13, os corações foram rapidamente removidos e transferidos para nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer - 80°C (Fig. 14).

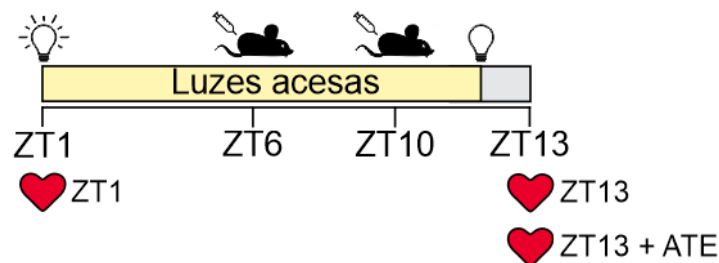


Figura 14: Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no tratamento com atenolol.

6.5. Tratamento *in vivo* com dobutamina e formoterol

Camundongos C57BL/6J foram tratados com uma injeção i.p. de dobutamina (DOB, #D0676, Sigma-Aldrich) ou formoterol (FOR, F9552, Sigma-Aldrich) na dose de 2 mg/kg. Os animais do grupo controle foram tratados com salina (NaCl, 0,9%, 250 µl, i.p.). As injeções foram administradas no ZT1, e os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical 1 hora após as respectivas injeções (Fig. 15). Os corações foram rapidamente removidos e transferidos para nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer - 80°C.

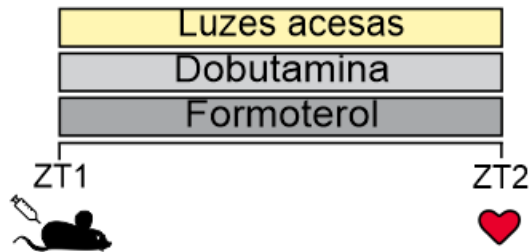


Figura 15: Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no tratamento com dobutamina e formoterol.

6.6. Tratamento *in vivo* com PD 98059 e 666-15

Para investigar a participação das MAPKs e CREB no efeito do isoproterenol e formoterol sobre a transcrição de *Per1* no coração, camundongos C57BL/6J foram tratados, respectivamente, com PD 98059 (10 mg/kg, #513000, Sigma-Aldrich) ou 666-15 (10 mg/kg, #5.38341, Sigma-Aldrich). Todos os inibidores foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO, #D8418, Sigma-Aldrich). As injeções foram administradas via i.p., no dia 1 nos ZT2 e ZT10, e no dia 2, 1 hora antes da injeção de isoproterenol (4 mg/kg, i.p.) ou formoterol (2 mg/kg, i.p.). Os animais do grupo controle foram tratados com salina (NaCl, 0,9%, 250 µl, i.p.). Após 1 hora da injeção de isoproterenol ou formoterol, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os corações foram rapidamente removidos e transferidos para nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80°C (Fig. 16).



Figura 16: Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no pré-tratamento com os inibidores PD 98059 e 666-15, antes da injeção de isoproterenol.

6.7. Implante do sensor e registro da atividade locomotora espontânea e temperatura corporal

A atividade locomotora espontânea (ALE) e temperatura corporal (TC) foram registradas continuamente pelo sensor de telemetria, utilizando o programa Vital View Software (VitalView® Data Acquisition System, Software version 4.0). Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg, i.p.) e cada animal recebeu um sensor de telemetria (modelo G2 E-Mitter, Mini-MitterCompany, Sun River, OR, USA) na cavidade abdominal através de uma pequena abertura feita na pele e no músculo, que foram suturados em seguida. Cada caixa individual contendo o animal foi posicionada sobre uma placa receptora (ER-4000 Energizer/Receiver, Mini-MitterCompany, Sun River, OR, USA) conectada a um computador que contém o software de aquisição de dados. Os registros da Tinterna e da ALE começaram a ser registrados 7 dias após a realização da cirurgia.

6.8. Registro da frequência cardíaca por telemetria

Antes da implantação, os transmissores de telemetria foram cuidadosamente preparados com a aplicação de um gel biocompatível na ponta do cateter, para evitar a entrada de sangue, e foram verificados os valores basais (*offset*) de pressão de cada transmissor para calibração do sistema. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas, com ajuda de um microscópio cirúrgico (DFZ MC-A199, DF Vasconcellos SA Óptica e Mecânica de Alta Precisão, Valença, RJ). Os camundongos foram anestesiados pela inalação de isoflurano (5%, para a indução e 2-2,5% para manutenção) diluído em 100% de oxigênio. A indução realizou-se numa câmara de plástico e, quando o animal estava adequadamente anestesiado, o mesmo foi colocado na mesa cirúrgica. A mistura de anestésico foi provida por um vaporizador de isoflurano (Calibrado Vaporizador Takaoka, modelo ISOVAPOR 1224, K. Takaoka Ind. Com.. Ltda., São Paulo-SP, Brasil), o qual entregava a mistura em um tubo acoplado a uma seringa (3,0 ml) cortada, a qual atuava como máscara para o animal. Os animais foram instrumentados com transmissores de telemetria (TA11PA-C10, Data Sciences International, St. Paul, MN). Resumidamente, após remoção dos pelos com creme depilatório e desinfecção da pele, foi feita uma incisão na linha média na região cervical ventral e a carótida esquerda foi isolada. Em seguida, a sonda do transmissor foi inserida no vaso e, através de um túnel sob a pele, o transmissor telemétrico foi posicionado, subcutaneamente, no flanco direito do animal. A pele foi, então, fechada por meio de sutura de seda.

Após a implantação do transmissor, os animais foram deixados para recuperação durante 7-10 dias antes do registro basal da frequência cardíaca.

Os registros foram realizados durante 5 minutos a cada 1 hora. A aquisição de dados foi realizada com o software Dataquest A.R.T.™ System (Data Sciences International, St. Paul, MN) com frequência de amostragem de 2 kHz.

6.9. Isolamento de cardiomiócito ventricular de animais adultos e tratamento in vitro com isoproterenol

Cardiomiócitos de camundongos C57BL/6J foram isolados de acordo com metodologia previamente descrita (Jesus *et al.*, 2020). Resumidamente, o coração foi rapidamente removido e retro-perfundido via método de Langendorff com solução DB (*Digestion Buffer*) livre de Ca^{2+} (em mmol/L: NaCl, 130; KCl, 5,4; HEPES, 25; MgCl_2 , 0,5; NaH_2PO_4 , 0,33; Glicose, 22 e insulina 100 U/mL; pH=7,4 ajustado com NaOH) contendo EGTA (0,15 mmol/L). Posteriormente, o coração foi perfundido com DB contendo 50 $\mu\text{mol/L}$ de CaCl_2 e colagenase (tipo 2 – 1,1 mg/mL). Após a etapa de digestão química, o órgão foi submetido à digestão mecânica e filtrado para remoção do tecido não digerido. A concentração extracelular de Ca^{2+} foi aumentada após três ciclos de centrifugação e troca de tampão, chegando a 500 $\mu\text{mol/L}$ ao final do processo. Logo após, as células foram novamente centrifugadas e mantidas em meio 199 suplementado com 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*, #A4766801, Thermo Fischer Scientific). Os cardiomiócitos foram dispostos em placa de 6 poços e tratadas durante 30 minutos com isoproterenol (10 nmol/L), sendo estimulados durante todo este período a 1 Hz, 30V. Logo após este período as células foram coletadas e utilizadas para experimentos de RT-qPCR.

6.10. Avaliação da contratilidade celular de cardiomiócitos

A contratilidade dos cardiomiócitos ventriculares isolados nos ZT1 ou ZT13 foi avaliada como descrito anteriormente por Jesus *et al.*, 2020. As células isoladas foram colocadas em uma câmara com base de lâmina de vidro montada sobre a plataforma de um microscópio invertido e estimuladas a 1 Hz através de eletrodos de platina (Myopacer, Campo estimulador, Ionoptix, EUA), com pulsos de voltagem de duração de 5 ms e intensidade de 50V. As células foram visualizadas em um monitor de computador com uma câmera NTSC (Myocam, Ionoptix, EUA), no modo varredura parcial. Esta imagem foi usada para medir o encurtamento celular (índice de contratilidade), em resposta à estimulação elétrica usando um detector de borda de movimento de vídeo (IonWizard, Ionoptix, EUA). A fração de encurtamento das células foi calculada a partir da saída do detector de arestas usando um IonWizard conversor A/D (Ionoptix, Milton, MA , EUA) (Fig. 17).

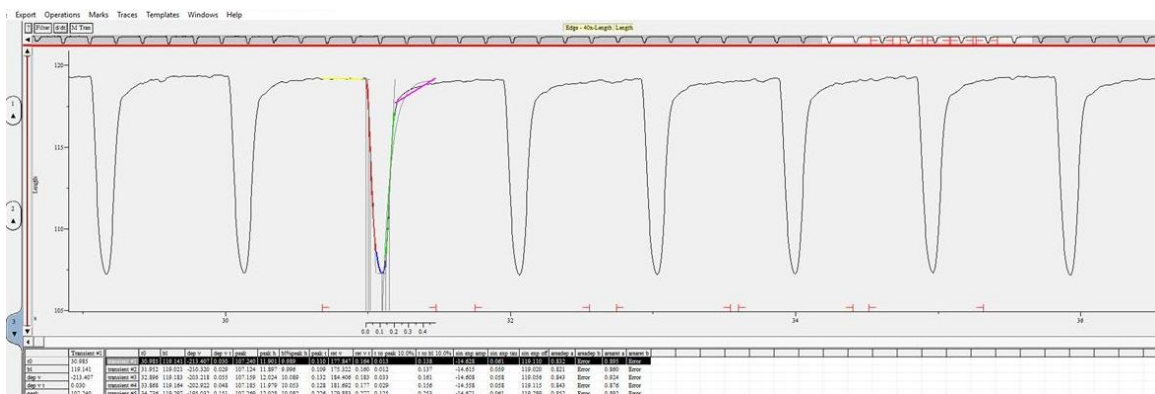


Figura 17: Exemplo da análise da contratilidade do cardiomiócito ventricular de camundongo utilizando o programa IonWizard.

6.11. Análise da hipertrofia cardíaca

Após oito dias de tratamento com isoproterenol, a hipertrofia cardíaca foi analisada através da relação peso úmido do coração (átrios + ventrículos) pelo

tamanho da tíbia esquerda. Além disto, foi analisada a área celular de cardiomiócitos isolados dos grupos controle ou isoproterenol, usando o software Zen 2012 (Fig. 18). Fotografias das células isoladas foram adquiridas no microscópio confocal Zeiss LSM 880 (Zeiss) situado no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) no ICB/UFMG.

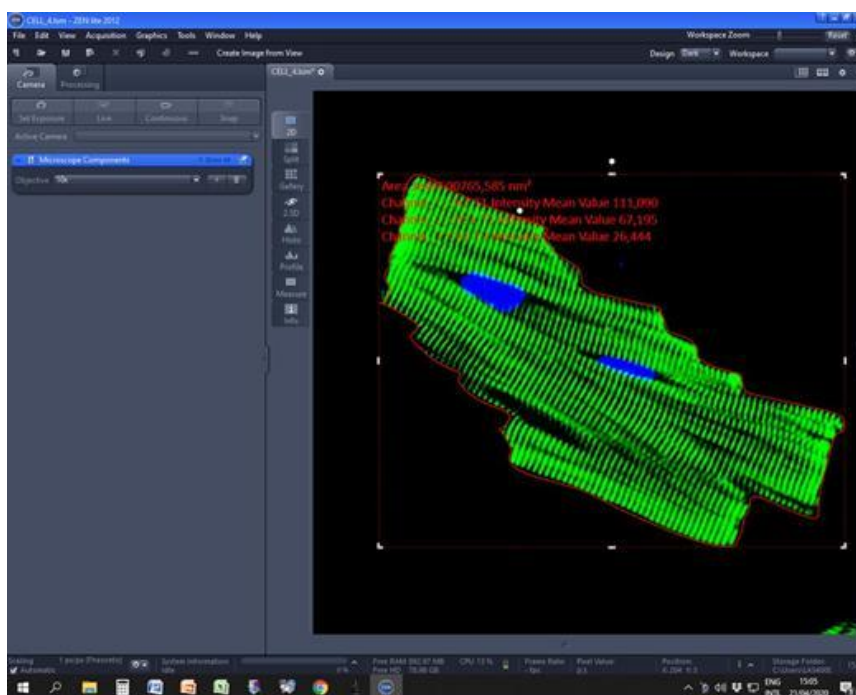


Figura 18: Exemplo da realização da análise da área celular de cardiomiócitos utilizando o software Zen 2012. Verde: α -actinina. Azul: DAPI. Imagem adquirida no microscópio Zeiss LSM 880 situado no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) no ICB/UFMG. Objetiva: 63X.

6.12. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

6.12.1. Extração do RNA

A extração do RNA do tecido cardíaco ou do cardiomiócito ventricular isolado foi realizada utilizando o TRI Reagente (#T9424, Sigma-Aldrich) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, após a homogeneização do material biológico com o TRI Reagente, procedeu-se com

a separação das fases e precipitação do RNA utilizando, respectivamente, clorofórmio (#C2432, Sigma-Aldrich) e álcool isopropílico (#I9516, Sigma-Aldrich). O RNA obtido foi lavado com etanol 75%. Após a secagem do pelete, o mesmo foi ressuspenso em água tratada DEPC (#750023, Invitrogen Life Technologies), livre de RNase. A dosagem da concentração do RNA total extraído foi realizada utilizando o aparelho NanoVue Plus, GE Healthcare®.

6.12.2. Tratamento do RNA com DNase

As amostras de RNA foram tratadas utilizando o Turbo DNA-free kit (#AM1907, Invitrogen Life Technologies). Em 15-20 µL de RNA foi adicionado 1,5-2,0 µL de TurboDNase buffer e em seguida foi acrescentado 1 µL da *Turbo DNase*. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Logo após, foi acrescentado 3 µL do reagente de inativação da DNase. As amostras foram mantidas durante 2 minutos a temperatura ambiente e homogeneizadas durante todo esse tempo. Em seguida, foram centrifugadas (12.000 rpm, 4°C) durante 2 minutos e o sobrenadante foi removido para um novo tubo. As amostras foram novamente dosadas para determinar a concentração de RNA utilizando o aparelho NanoVue Plus, GE Healthcare®.

6.12.3. Síntese do cDNA, amplificação e quantificação do mRNA

Para síntese do cDNA, 1 µg de RNA total tratado com DNase foi utilizado. Para amplificação do RNA mensageiro o volume de amostra foi ajustada para 9 µL com água DEPC e incubada durante 5 minutos a 70°C com Randon Primer e o Oligo(dT)18, que inicia a síntese de cDNA a partir da cauda poli-A presente na extremidade 3' do RNA mensageiro de eucariotos. Após

ficarem 5 minutos no gelo, foi adicionado 1 µL de dNTP (10 µmol/L), 4 µL de 5X PCR buffer e 3 µL de água DPEC. Por fim, foi acrescido 1 µL da enzima M-MLV Reverse Transcriptase (#28025021, Invitrogen Life Technologies) e as amostras foram incubadas durante 1 h a 45°C.

Para a reação de quantificação um mix com volume final de 15 µL foi preparado utilizando 1,2 µL de cDNA, 7,5 µL do reagente iTaq Universal SYBR Green Supermix (#1725121, Bio-Rad), 1,5 µL dos primers dos alvos de interesse (Forward + Reverse, cada um numa concentração estoque de 10 µmol/L) ou 0,36 µL dos primers do gene normalizador (S26, Forward + Reverse, cada um numa concentração estoque de 10 µmol/L) e 4,8 µL ou 5,96 µL de água ultrapura do tipo I, estéril e filtrada. Em todos os experimentos, foi realizado um controle negativo substituindo o cDNA por água ultrapura do tipo I, estéril e filtrada. A reação ocorreu no equipamento StepOnePlus System (Applied Biosystems). A expressão gênica foi calculada com base no valor do $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Na tabela 2 encontra-se a sequência dos primers utilizados no RT-qPCR.

Tabela 2: Lista com as sequências dos primers utilizados no RT-qPCR.

Alvo	Sequência (5'-3')
Mm Clock - forward	AGAACTTGGCATTGAAGAGTCTC
Mm Clock - reverse	GTCAGACCCAGAATCTTGGCT
Mm Bmal1 - forward	AGCTTCTGCACAATCCACAGCAC
Mm Bmal1 - reverse	TGTCTGGCTCATTGTCTTCGTC
Mm Per1 - forward	AGCAGGTTTCAGGCTAACCAGGAAT
Mm Per1 - reverse	AGGTGTCCTGGTTTCGAAGTGTGT
Mm Cry1 - forward	CACTGGTTCCGAAAGGGACTC
Mm Cry1 - reverse	CTGAAGCAAAAATCGCCACCT
Mm S26 - forward	CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT
Mm S26 - reverse	CGATTCCTGACAACCTTGCTA

Mm = Mus Muculus

6.13. Western blotting

Corações, cardiomiócitos ventriculares e cérebros foram homogeneizados por 30 minutos em tampão de lise (em mM: NaCl, 100; Tris-base, 50; EDTA-2Na, 5; Na₄P₂O₇·10H₂O, 50; MgCl₂, 1; pH 8,0) com detergentes (Nonidet P40 1%, Triton x-100 0.3% e deoxicolato de sódio 0,5%), contendo inibidores de protease (PMSF 200 mM; benzamidina 15.7 mg/mL; pepstatina 10 mM; aprotinina 10 mg/mL) e inibidores de fosfatase (em mM: NaF, 20; Na₃VO₄, 1). Ao fim do procedimento, seguiu-se a centrifugação do material (12 min, 8.000 rpm, 4°C), coleta do sobrenadante e acondicionamento em freezer -80°C para posterior uso. As proteínas foram quantificadas de acordo com o método descrito por (Bradford, 1976).

30 µg de proteínas foram separados por gel de poli-acrilamida cuja concentração do gel de separação variou de 10 a 12% dependendo da massa molecular da proteína-alvo. As amostras foram aquecidas a 95^o por 5 minutos e as corridas de eletroforese foram realizadas com voltagem fixa em 120V e tempo máximo de 1 hora e 40 minutos. A transferência foi realizada utilizando-se o aparato de transferência semi-dry (Bio-Rad), com voltagem fixa em 20V e tempo de transferência variando de 25 a 30 minutos, dependendo da massa molecular da proteína-alvo. Todas as membranas foram coradas em solução de Ponceau para monitorar a qualidade da transferência. Logo após, as membranas foram lavadas com solução de TBS-T (*Tris-Buffered Saline*; em mmol/L: NaCl, 150; Tris, 25 e 0,05% de Tween 20; pH 8,0). O bloqueio foi realizado em solução de TBS-T com leite a 5% por 1 hora a temperatura ambiente com o intuito de bloquear ligações não específicas. As membranas

foram incubadas entre 16-20 horas a 4°C com anticorpos primários diluídos em solução de leite 1% com TBS-T. Em alguns casos, foi utilizado BSA (albumina bovina) diluída no TBS-T para realizar o bloqueio (5%) e/ou para incubar o anticorpo primário (1%). Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-T por 30 minutos (3 vezes de 10 minutos) e incubadas com o anticorpo secundário adequado conjugado a peroxidase (HRP) por 1 hora em temperatura ambiente. Após este período, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T por 30 minutos (3 vezes de 10 minutos). As bandas foram detectadas por reação de quimioluminescência utilizando o reagente ECL Plus® e analisadas no Image Quant TL®. Foram utilizados o GAPDH ou HSP90 como normalizadores da expressão protéica. Para proteínas fosforiladas, foi realizada a normalização pela expressão da proteína total.

Na tabela 3 encontra-se a descrição dos anticorpos primários e na tabela 4 os anticorpos secundários utilizados para o *western blotting*:

Tabela 3: Lista dos anticorpos primários utilizados para o western blotting.

Anticorpo	Referência	Marca	Diluição
Mouse anti-TH	sc-25269	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Rabbit anti-phosphoCREB(Ser133)	9198S	Cell Signaling	1:500
Rabbit anti-Histone H3	4499	Cell Signaling	1:2000
Mouse anti-GAPDH	sc-32233	Santa Cruz Biotechnology	1:3000
Rabbit anti-VACHT	139-103	Synaptic Systems	1:1000
Rabbit anti-ChAT	ab178850	ABCAM	1:1000
HRP anti-HSP90α/β	sc-13119	Santa Cruz Biotechnology	1:3000
Rabbit anti-GSK3β (Ser9)	9336S	Cell Signaling	1:1000
Rabbit anti-GSK3β	9315	Cell Signaling	1:1000
Rabbit anti-phosphoERK1/2	4370	Cell Signaling	1:1000
Rabbit anti-ERK1/2	9102L	Cell Signaling	1:1000
Rabbit anti-β1 AR	PA1-049	ThermoFisher Scientific	1:500
Rabbit anti-β2 AR	PA5-27083	ThermoFisher Scientific	1:500

Tabela 4: Lista dos anticorpos secundários utilizados para o western blotting.

Anticorpo	Referência	Marca	Diluição
Anti-Rabbit	A0545	Sigma-Aldrich	1:15.000
Anti-Mouse	A2554	Sigma-Aldrich	1:15.000

6.14. Fracionamento de proteínas do citoplasma/núcleo de cardiomiócitos

Os cardiomiócitos foram macerados durante 30 minutos em tampão Ripa (em mM: NaCl, 150; Tris-base, 50; pH 7,4) com detergentes (Nonidet P40 1% e deoxicolato de sódio 0,5%), contendo inibidores de protease (PMSF 200 mM; benzamidina 15.7 mg/mL; pepstatina 10 mM; aprotinina 10 mg/mL) e inibidores de fosfatase (em mM: NaF, 20; Na₃VO₄, 1). Logo após, o homogenato foi centrifugado (5 minutos, 16.000xg, 4°C) e o sobrenadante, rico em fração

proteica citoplasmática, foi coletado e acondicionamento em freezer -80°C para posterior uso. O *pellet* formado após a centrifugação foi lavado 2x com solução de RIPA e incubado no gelo durante 30 minutos com RIPA + 3% de SDS 10%. A cada 10 minutos as amostras eram agitadas vigorosamente com ajuda do agitador vórtex. Prosseguiu-se com a centrifugação (10 minutos, 16.000 g, 4°C) e o sobrenadante, rico em fração proteica nuclear, foi coletado e acondicionamento em freezer -80°C para posterior uso. A pureza das frações citoplasmática e nuclear foi avaliada através do *western blotting* para proteínas citoplasmática (GAPDH) ou nuclear (Histona-H3). As proteínas foram quantificadas de acordo com o método descrito por (Bradford, 1976).

6.15. Imunofluorescência

Camundongos anestesiados com ketamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg, i.p.) foram submetidos à toracotomia e os corações foram perfundidos com 10 mL de solução de KCl (10%), seguidos por 10 mL de PBS 1X (*Phosphate-Buffered Saline*) com uma seringa, que tinha a agulha posicionada dentro do ventrículo esquerdo. Logo após, os corações foram embebidos em Tissue-Tek (#4583, Sakura) e cortado com espessura de 8 µm em um criostado. As lâminas contendo cortes do coração foram fixadas com PFA a 4% por 30 minutos e lavadas com solução de PBS 1X. Em seguida, eles foram incubados em uma câmara úmida com o anticorpo anti-TH (1:100, #sc-25269, Santa Cruz Biotechnology) overnight a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em solução PBS1X com BSA 1% e incubadas com anticorpo secundário anti-mouse conjugado ao Alexa Fluor 633 (1:500, #A21050,

ThermoFisher Scientific) e com o anticorpo anti-WGA conjugado ao Alexa Fluor 647 para marcação da membrana celular (5 µg/ml, #W32466, ThermoFisher Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente. Depois disso, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e seladas. As imagens de fluorescência foram capturadas usando o microscópio confocal Zeiss LSM 880 (Zeiss) situado no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) no ICB/UFMG.

6.16. Avaliação *in vitro* da atividade do promotor CRE

A linhagem celular recombinante HEK-293 - CRE/CREB Reporter (Luc) foi obtida comercialmente (#60515, BPS Bioscience) e cultivada *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM *high glucose*, #11965118, ThermoFisher Scientific) suplementado com 10% de FBS e penicilina-estreptomicina 100 U/mL a 37°C em de 5% de CO₂. A 80-90% de confluência, as células foram pré-incubadas com propranolol (1 µmol/L) ou PD 98059 (10 µmol/L, 53000, Calbiochem) por 45 minutos. Posteriormente, as células foram submetidas a concentrações crescentes de isoproterenol (10 pmol/L-100 µmol/L) por 3 horas na ausência ou presença de propranolol ou PD 98059. O ensaio de luciferase *ONE-Step Luciferase Assay System* (#60690-1, BPS Bioscience) e a quantificação foram realizados de acordo com a recomendação do fabricante. Os valores absolutos foram subtraídos pelo branco (células não estimuladas com *ONE-Step Luciferase Assay System*) e divididos pelo valor de luminescência da célula não incubadas com isoproterenol, propranolol ou PD 98059, mas estimuladas com *ONE-Step Luciferase Assay System*.

6.17. Avaliação ex vivo da atividade do promotor CRE

Para realização deste experimento, foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 albinas CRE-luciferase reporter. A injeção i.p. de isoproterenol (4 mg/kg) foi administrada no ZT1. Após 1 h da injeção os animais foram eutanasiados por decaptação, os corações cuidadosamente removidos, limpidos em solução salina (NaCl 0,9%) e imediatamente colocados no sistema de imagem IVIS (Xenogen IVIS Lumina). D-Luciferina (100 mg/kg, i.p., 88292, ThermoFisher Scientific) foi injetada 10 minutos antes da eutanásia dos animais. As análises foram realizadas no software *Living Image* (Xenogen) (Zhang *et al.*, 2010).

6.18. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados com média \pm erro padrão, sendo considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram analisados pelo teste de análise de variância de duas vias seguido pelo teste de Tukey. Quando apropriado, as análises foram realizadas por meio: (i) análise de variância de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls, ou (ii) pelo teste t-Student pareado ou não. As análises foram realizadas no programa estatístico Graph Pad Prism versão 8.0. A construção dos actogramas e as análises dos parâmetros rítmicos de ALE e TC foram realizadas pela programa *ClockLab*.

7. Resultados

7.1. A desnervação simpática periférica altera a expressão e oscilação dos clock genes no coração

Com o objetivo de avaliar o impacto da desnervação simpática na oscilação dos *clock genes* no coração, camundongos C57BL/6J foram tratados com 6-hidroxidopamina (6-OHDA, 100 mg/kg, i.p.). O tratamento com a 6-OHDA foi realizado nos dias 1 e 3, e no dia 5, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical (Fig. 19a). Ao fim do tratamento os animais controles tiveram aumento do peso corporal (+3%) enquanto o grupo 6-OHDA perdeu em torno de 3% de peso, quando comparado aos valores do início do tratamento (Fig. 19b). Nenhuma alteração significativa foi observada na relação peso do coração normalizado pelo tamanho da tíbia esquerda entre os dois grupos experimentais (Fig. 19d).

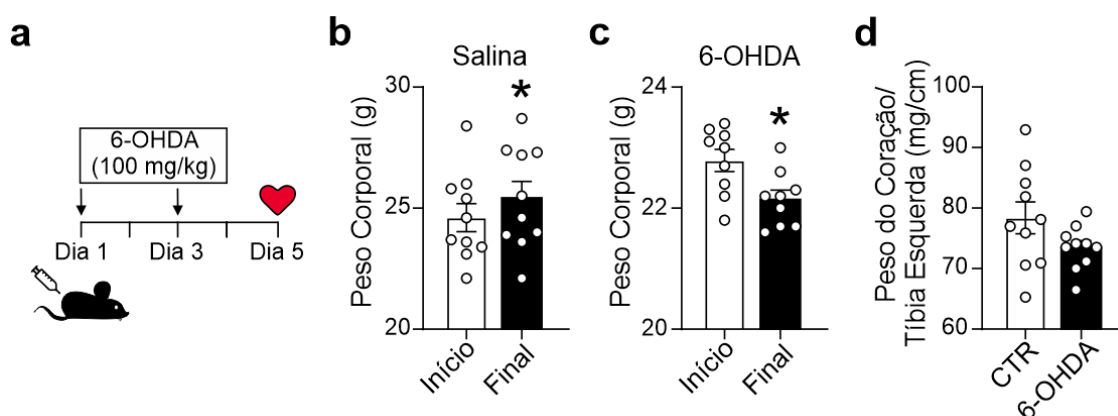


Figura 19: 6-OHDA promove redução do ganho de peso corporal e não altera a razão peso do coração/tíbia esquerda em camundongos. a) Esquema ilustrativo do protocolo de tratamento com a 6-OHDA. **b)** Gráfico de barras com a média do peso corporal de camundongos antes e após o tratamento com salina. **c)** Gráfico de barras com a média do peso corporal de camundongos antes e após o tratamento com 6-OHDA. **d)** Gráfico de barras com a média da razão peso do coração pelo tamanho da tíbia esquerda de camundongos

tratados com salina (CTR) ou com 6-OHDA. Média \pm erro padrão. n=9-10 animais por grupo experimental. * $p < 0,05$. Em **b** e **c**: teste t-Student pareado. Em **d**: teste T-Student não pareado.

Para confirmar se de fato o tratamento com 6-OHDA foi eficiente em promover a desnervação simpática, analisamos por imunofluorescência do tecido cardíaco e *western blotting* de homogenatos de coração, a expressão da tirosina hidroxilase (TH), um marcador da presença de neurônios catecolaminérgicos. Na figura 20a é possível observar nas imagens de microscopia confocal, obtidas a partir de criocortes do ventrículo esquerdo (VE), a presença da TH (marcação em amarelo) no VE dos animais CTR. A 6-OHDA, por sua vez, promoveu uma perda pronunciada na marcação desta proteína no VE (Fig. 20a). Este resultado foi corroborado por *western blotting*, no qual detectamos uma diminuição de cerca de 80% na expressão da TH no grupo 6-OHDA, quando comparado ao grupo CTR (Fig. 20b).

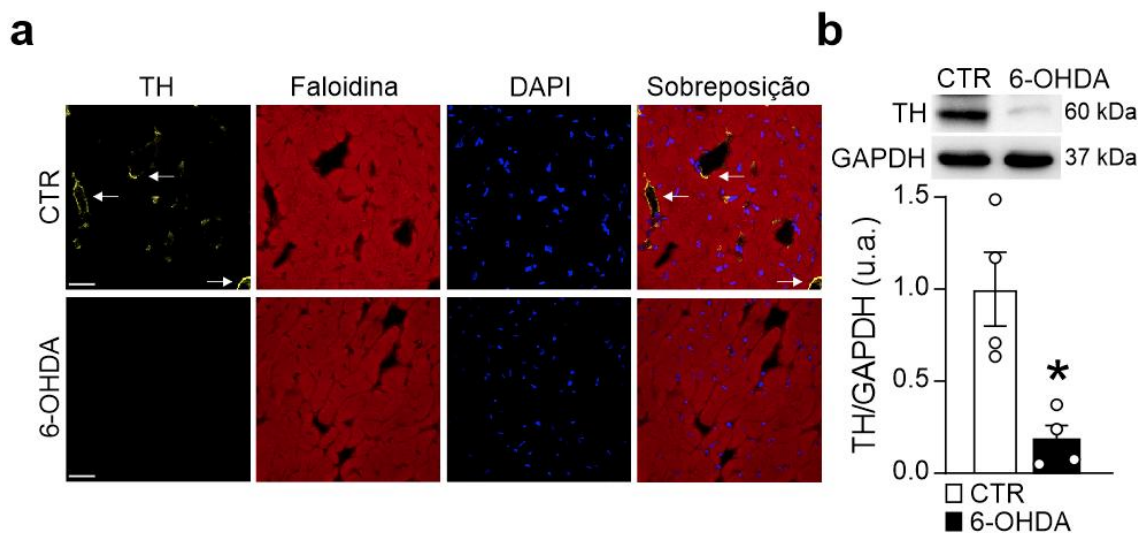


Figura 20: O tratamento com 6-OHDA promove diminuição na expressão da TH no ventrículo esquerdo de camundongos. a) Imagens representativas de microscopia confocal mostrando a perda da marcação da TH (em amarelo) no ventrículo esquerdo do grupo 6-OHDA. Em vermelho: faloidina. Em azul: DAPI. Barra: 20 μ m. **b)** Painel superior: imagens representativas de western blotting para TH e GAPDH. Painel inferior: gráfico de barras com a média da expressão da TH nos corações de animais tratados com salina (CTR) ou com 6-

OHDA. Média \pm erro padrão. n=4 homogenatos de coração por grupo experimental. *p<0,05. Teste t-Student não pareado.

Para verificar se a 6-OHDA exerce efeito inespecífico no sistema colinérgico cardíaco, avaliamos a expressão da ChAT (colina acetiltransferase) e VACht (transportador vesicular da acetilcolina) em homogenatos de corações. Como apresentado na Fig. 21, não foi observada diferença na expressão destes dois marcadores colinérgicos entre os grupos experimentais.

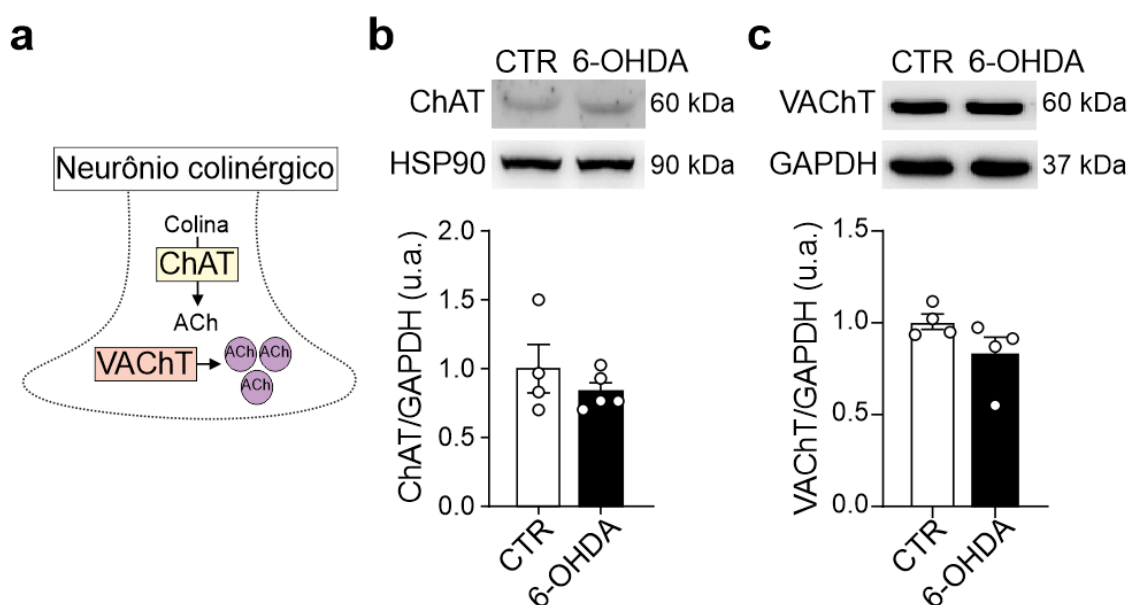


Figura 21: O tratamento com 6-OHDA não altera a expressão da ChAT e VACht no coração de camundongos. **a)** Esquema ilustrativo mostrando a ChAT e VACht em um terminal nervoso colinérgico. **b)** Painel superior: imagens representativas de western blotting para a ChAT e GAPDH. Painel inferior: gráfico de barras com a média da expressão da ChAT em corações de camundongos tratados com salina (CTR) ou 6-OHDA. **c)** Painel superior: imagens representativas de western blotting para o VACht e GAPDH. Painel inferior: gráfico de barras com a média da expressão do VACht em corações de camundongos tratados com salina (CTR) ou 6-OHDA. Média \pm erro padrão. n=4-5 homogenatos de coração por grupo experimental. Teste t-Student não pareado.

Tendo em vista os resultados anteriores que mostraram que a 6-OHDA foi eficiente e específica em promover a morte de neurônios catecolaminérgicos no coração, decidimos investigar neste modelo o perfil de oscilação do *Clock*,

Bmal1, *Per1* e *Cry1* no coração. Para isto, os animais CTR ou 6-OHDA foram eutanasiados em quatro diferentes horários: ZT0 (horário que as luzes do biotério acendem), ZT6, ZT12 (horário em que as luzes do biotério apagam) e ZT18. Os corações foram coletados e utilizados para experimentos de RT-qPCR (Fig. 22a). É possível observar na Fig. 22b-e que os genes *Clock* e *Bmal1* apresentam redução na sua expressão na transição entre as fases clara e escura, enquanto a expressão do *Per1* aumenta neste mesmo período nos corações controle (representados pelas bolinhas abertas (o)). Nenhuma alteração significativa foi observada no *Cry1* (Fig. 22e). Ao avaliarmos a oscilação destes alvos nos animais tratados com 6-OHDA (representados pelas bolinhas fechadas (●)), vimos que a desnervação simpática diminuiu a expressão do *Clock* e *Bmal1* em alguns ZTs, sem alterar o padrão oscilatório destes alvos (Fig. 22b-e). Já para o *Per1*, a desnervação simpática causou a mudança do ritmo de circadiano para ultradiano, que é caracterizado por dois picos de expressão num período de 24 horas (Fig. 22d). Nenhuma alteração significativa foi vista para o *Cry1* entre os dois grupos experimentais (Fig. 22e). Um resumo dessas alterações é ilustrado no *heat map* da Fig. 22f.

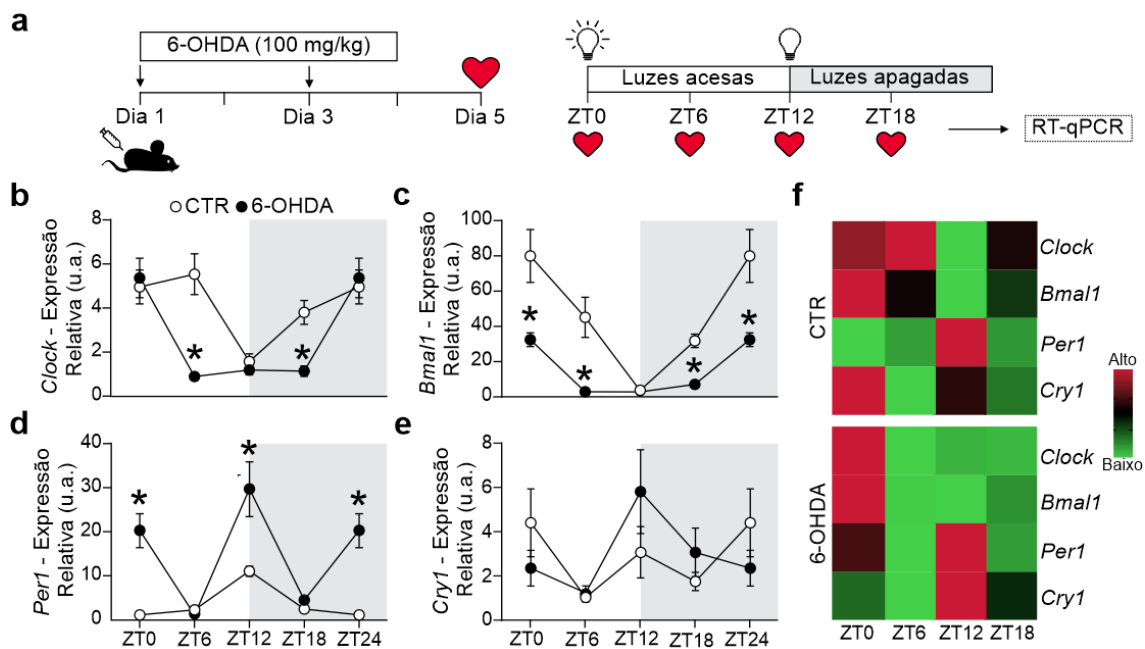


Figura 22: A desnervação simpática do coração altera a expressão e oscilação dos clock genes cardíacos. a) Esquema ilustrativo do protocolo de tratamento e eutanásia utilizado. Gráficos ilustram o padrão de oscilação dos genes *Clock* (b), *Bmal1* (c), *Per1* (d) e *Cry1* (e) em corações de camundongos tratados com salina (CTR) (o) ou com 6-OHDA (●). Nos gráficos b-e as áreas em cinza correspondem medidas realizadas durante a fase escura (momento em que as luzes do biotério estavam apagadas). Os valores do ZT0 foram duplicados como ZT24 apenas para melhor visualização da curva de oscilação dos quatro alvos avaliados. f) *Heat Map* (mapa de calor) sumariza de forma ilustrativa a oscilação dos *clock genes* na situação controle a após o tratamento com 6-OHDA. Tons em verde correspondem a menor expressão do alvo, enquanto tons em vermelho correspondem a maior expressão do alvo avaliado. Média \pm erro padrão. $n=4-5$ corações por ZT e por condição experimental. * $p<0,05$ versus grupo salina do mesmo ZT. Teste Two-Way Anova.

Para verificar se as alterações observadas nos *clock genes* no coração, após a desnervação simpática, poderiam ser um efeito secundário da ação da 6-OHDA sob o relógio biológico central, duas estratégias experimentais distintas e complementares foram realizadas. Para isto investigamos: (i) o nível de expressão da TH no cérebro dos camundongos após o tratamento com a 6-OHDA; e (ii) a flutuação ao longo de 24 horas de duas variáveis circadianas controladas pelo relógio biológico central: a atividade locomotora espontânea (ALE) e a temperatura corporal. Como demonstrado na figura 23, o tratamento

intraperitoneal com a 6-OHDA não alterou a expressão da TH no cérebro de camundongos.

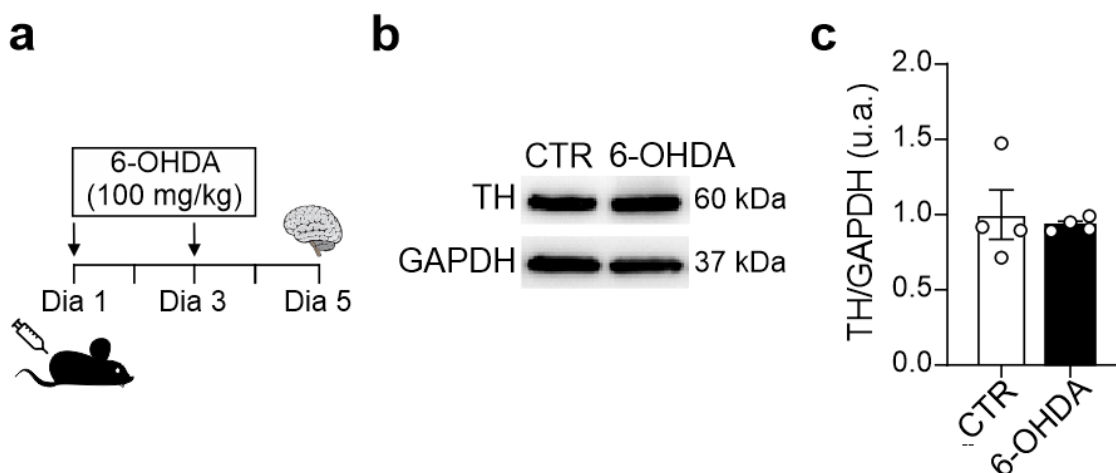


Figura 23: O tratamento intraperitoneal com 6-OHDA não altera a expressão da TH no cérebro de camundongos. a) Esquema ilustrativo do protocolo de tratamento com a 6-OHDA. b) Imagens representativas de western blotting para a TH e GAPDH. c) Gráfico de barras com a média da expressão da TH em cérebro de camundongos tratados com salina (CTR) ou 6-OHDA. Média \pm erro padrão. n=4 homogenatos de cérebro por grupo experimental. Teste t-Student não pareado.

Ao avaliarmos a ALE de camundongos por meio da telemetria, assim como esperado, observamos que durante a fase escura os camundongos passam a ser mais ativos, como pode ser visto no actograma da figura 24a com uma maior frequência de traçados pretos entre os ZT12 e ZT0 (fase escura). Curiosamente, o tratamento com a 6-OHDA (representado no actograma pelos asteriscos verdes), diminuiu a movimentação dos animais logo após as injeções. No entanto, ao analisarmos no quinto dia de tratamento os parâmetros *Onset* (média do horário em que os animais passam a se movimentar) e a *Acrophase* (média do horário em que acontece o pico de movimentação dos animais), não foi observada nenhuma diferença significativa entre os dois grupos experimentais (Fig. 24b-c). Corroborando este achado,

camundongos controles ou 6-OHDA apresentaram perfil semelhante de oscilação da temperatura corporal ao longo de 24 horas (Fig. 24d), sem nenhuma alteração nos parâmetros *onset* e *acrophase* do ritmo (Fig. 24e-f). Logo, estes dados sugerem que o tratamento com a 6-OHDA não interferiu em padrões que são determinados pelo relógio biológico central.

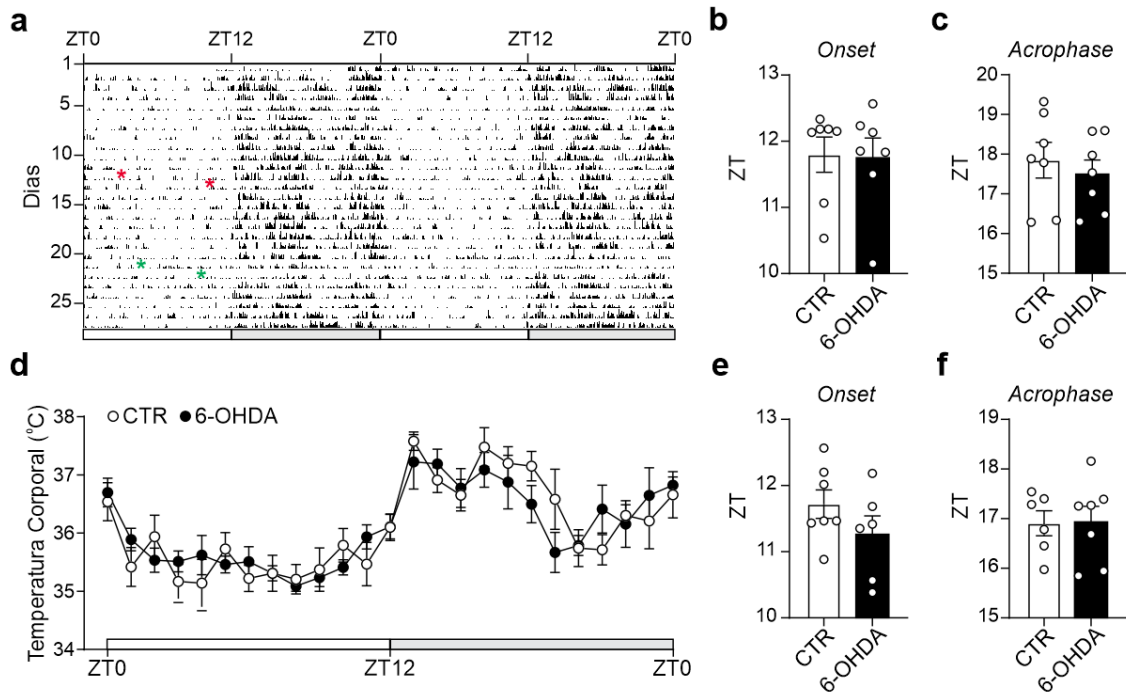


Figura 24: 6-OHDA não altera a atividade locomotora espontânea e a temperatura corporal de camundongos. **a)** Actograma mostrando o comportamento ao longo de 24 horas da atividade locomotora espontânea (ALE) de camundongos antes e após o tratamento com salina ou 6-OHDA. Os asteriscos vermelhos representam o momento das injeções de salina, enquanto os asteriscos verdes representam o momento das injeções de 6-OHDA. **b-c)** Gráfico de barras com a média dos valores do *onset* (**b**) e *acrophase* (**c**) para ALE antes e após o tratamento com 6-OHDA. **d)** Gráfico de linha com a média dos valores de temperatura corporal antes e após o tratamento com 6-OHDA. **e-f)** Gráfico de barras com a média dos valores do *onset* (**e**) e *acrophase* (**f**) para temperatura corporal antes e após o tratamento com 6-OHDA. As áreas cinza na parte inferior do actograma (**a**) e do gráfico (**d**) representam a medidas realizadas na fase escura. Média \pm erro padrão. n=7 animais. Teste t-Student pareado.

Tomados em conjunto, os primeiros resultados deste trabalho mostraram que: (i) a 6-OHDA conduz a morte de neurônios catecolaminérgicos no

coração, e (ii) a perda da inervação simpática cardíaca causou alterações significativas na oscilação e expressão de diferentes componentes do relógio biológico cardíaco, com efeito proeminente no *Per1*. A seguir, utilizou-se uma abordagem que combinou estratégias farmacológicas e o uso de animais geneticamente modificados para investigar extensivamente os mecanismos envolvidos no controle da transcrição dos *clock genes* cardíacos pela sinalização adrenérgica.

7.2. O *Per1* é sensível a alterações na sinalização β -adrenérgica no coração

Como supracitado, a atividade simpática flutua ao longo de 24 horas em roedores e humanos, contribuindo para os ajustes fisiológicos circadianos no coração. Para confirmar este conceito e expandi-lo no plano celular, comparamos a função contrátil de cardiomiócitos ventriculares isolados em dois horários: ZT1 (fase clara) e ZT13 (fase escura) (Fig. 25a). Na Fig. 25b estão ilustrados traçados representativos do encurtamento e relaxamento de cardiomiócitos ventriculares isolados e estimulados a contrair por meio da estimulação elétrica (1Hz, 50V). A partir da análise destes traçados, foi possível concluir que no ZT13 o cardiomiócito ventricular passa a contrair com maior força e velocidade, caracterizado pelo aumento na fração de encurtamento (Fig. 25c), taxa de encurtamento (Fig. 25d), taxa de relaxamento (Fig. 25e) e diminuição no tempo para 50% do relaxamento celular (Fig. 25f).

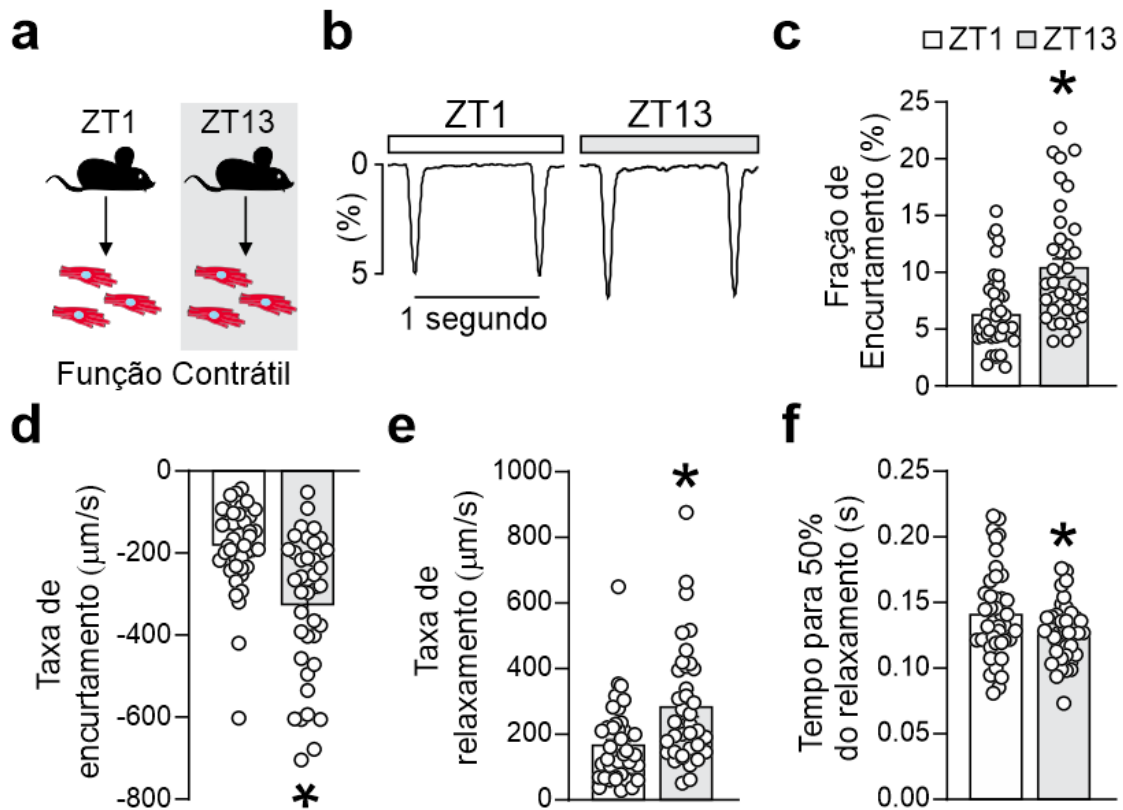


Figura 25: Aumento da função contrátil de cardiomiócitos ventriculares de camundongo é observado no ZT13. a) Esquema ilustrativo do protocolo experimental realizado. **b)** Traçados representativos do registro contrátil de cardiomiócitos ventriculares isolados nos ZT1 (fase clara) e ZT13 (fase escura). **c)** Gráfico de barras com a média da fração de encurtamento de cardiomiócitos isolados no ZT1 e ZT13. **d)** Gráfico de barras com a média da taxa de encurtamento de cardiomiócitos isolados no ZT1 e ZT13. **e)** Gráfico de barras com a média da taxa de relaxamento de cardiomiócitos isolados no ZT1 e ZT13. **f)** Gráfico de barras com a média do tempo para 50% do relaxamento de cardiomiócitos isolados no ZT1 e ZT13. Média \pm erro padrão. $n=39-44$ células analisadas de 3 corações isolados por ZT. $*p<0,05$. Teste t-Student não pareado.

Tendo em vista os resultados obtidos com a 6-OHDA que mostraram um paralelo entre a oscilação dos *clock genes* cardíacos nas fases clara/escura e a atividade simpática, levantou-se o questionamento se poderia existir uma relação direta entre estes dois fenômenos. Para responder esta pergunta, aplicamos um protocolo experimental no qual o aumento da atividade simpática durante a transição da fase clara para a escura foi bloqueada, e nesta condição

avaliamos a expressão dos *clock genes*. Para isto, a expressão dos *clock genes* foi avaliada nos ZT1 e ZT13 em corações de camundongos controle (NaCl 0,9%, 250 µl, i.p.) e tratados com o β-bloqueador propranolol (10 mg/kg, i.p.) em dois horários (ZT6 e ZT10, Fig. 26b). O registro de frequência cardíaca realizado por telemetria foi utilizado para acompanhar alterações na atividade simpática cardíaca. Como observado na Fig. 26b, as injeções de propranolol inibiram o aumento da frequência cardíaca entre os ZT1 e ZT13, confirmando desta forma o bloqueio β-adrenérgico no coração (Fig. 26b). Ao analisamos a expressão dos *clock genes*, observamos que o propranolol não interferiu na expressão de *Clock* (Fig. 26c) e *Bmal1* (Fig. 26d) no ZT13, mas inibiu completamente a elevação de *Per1* (Fig. 26e) no ZT13 quando comparado ao ZT1.

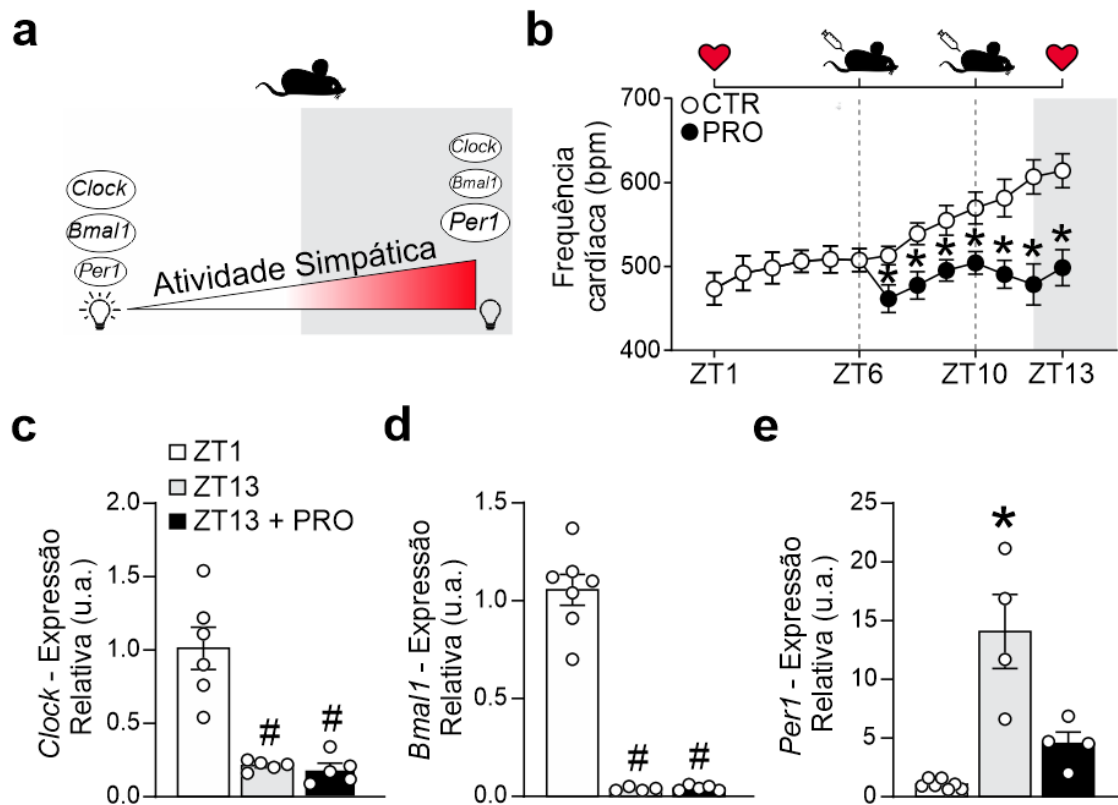


Figura 26: O bloqueio β -adrenérgico previne a flutuação da frequência cardíaca e o aumento na expressão de *Per1* durante a transição da fase clara para escura em camundongos. **a)** Esquema ilustrando as alterações na expressão dos *clock genes* e na atividade simpática cardíaca entre as fases clara e escura. **b) Painel superior:** Esquema ilustrativo com o protocolo de tratamento utilizado. **Painel inferior:** Gráfico de linha com a média dos valores de frequência cardíaca obtidos de camundongos entre os ZT1 e ZT13. No dia 1, foi realizado o registro basal (CTR, o) da frequência cardíaca entre os ZT1-ZT13. No dia 2, os animais foram tratados com duas injeções de propranolol (PRO, ●, 10 mg/kg, i.p.), nos horários circadianos ZT6 e ZT10. A área cinza do gráfico corresponde à fase escura (momento em que as luzes do biotério estavam apagadas). Média \pm erro padrão. $n=7$ animais. $*p<0,05$ versus grupo CTR do mesmo ZT. Teste T-Student pareado. **c)** Gráfico em barras com a média da expressão do *Clock* no ZT1, ZT13 e no ZT13 de camundongos tratados com propranolol. **d)** Gráfico em barras com a média da expressão do *Bmal1* no ZT1, ZT13 e no ZT13 de camundongos tratados com propranolol. **e)** Gráfico em barras com a média da expressão do *Per1* no ZT1, ZT13 e no ZT13 de camundongos tratados com propranolol. Média \pm erro padrão. $n=4-7$ corações. $\#p<0,05$ versus grupo ZT1. $*p<0,05$ versus demais grupos. Teste Two-Way Anova.

Para reforçar a hipótese construída a partir dos resultados anteriores de que a sinalização β -adrenérgica atua como um importante modulador da transcrição dos *clock genes* no coração, em especial o *Per1*, camundongos

foram tratados com isoproterenol (ISO). O horário escolhido de tratamento dos animais foi o ZT1, que corresponde a uma etapa do dia na qual a atividade simpática está reduzida (Fig. 27a). Sendo assim, o ISO (4 mg/kg, i.p.) foi administrado no ZT1, e os corações coletados 1, 2 ou 4 horas após a injeção. A dose de ISO usada neste protocolo experimental foi ajustada para promover um aumento da frequência cardíaca semelhante ao observado durante as primeiras horas da fase escura em camundongos (Fig. 27b). Temporalmente, o ISO aumentou a frequência cardíaca logo após 30' minutos de tratamento, com o pico de alteração ocorrendo após 90' minutos, e permanecendo elevada até o final do protocolo. (Fig. 27c).

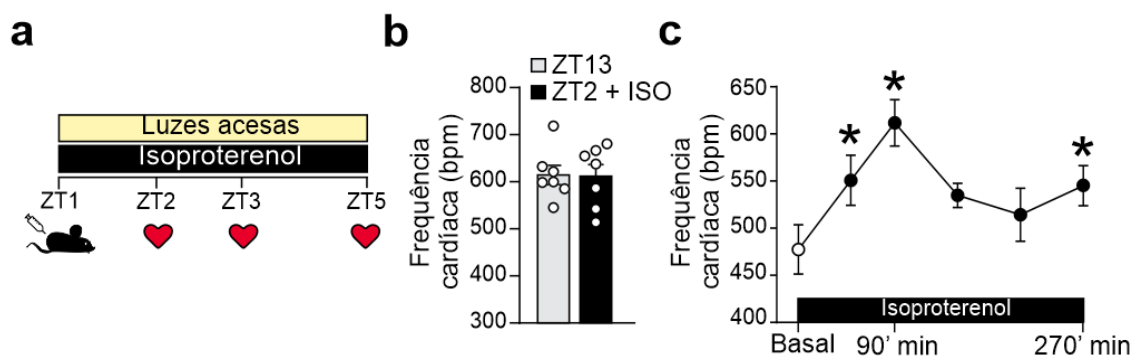


Figura 27: O tratamento com isoproterenol durante a fase clara aumenta a frequência cardíaca de camundongos. **a)** Esquema ilustrativo do protocolo de tratamento utilizado. **b)** Gráfico de barras com a média da frequência cardíaca no ZT13 e no ZT2 de camundongos tratados com ISO (4 mg/kg, i.p.). **c)** Gráfico de linha com a média da frequência cardíaca em camundongos tratados com ISO. Basal (o) e ISO (●). n=7 animais. Média ± erro padrão. *p<0,05 versus situação basal. Teste t-Student pareado.

Uma única injeção de ISO administrada na fase clara diminuiu de forma sustentada a expressão do *Clock* (Fig. 28a), não alterou a expressão do *Bmal1* (Fig. 28b), promoveu um aumento transiente na expressão do *Per1* após 1 hora de tratamento, seguido por uma redução na expressão deste alvo (Fig. 28c) e diminuiu a expressão do *Cry1* após 4 horas de tratamento (Fig. 28d).

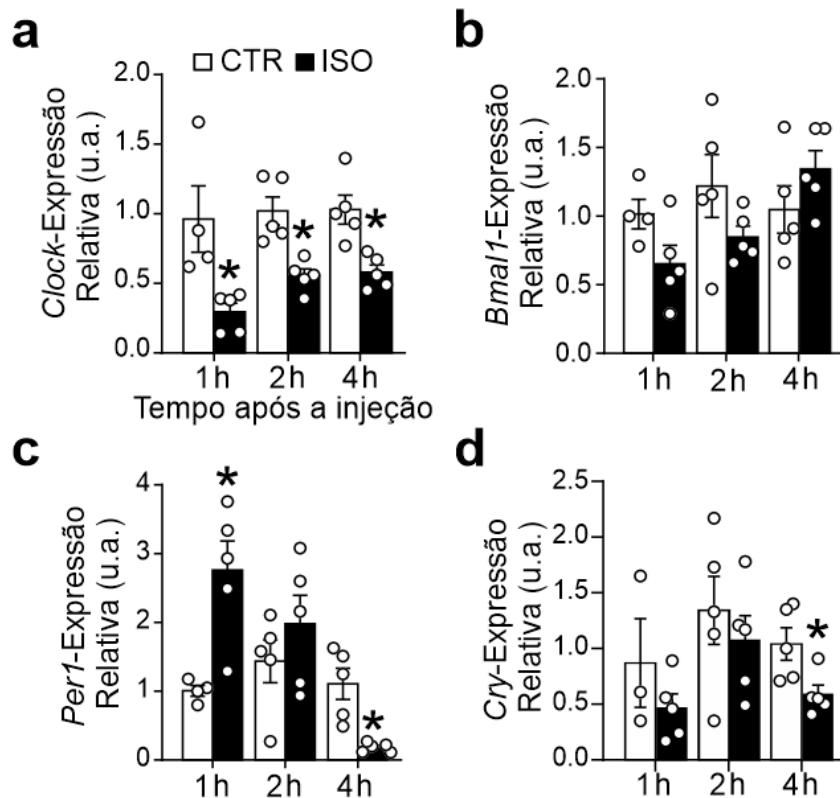


Figura 28: O estímulo β -adrenérgico durante a fase clara promove um aumento transitório de *Per1* no coração. a-d) Gráficos de barra com a média da expressão do *Clock* (a), *Bmal1* (b), *Per1* (c) e *Cry1* (d) no coração de camundongos tratados com salina (CTR) ou isoproterenol (ISO, 4 mg/kg, i.p.) ao longo de 4 horas. n=4-5 corações por tempo e por condição experimental. Média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ versus grupo CTR do mesmo tempo. Teste t-Student não pareado.

Em seguida, miócitos ventriculares foram isolados de camundongos C57BL/6J, entre os ZTs 2-4 e incubados durante 30 minutos com ISO (10 nmol/L) em temperatura ambiente. Para assegurar a condição mais próxima de uma situação fisiológica para este tipo celular, as células foram estimuladas eletricamente por eletrodos de platina (1Hz, 30V), durante todo o tratamento. Logo após o período de tratamento, os cardiomiócitos foram utilizados para experimentos de RT-qPCR (Fig. 29a). O gráfico da figura 29b mostra que o ISO aumentou a expressão de *Per1* no cardiomiócito ventricular.

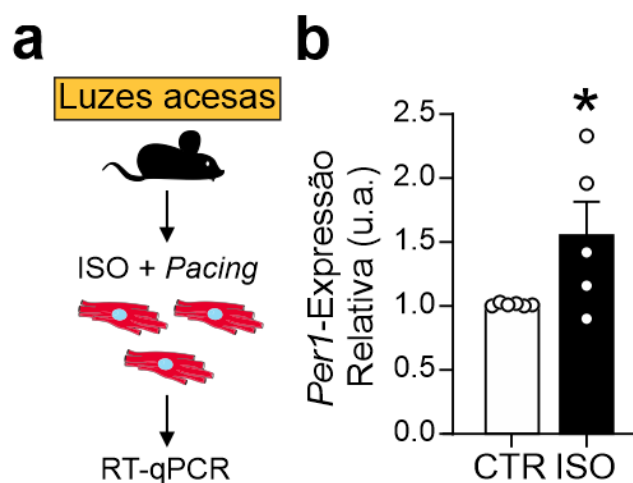


Figura 29: Cardiomiócitos ventriculares tratados com ISO apresentam aumento na expressão de *Per1*. **a)** Esquema ilustrativo do protocolo de tratamento utilizado. **b)** Gráfico de barras com a média da expressão de *Per1* em cardiomiócitos ventriculares tratados ou não (CTR) com ISO (10 nmol/L) durante 30 minutos. Durante todo o período de incubação com ISO, as células foram mantidas sob estimulação elétrica (1Hz, 30V). Média \pm erro padrão. Em **(b)** n=5-6 isolamentos de cardiomiócitos ventriculares. *p<0,05. Teste t-Student não pareado.

Uma vez observado que uma única injeção de ISO foi suficiente para causar alterações na expressão do *Clock*, *Per1* e *Cry1*, nos questionamos como estaria a expressão dos *clock genes* no coração após sucessivas injeções de ISO. Para responder a este questionamento, camundongos foram tratados durante oito dias com injeções diárias de isoproterenol (ISO-Crônico, 20 mg/kg, i.p.). No nono dia, os animais foram eutanasiados nos ZT1 e ZT13 e o coração coletado para experimentos de medida do peso do coração, análise da área celular e RT-qPCR (Fig. 30a). Como esperado, este regime de tratamento causou hipertrofia cardíaca caracterizada pelo aumento da relação do peso do coração pelo tamanho da tíbia esquerda (Fig. 30b) e aumento da área celular de cardiomiócitos ventriculares (Fig. 30c). Além disto, utilizando uma linhagem de camundongo repórter transgênico, que expressa a proteína fluorescente YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) sob o comando do promotor da cadeia pesada de miosina (*Myh7-YFP^{+/-}*), observamos que o tratamento crônico

com ISO promoveu aumento na expressão desta proteína, indicando que o coração passou por um estresse (Fig. 30d).

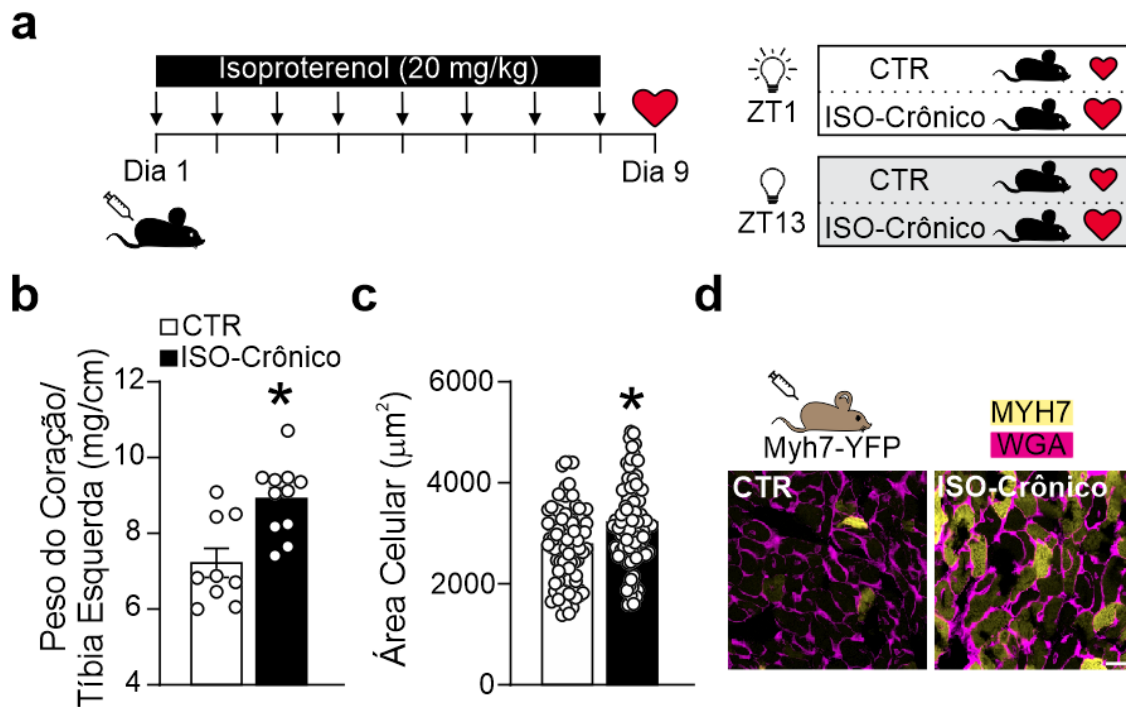


Figura 30: O tratamento crônico com isoproterenol causa hipertrofia cardíaca. a) Esquema ilustrativo do protocolo de tratamento utilizado. **b)** Gráfico de barras com a média dos valores da razão peso do coração pelo tamanho da tíbia esquerda de camundongos tratados com salina (CTR) ou com isoproterenol (ISO-crônico, 20 mg/kg, i.p.) durante 9 dias. **b)** Gráfico de barras com a média da área celular de cardiomiócitos ventriculares de camundongos CTR e tratados com ISO. **d) Painel superior:** Esquema ilustrativo do modelo transgênico utilizado. **Painel inferior:** Imagens representativas obtidas em microscópio confocal de criocortes de ventrículo esquerdo de camundongos Myh7^{+/-} controle (CTR) ou tratados com ISO (ISO-Crônico). A marcação amarela representa a MYH7 e a rosa a membrana plasmática marcada com WGA (*Wheat Germ Agglutinin*). Barra=20 µm. Média ± erro padrão. *p<0,05. Em **b**: n=9-10 animais por grupo experimental. Em **c**: 94-95 células analisadas de 3 corações por grupo experimental. Teste t-Student não pareado.

Neste regime de tratamento, observamos que tanto o grupo CTR como o ISO-Crônico, apresentaram uma redução significativa na expressão do *Clock* e *Bmal1* durante o ZT13, quando comparado ao ZT1 (Fig. 31a-b). Ao analisarmos a expressão de *Per1* nestes dois pontos, vimos um aumento significativo na expressão deste gene no ZT13 quando comparado ao ZT1 nos

corações CTR, e este perfil de aumento não foi visto no grupo ISO-Crônico (Fig. 31c).

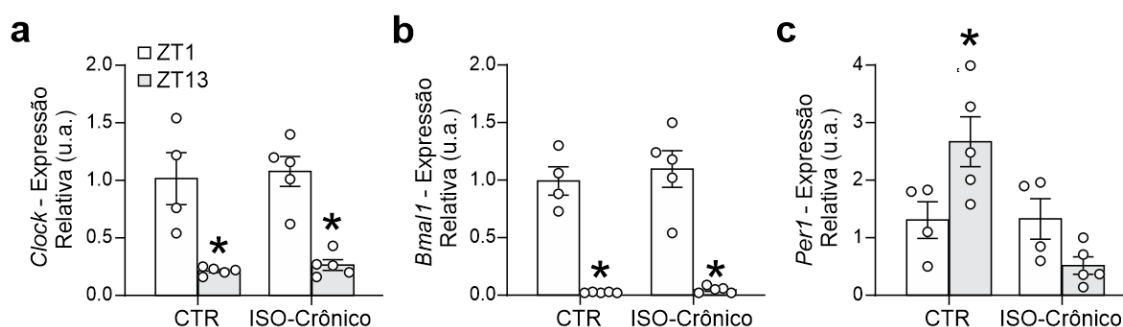


Figura 31: Tratamento crônico de camundongos com ISO previne aumento da expressão de *Per1* no ZT13. a-c) Gráficos de barras com a média da expressão do *Clock* (a), *Bmal1* (b) e *Per1* (c) nos ZT1 e ZT13 em corações de camundongos tratados com salina (CTR) ou com ISO (ISO-Crônico, 20 mg/kg, i.p.) durante 9 dias. Média \pm erro padrão. n=4-5 animais por grupo experimental. * $p < 0,05$ versus ZT1 do mesmo grupo experimental. Teste t-Student não pareado.

Baseado nos achados supracitados podemos afirmar que dentre todos os *clock genes* avaliados, *Per1* foi o mais responsivo a alterações na sinalização adrenérgica no coração (Fig. 32). Sendo assim, buscamos entender a nível intracelular como os receptores β -adrenérgicos regulam a transcrição de *Per1* no coração.

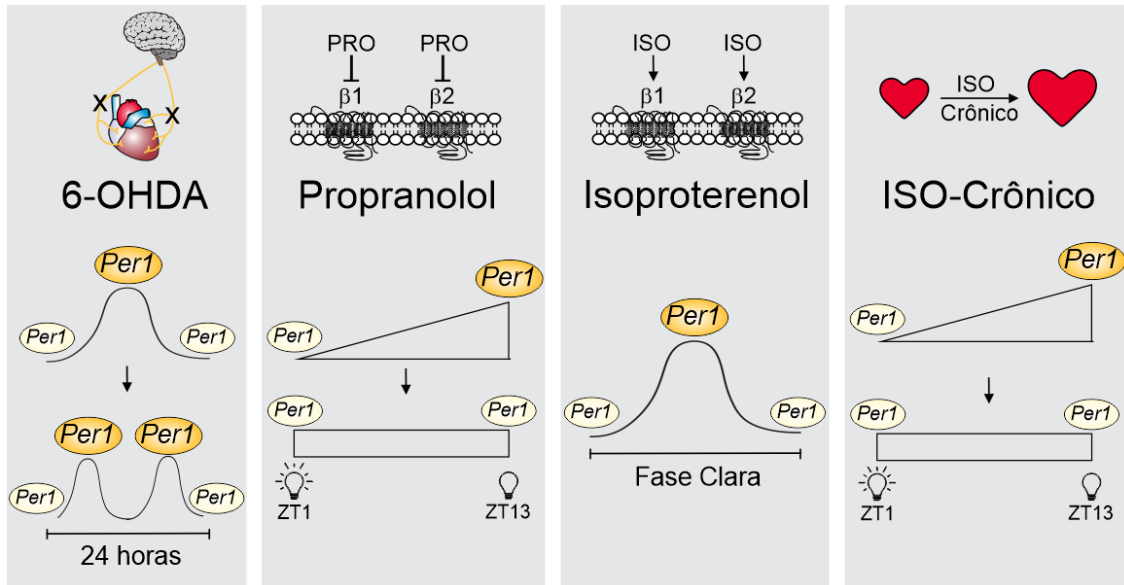


Figura 32: Esquema ilustrativo mostrando as alterações observadas na oscilação/expressão do *Per1* no coração de camundongo após o tratamento com 6-OHDA, propranolol, isoproterenol agudo e isoproterenol crônico.

7.3. O eixo β -AR-PI3K γ -ERK1/2 regula a transcrição de *Per1* no coração

As MAPKs são uma família de proteínas, da qual a ERK1/2 faz parte, que estão envolvidas em uma série de funções celulares, inclusive na regulação dos *clock genes* em diferentes tecidos (Goldsmith e Bell-Pedersen, 2013). Para investigar uma possível participação da ERK1/2 na transcrição do *Per1* cardíaco, primeiro avaliamos o nível de fosforilação desta proteína no tecido cardíaco de camundongos tratados com dose única de ISO (4 mg/kg, i.p.) e avaliados 1, 2 ou 4 horas pós-tratamento. Curiosamente, vimos um perfil de oscilação na fosforilação da ERK1/2 (Fig. 33a-b) semelhante ao observado na expressão de *Per1* após o tratamento agudo com ISO (ver Fig. 28c), sugerindo que a ERK1/2 poderia estar envolvida na regulação deste *clock gene* no coração. Para testar essa possibilidade, camundongos foram pré-tratados com o PD 98059 (10 mg/kg, i.p.), um inibidor da fosforilação da ERK1/2, 24 horas

antes de serem tratados com uma injeção de ISO (4 mg/kg, i.p., 1 hora). Como pode ser observado na figura 33c, o pré-tratamento com PD 98059 foi capaz de bloquear o efeito indutor do ISO na expressão de *Per1* no coração, confirmando desta forma a participação da ERK1/2 nos mecanismos que regulam a transcrição de *Per1*.

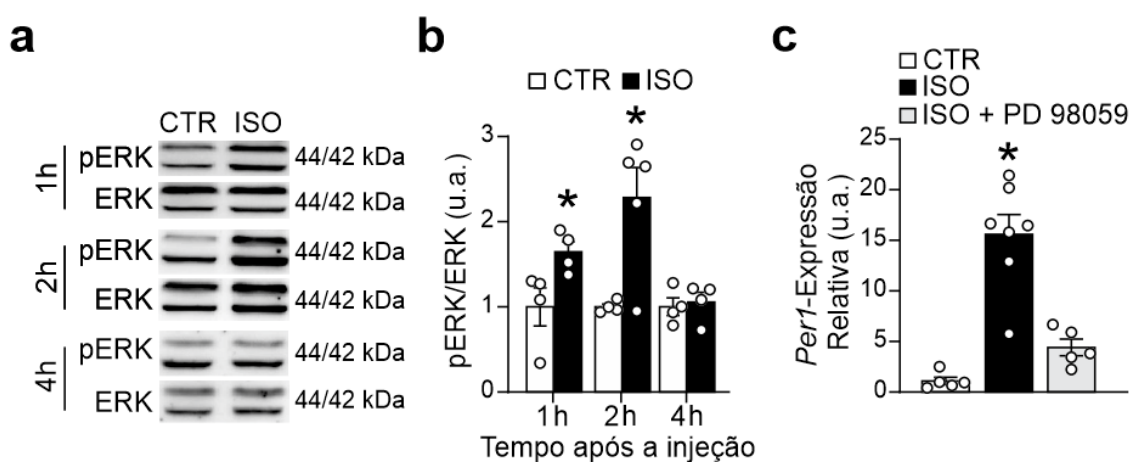


Figura 33: A ativação de ERK1/2 é importante para a *upregulation* de *Per1* no coração. a) Imagens representativas de western blotting para a pERK1/2 e ERK1/2. **b)** Gráfico de barras com a média dos valores de fosforilação da ERK1/2 em corações de camundongos tratados com salina (CTR) ou com ISO (4 mg/kg, i.p.). **c)** Gráfico de barras com a média da expressão do *Per1* em corações de camundongos tratados com salina (CTR), ISO (4 mg/kg, i.p., 1 hora) ou ISO + PD 98059 (10 mg/kg, i.p., 24 horas). Média \pm erro padrão. n=4-7 animais por grupo experimental. Em (b): *p<0,05 versus grupo CTR do mesmo tempo. Teste t-Student não pareado. Em (c): *p<0,05 versus os demais grupos experimentais. Teste One-Way Anova.

Recentemente foi descrito que os receptores acoplados a proteína G, recrutam a PI3K γ , e desta forma, ativam vias intracelulares, coordenadas pela ERK1/2, por exemplo (Fig. 34a). Utilizando um camundongo geneticamente modificado, que apresenta uma mutação no sítio catalítico da PI3K γ , tornando a enzima inativa, o camundongo PI3K $\gamma^{KD/KD}$, investigamos o papel desta proteína na ativação da ERK1/2 e expressão de *Per1* em resposta ao ISO (4 mg/kg, i.p.) (Fig. 34b). Interessantemente, camundongos PI3K $\gamma^{KD/KD}$ não

apresentaram aumento na fosforilação da ERK1/2, nem aumento na expressão cardíaca de *Per1* em resposta ao ISO (Fig. 34c-e).

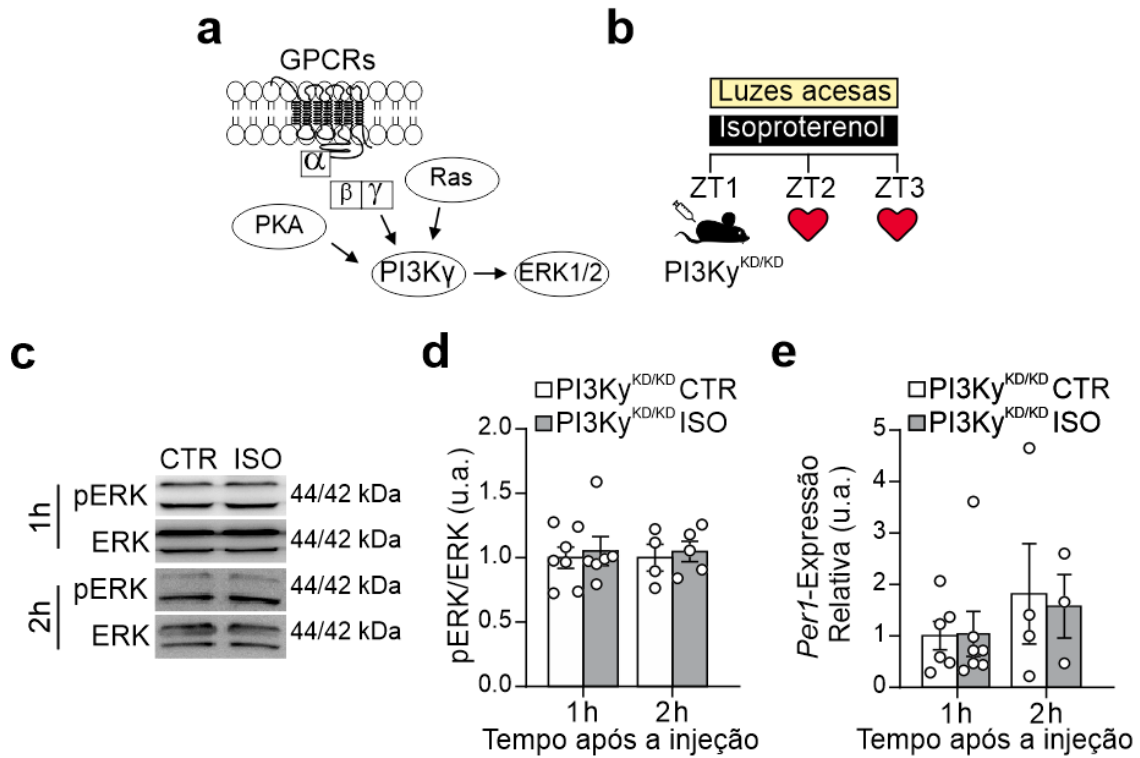


Figura 34: A regulação da expressão de *Per1* pelos receptores β -adrenérgicos depende da atividade quinase da PI3K γ . **a)** Esquema ilustrativo da cascata intracelular ativada pela subunidade β/γ da proteína G. **b)** Esquema ilustrativo do protocolo de tratamento utilizado. **c)** Imagens representativas de western blotting para a pERK1/2 e ERK1/2. **d)** Gráfico de barras com a média dos valores de fosforilação da ERK1/2 em corações de camundongos PI3K γ ^{KD/KD} tratados com salina (PI3K γ ^{KD/KD} CTR) ou com ISO (PI3K γ ^{KD/KD} ISO, 4 mg/kg, i.p.). **e)** Gráfico de barras com a média da expressão do *Per1* em corações de camundongos PI3K γ ^{KD/KD} tratados com salina (PI3K γ ^{KD/KD} CTR) ou com ISO (PI3K γ ^{KD/KD} ISO, 4 mg/kg, i.p.). Média \pm erro padrão. n=3-7 animais por grupo experimental. Teste t-Student não pareado.

Para excluir a possibilidade do ISO não estar desenvolvendo seus efeitos sobre a fosforilação da ERK1/2 e expressão de *Per1* no PI3K γ ^{KD/KD}, devido alguma alteração na expressão ou ativação dos receptores β -adrenérgicos, comparamos por *western blotting* a expressão dos receptores β 1 e β 2 adrenérgicos nos animais WT e PI3K γ ^{KD/KD}, e a fosforilação da GSK3 β nos animais PI3K γ ^{KD/KD} tratados com ISO. Escolhemos avaliar a fosforilação da

GSK3 β por ser um alvo conhecido do isoproterenol no coração (Zhang *et. al.*, 2011). Como é possível observar na figura 35a, não há diferença na expressão destes receptores entre os corações dos camundongos WT e PI3K γ ^{KD/KD}. Ainda sim, o camundongo PI3K γ ^{KD/KD} apresentou aumento na fosforilação da GSK3 β após 1 hora de tratamento com ISO (Fig. 35b), confirmando desta forma que os animais PI3K γ ^{KD/KD} são responsivos ao ISO.

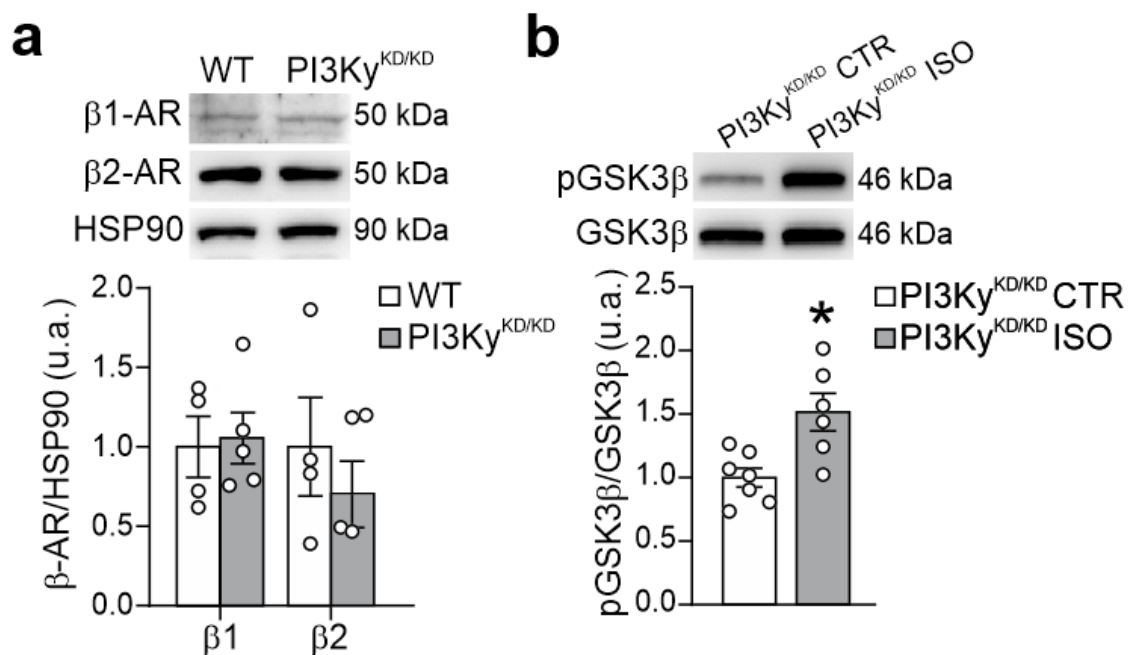


Figura 35: A expressão e a atividade de receptores β -adrenérgicos está preservada em camundongos PI3K γ ^{KD/KD}. a) Painel superior: Imagens representativas de *western blotting* para o β 1-AR, β 2-AR e HSP90. **Painel inferior:** Gráfico de barras com a média da expressão dos receptores β 1 e β 2-adrenérgicos em corações de camundongos WT e PI3K γ ^{KD/KD}. **b) Painel superior:** Imagens representativas de *western blotting* para a pGSK3 β e GSK3 β . **Painel inferior:** Gráfico de barras com a média dos valores de fosforilação da GSK3 β em corações de camundongos PI3K γ ^{KD/KD} tratados com salina (PI3K γ ^{KD/KD} CTR) ou com ISO (PI3K γ ^{KD/KD} ISO, 4 mg/kg, i.p.) por 1 hora. Média \pm erro padrão. Média \pm erro padrão. n=4-7 animais por grupo experimental. *p<0,05. Teste t-Student não pareado.

Em conjunto, os resultados apresentados nas figuras 33-35, mostraram que um mecanismo pós-traducional, a fosforilação, orquestrada pelo eixo PI3K γ -ERK1/2 representa uma etapa intracelular importante na transcrição de

Per1 promovida pela sinalização β -adrenérgica. A seguir, este trabalho propôs entender como este mecanismo de fosforilação desencadeado pelo eixo PI3K γ -ERK1/2 modula a transcrição de *Per1* no coração.

7.4. A transcrição de *Per1* no coração é dependente do recrutamento do complexo CREB/CRE pela sinalização β -adrenérgica

A região promotora do gene *PER1*, é rica em elementos CRE, que servem como sítios de ligação para o fator de transcrição CREB (Hida *et. al.*, 2000). Com o objetivo de avaliar se o complexo CREB/CRE é ativado em resposta ao ISO, células que expressam a luciferase sob o comando do promotor CRE (HEK-CREB/CRE Reporter Luc) foram tratadas com ISO. Foi possível observar um aumento concentração-dependente na atividade da luciferase nas células tratadas com ISO, indicando desta forma aumento na atividade do promotor CRE (Fig. 36a). Importante, o propranolol (1 μ mol/L) bloqueou totalmente este efeito.

Uma etapa fundamental para ativação do promotor CRE é a fosforilação do fator de transcrição CREB no sítio Ser133. Sendo assim, avaliamos na fração nuclear de cardiomiócitos ventriculares, o nível de fosforilação do CREB em resposta ao ISO (100 nmol/L, 5 minutos, Fig. 36b). No topo da figura 36c, encontram-se imagens representativas de *western blotting* para o pCREB, GAPDH (proteína citoplasmática utilizada como controle de pureza da fração nuclear), e a Histona H3 (proteína nuclear). É possível visualizar nestas imagens e no gráfico abaixo, que o ISO aumentou a fosforilação do CREB, presente no núcleo do cardiomiócito ventricular (Fig. 36c).

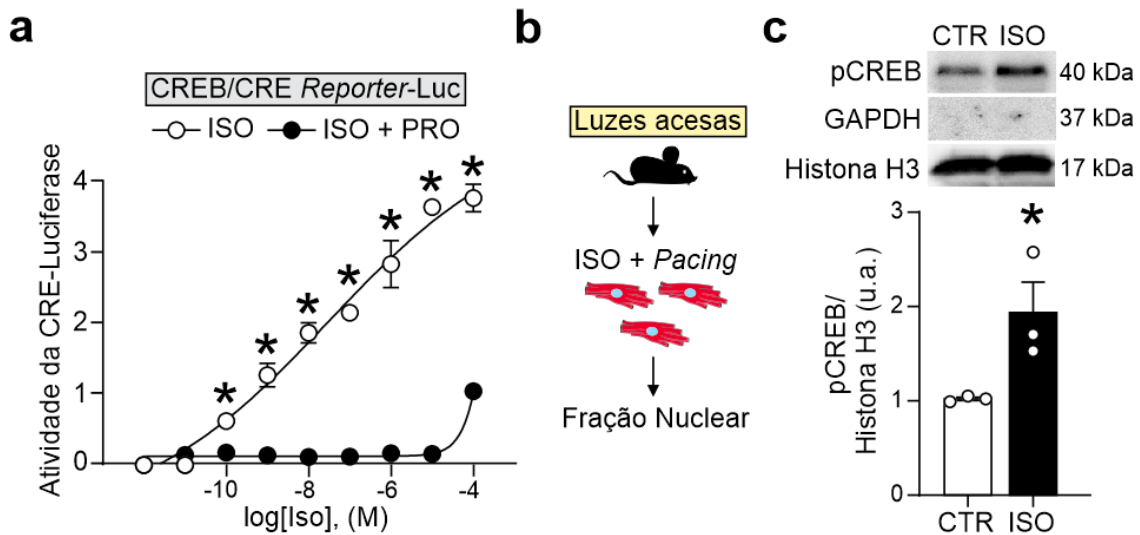


Figura 36: O complexo CREB/CRE é ativado pela sinalização β -adrenérgica. **a)** Curva concentração/resposta mostrando a média dos valores da atividade da luciferase em células HEK (CREB/CRE Reporter Luc) tratadas com ISO (○, 10 pmol/L-100 μ mol/L) durante 3 horas. No grupo ISO + PRO, as células foram pré-tratadas com propranolol (●, PRO, 1 μ mol/L) 45 minutos antes da adição do ISO no meio. **b)** Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado. **c) Painel superior:** Imagens representativas de western blotting para o pCREB, GAPDH e Histona H3. **Painel inferior:** Gráficos de barras com a média dos valores de fosforilação da pCREB na fração nuclear de cardiomiócitos ventriculares tratados ou não (CTR) com ISO (100 nmol/L, 5 minutos). Média \pm erro padrão. Em (a): valores representam a média de um experimento realizado em triplicata. * $p < 0,05$ versus grupo ISO + PRO. Em (c): $n = 3$ isolamentos de cardiomiócitos ventriculares. * $p < 0,05$ versus grupo CTR. Teste t-Student não pareado.

Na figura 37, mostramos que à sinalização β -adrenérgica promove a ativação do complexo CREB/CRE, através da ERK1/2, uma vez que o PD 98059 (10 μ mol/L) impediu o aumento na bioluminescência de células HEK-CREB/CRE Reporter Luc estimuladas com isoproterenol (10 μ mol/L).

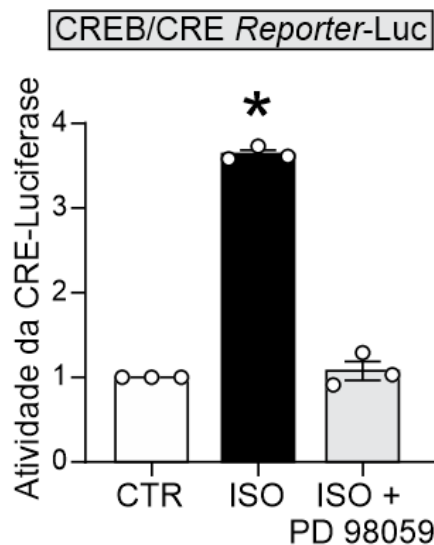


Figura 37: A ERK1/2 participa da ativação do complexo CREB/CRE promovido pela sinalização β -adrenérgica. Gráfico de barras com a média dos valores da atividade da luciferase em células HEK (CREB/CRE *Reporter Luc*) tratadas com ISO (10 μ mol/L) durante 3 horas. No grupo ISO + PD 98059, as células foram pré-tratadas com PD 98059 (10 μ mol/L), 45 minutos antes da adição do ISO no meio. n=experimento realizado em triplicata. * $p < 0,05$ versus os outros grupos. Teste One-Way Anova.

Para corroborar estes dados, camundongos que expressam a luciferase sob o comando do CRE foram tratados com ISO (4 mg/kg, i.p.) (Fig. 38a). Uma hora após a injeção, os corações foram coletados e analisados usando o sistema *IVIS Imaging System*. É possível observar nas imagens representativas localizadas no painel superior da Fig. 38b e no gráfico abaixo, o aumento na bioluminescência nos corações dos animais tratados com ISO, o que indica aumento na atividade do CRE. A participação do complexo CREB/CRE na transcrição de *Per1* pelo ISO foi confirmada utilizando o 666-15 (10 mg/kg, i.p.), um inibidor do CREB, o qual bloqueou parcialmente o aumento na expressão de *Per1* promovido pelo ISO (Fig. 38c).

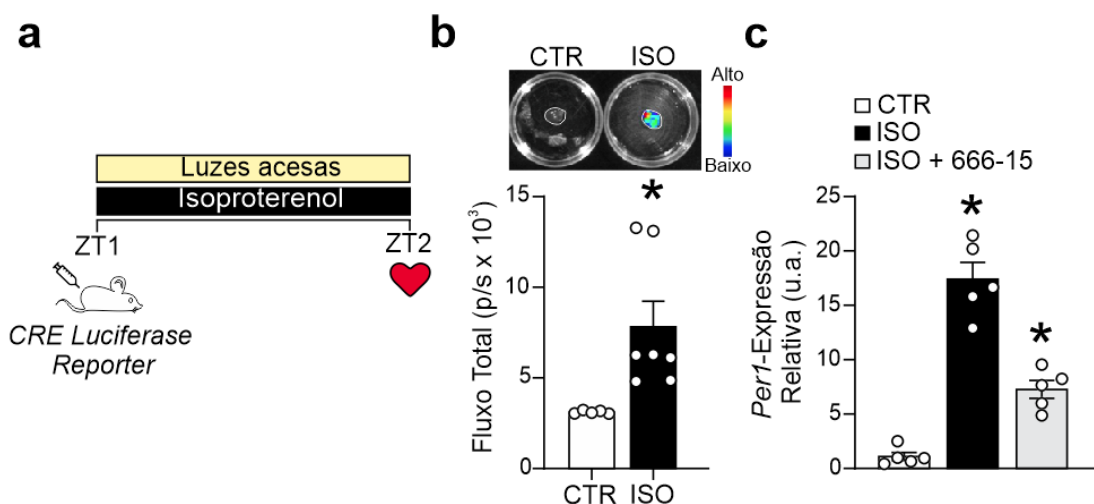


Figura 38: A sinalização β -adrenérgica ativa o promotor CRE e regula a expressão de *Per1* cardíaco. **a)** Esquema ilustrativo do protocolo de tratamento utilizado. **b) Painel superior:** Imagens representativas obtidas pelo *IVIS Imaging System* de corações de camundongos CRE Luciferase Reporter tratados com salina (CTR) ou com isoproterenol (ISO, 4 mg/kg, i.p.) por 1 hora. **Painel inferior:** Gráfico de barras com a média dos valores do fluxo total em corações de camundongos CRE Luciferase Reporter tratados com salina (CTR) ou com isoproterenol (ISO, 4 mg/kg, i.p.) por 1 hora. **c)** Gráfico de barras com a média da expressão do *Per1* em corações de camundongos tratados com salina (CTR), ISO (4 mg/kg, i.p., 1 hora) ou ISO + 666-15 (10 mg/kg, i.p., 24 horas). Média \pm erro padrão. $n=5-7$ animais por grupo experimental. Em **(b)**: $*p<0,05$ versus grupo CTR. Teste t-Student não pareado. Em **(c)**: $*p<0,05$ versus os outros grupos. Teste One-Way Anova.

Em conjunto, os resultados apresentados acima (Figs. 36-38) mostram que o complexo transcricional CREB/CRE é recrutado pela sinalização β -adrenérgica através da ERK1/2, e participa da transcrição de *Per1* no coração.

7.5. O receptor β 2-adrenérgico regula positivamente a transcrição de *Per1* no coração

O braço simpático do sistema nervoso autônomo comunica-se com o coração principalmente por meio dos receptores β 1 e β 2-adrenérgicos. Curiosamente, no início da fase escura (ZT13), no mesmo momento em que a expressão de *Per1* é maior no coração, também observamos aumento na

expressão do receptor β 2-adrenérgico no coração, enquanto o β 1 permaneceu sem alteração quando comparado ao ZT1 (Fig. 39a-b).

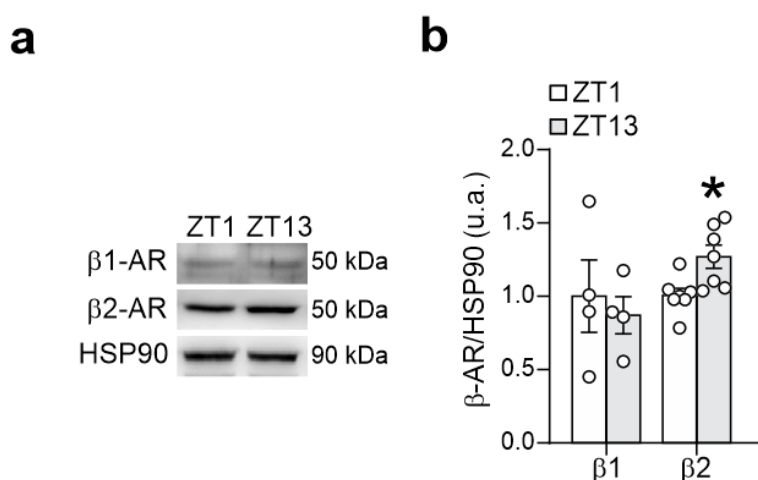


Figura 39: A expressão do receptor β 2-adrenérgico cardíaco é maior durante o ZT13. a) Imagens representativas de *western blotting* para o β 1-AR, β 2-AR e HSP90. **b)** Gráfico de barras com a média da expressão dos receptores β 1 e β 2-AR em corações de camundongos coletados no ZT1 ou ZT13. Média \pm erro padrão. n=4-7 animais por grupo experimental. *p<0,05 *versus* grupo ZT1 do mesmo alvo proteico. Teste t-Student não pareado.

Com este resultado em mente, questionamos se poderia haver um subtipo específico do receptor β -adrenérgico envolvido na transcrição de *Per1* no coração. No intuito de responder essa pergunta, traçamos duas estratégias experimentais distintas. Num primeiro momento, a expressão de *Per1* foi comparada entre os ZT1 e ZT13 em camundongos controle e tratados com o atenolol (ATE, 10 mg/kg, i.p.) na transição entre as fases clara e escura (Fig. 40a). O atenolol é um β -bloqueador que age com mais especificidade sobre o receptor β 1-adrenérgico. É possível observar na figura 40b, que a expressão de *Per1* aumentou de forma semelhante entre os grupos ZT13 e ZT13 + ATE, quando comparados ao ZT1, sugerindo que o β 1-adrenérgico não está envolvido na regulação de *Per1* no coração.

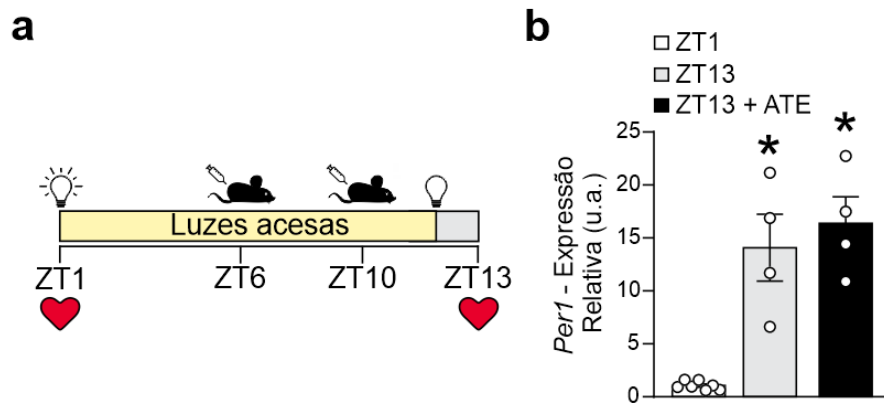


Figura 40: O bloqueio β 1-adrenérgico não impede o aumento na expressão do *Per1* no ZT13. a) Esquema ilustrativo com o protocolo de tratamento utilizado. **b)** Gráfico de barras com a média da expressão do *Per1* no ZT1, ZT13 e no ZT13 de camundongos tratados com atenolol (10 mg/kg, i.p.). Média \pm erro padrão. n=4-7 animais por grupo experimental. * p <0,05 versus grupo ZT1. Teste One-Way Anova.

Para corroborar este dado, camundongos foram tratados com agonistas seletivos para o receptor β 1-adrenérgico, dobutamina (DOB, 2 mg/kg, i.p, 1 hora) e para o receptor β 2-adrenérgico, formoterol (FOR, 2 mg/kg, i.p, 1 hora) (Fig. 41a-b). Como mostrado na figura 41c-e, apenas o formoterol aumentou a expressão de *Per1* e fosforilação da ERK1/2 no coração. Importante, o PD 98059 e o 666-15 bloquearam parcialmente a transcrição de *Per1* promovida pelo formoterol no coração (Fig. 41f). Em conjunto, estes dados indicam fortemente que os receptores β 2-adrenérgicos induzem aumento da transcrição de *Per1* no coração por meio de um mecanismo que envolve a ERK1/2-CREB/CRE.

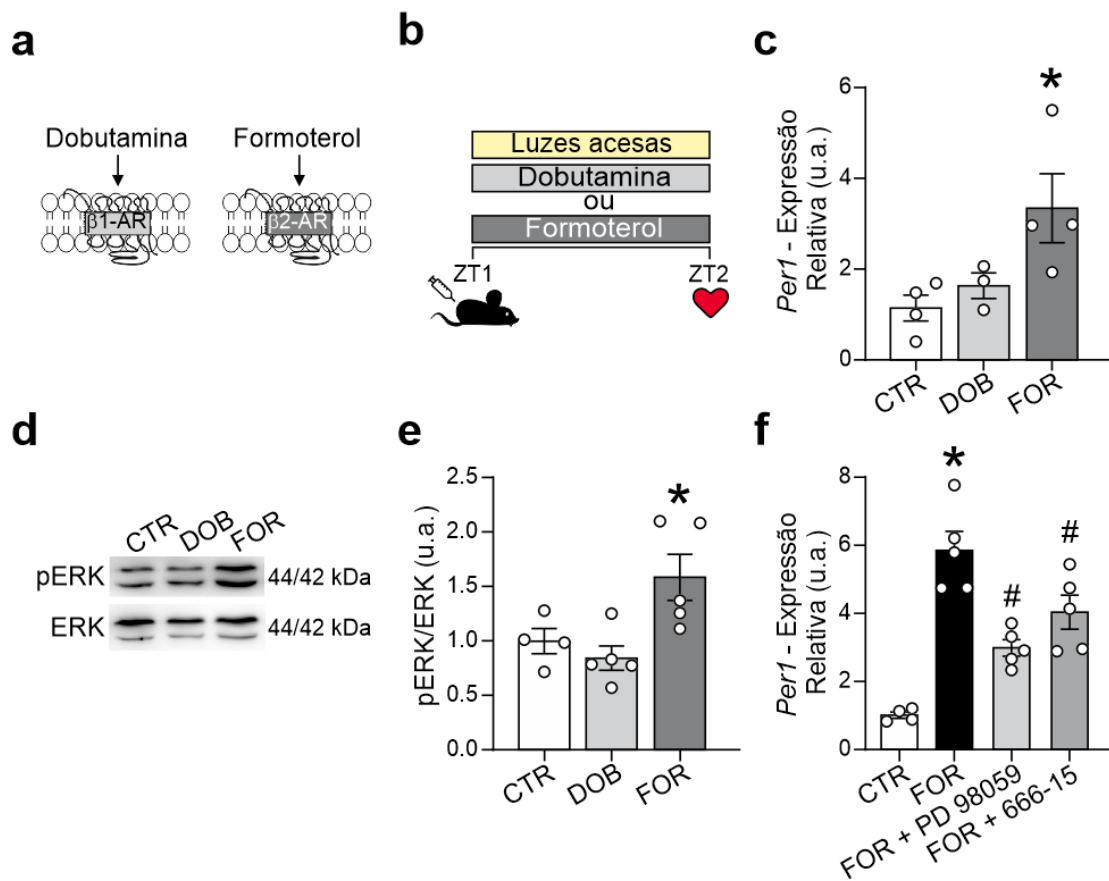


Figura 41: Os receptores β 2-adrenérgicos regulam positivamente a transcrição do *Per1* cardíaco através da via de sinalização ERK1/2-CREB/CRE. **a)** Esquema ilustrativo dos receptores alvos da dobutamina e formoterol. **b)** Esquema ilustrativo do protocolo de tratamento utilizado. **c)** Gráfico de barras com a média da expressão do *Per1* em corações de camundongos tratados com salina (CTR), DOB (2 mg/kg, i.p., 1 hora) ou FOR (2 mg/kg, i.p., 1 hora). **d)** Imagens representativas de western blotting para a pERK e ERK. **e)** Gráfico de barras com a média dos valores de fosforilação da ERK1/2 em corações de camundongos tratados com salina (CTR), DOB (2 mg/kg, i.p.) ou FOR (2 mg/kg, i.p.) por 1 hora. **f)** Gráfico de barras com a média da expressão do *Per1* em corações de camundongos tratados com salina (CTR), FOR (2 mg/kg, i.p., 1 hora), FOR + PD 98059 (10 mg/kg, i.p., 24 horas) ou FOR + 666-15 (10 mg/kg, i.p., 24 horas). Média \pm erro padrão. $n=4-5$ animais por grupo experimental. * $p<0,05$ versus os outros grupos. # $p<0,05$ versus CTR. Teste One-Way Anova.

8. Discussão

Os principais achados deste trabalho foram: *i)* a desnervação simpática no coração altera a oscilação dos *clock genes*; *ii)* o gene *Per1* é sensível a ativação/inibição dos receptores β -adrenérgicos; *iii)* a transcrição de *Per1* é regulada por um fosfo-mecanismo que envolve o eixo PI3K γ -ERK1/2 e *iv)* o receptor β 2-adrenérgico está envolvido na regulação positiva da transcrição do *Per1* cardíaco. Estes dados demonstram a importância da sinalização adrenérgica como um ponto de controle dos *clock genes* no coração. Levando em consideração o fato de que alterações na atividade simpática contribuem para o desenvolvimento da disfunção cardíaca, o conhecimento acerca do papel dos receptores β 2-AR na regulação de *Per1* no tecido cardíaco irá contribuir para o entendimento dos mecanismos ativados durante a insuficiência cardíaca e possibilitar o desenvolvimento de novas formas de terapêutica.

8.1. A inervação simpática e o relógio biológico cardíaco

O coração é uma região rica em inervação simpática. A comunicação entre estas fibras e as células cardíacas, em especial o cardiomiócito, permite um ajuste fino da função cardíaca. Para investigarmos o impacto da desnervação simpática sobre a oscilação do *clock genes* no coração, camundongos foram tratados com 6-OHDA. A 6-OHDA é um análogo da noradrenalina, e já se é sabido que sua administração induz a simpatectomia química em diferentes mamíferos, como roedores, cachorro e macacos (Joers *et al.*, 2014). Em linhas gerais, os mecanismos de ação deste composto, envolvem: (*i)* auto-oxidação, que pode ocorrer nos espaços extra e/ou

intracelular; (ii) formação de radicais livres, como o peróxido de hidrogênio e ânion superóxido e (iii) inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Em conjunto, estes três fatores conduzem os neurônios catecolaminérgicos para apoptose celular (Hernandez-Baltazar *et al.*, 2017).

Neste trabalho, confirmamos que a 6-OHDA induz a destruição da inervação simpática no ventrículo esquerdo de camundongos, ao observarmos por imunofluorescência a redução dos níveis de TH, proteína que é um marcador da presença de neurônios catecolaminérgicos. Este resultado foi confirmado por *western blotting*, no qual verificamos uma redução de 80% na expressão da TH em homogenatos de corações 6-OHDA. Apesar de não termos quantificado o conteúdo de noradrenalina cardíaca após o tratamento com a 6-OHDA, nossos resultados correlacionam-se com a redução de 80%, em média, no conteúdo de noradrenalina no coração de ratos tratados com 6-OHDA, como demonstrado por Wehrwein *et al.*, 2008. Além disto, o tratamento com 6-OHDA foi seletivo em destruir a inervação simpática, uma vez que não observamos alteração na expressão de dois marcadores colinérgicos, a ChAT e o VACht, nos mesmos homogenatos cardíacos.

Alterações na atividade e inervação simpática cardíaca são observadas em uma variedade de doenças cardiovasculares, como a hipertensão (Mancia and Grassi, 2014), infarto do miocárdio (Jardine *et al.*, 2005) e insuficiência cardíaca (Kimura *et al.*, 2010). Curiosamente, na disautonomia, ou seja, quando há um desbalanço entre a atividade dos sistemas nervosos simpático e parassimpático, são observadas perturbações na oscilação dos *clock genes* no coração (Mohri *et al.*, 2003; Durgan *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2001). No entanto, devido à complexidade de fatores que estas doenças envolvem, além

da própria disautonomia, ainda não se sabe se existe uma relação entre estes dois fenômenos (disautonomia x funcionamento incorreto do relógio biológico cardíaco). Neste sentido, ao avaliarmos a oscilação dos *clock genes* em 4 horários (ZT0, ZT6, ZT12 e ZT18) em coração de animais controle e tratados com 6-OHDA, observamos que a ausência da inervação simpática, conduziu o relógio biológico cardíaco a uma série de alterações, caracterizadas pela diminuição na amplitude de oscilação do *Clock* e *Bmal1*, e alteração de circadiano para ultradiano relativo a oscilação do *Per1*. Desta forma, é intuitivo pressupor que, pelo menos em parte, as alterações no funcionamento do relógio biológico cardíaco observadas em diferentes doenças cardíacas possam decorrer de um desbalanço da atividade simpática.

Curiosamente, Reilly *et al.*, 2007 demonstraram que a redução sistêmica de noradrenalina, observada no camundongo nocaute para enzima dopamina β -hidroxilase (*Dbh*^{-/-}), não promove alteração na oscilação dos *clock genes* no coração. Apesar da relevância destes achados, os resultados obtidos em um animal geneticamente modificado precisam ser analisados com cautela, principalmente no que diz respeito aos mecanismos compensatórios que podem ser ativados frente às alterações gênicas realizadas. Neste sentido, a deleção da dopamina β -hidroxilase leva ao acúmulo de dopamina, como observado pelos autores. Este aumento da sinalização dopaminérgica pode, por sua vez, compensar a falta crônica de noradrenalina e adrenalina em vários níveis, inclusive na oscilação dos *clock genes*. De fato, a dopamina tem sido descrita como um agente modulador do relógio biológico (Yujnovsky *et al.*, 2006; Korshunov *et al.*, 2017).

Nossos resultados sugerem que as alterações observadas na oscilação e expressão dos *clock genes* cardíacos causadas pela desnervação simpática, ocorreram em condições nas quais o sistema temporal circadiano parece estar preservado, uma vez que o ritmo diário da atividade locomotora espontânea e temperatura corporal premassem-se inalterado. Ao avaliarmos esses parâmetros não encontramos alterações no *onset* e *acrophase* da atividade locomotora espontânea e temperatura corporal no quinto dia após o início do tratamento com 6-OHDA. Anteriormente, já foi descrito que a 6-OHDA é um molécula que não atravessa a barreira hematoencefálica (Kostrzewa e Jacobowitz, 1974; Laverty *et al.*, 1965). Uma vez que no presente trabalho a administração desta molécula ocorreu via injeção intraperitoneal, a preservação dos ritmos circadianos decorrentes do funcionamento do relógio biológico central pode ser explicada pelo fato de que a 6-OHDA não chegou a agir sobre o núcleo supraquiasmático. Corroborando está hipótese, não verificamos diferença na expressão da TH no cérebro de camundongos 6-OHDA em relação ao controle. Sendo assim, estes dados são de suma importância, uma vez que eles sugerem que a inervação simpática contribui localmente para regulação dos *clock genes* presentes no coração.

Algumas considerações, no entanto, precisam ser pontuadas com relação aos dados obtidos no animal tratado com a 6-OHDA, dentre elas, destacam-se: (i) a desnervação simpática causada pela 6-OHDA não se restringe ao coração, ocorrendo também em outros tecidos (Terazono *et al.*, 2003 e Grebe *et al.*, 2010) podendo, desta forma, gerar “ruídos” que dificultam à interpretação dos resultados; e (ii) neste trabalho a oscilação dos *clock genes* foi analisada cinco dias após o início do tratamento, neste momento a perda

crônica da inervação simpática pode conduzir a um remodelamento em toda maquinaria molecular dos *clock genes*, dificultando, desta forma, a interpretação correta dos resultados advindos deste contexto sobre qual/quais *clock genes* são regulados diretamente pela sinalização adrenérgica no coração. Tendo em vista, o ponto (ii) acima, optamos por realizar um segundo modelo de redução da atividade simpática, no qual avaliamos o efeito do tratamento agudo com propranolol na expressão dos *clock genes* cardíacos.

8.2. O *Per1* como alvo da sinalização β -adrenérgica no coração

A atividade simpática flutua ao longo do dia e isto acarreta em uma série de ajustes fisiológicos no sistema cardiovascular (Thosar *et al.*, 2018). Ao avaliarmos a contratilidade celular de cardiomiócitos ventriculares isolados em dois pontos (ZT1-fase clara) e (ZT13-fase escura), encontramos que durante a fase escura, os miócitos cardíacos contraem com maior intensidade e velocidade. Estes resultados confirmam e expandem a nível celular, os achados de Podobed *et al.*, 2014, que observaram aumento na pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo de camundongos no ZT15. Já é sabido, que o aumento da atividade simpática regula positivamente a função contrátil do coração. Isto ocorre por meio de uma cascata de eventos intracelulares desencadeados pelos receptores β -adrenérgicos, que culminam com a fosforilação da fosfolambam, aumento do influxo de cálcio via canal de cálcio do tipo L, e aumento do transiente de cálcio intracelular, por exemplo. Em conjunto, estes eventos contribuem para o melhor desempenho contrátil do miócito cardíaco (Bers, 2002). Neste contexto, Sachan *et al.*, 2011, demonstraram que durante a fase escura, é observado aumento na fosforilação da fosfolambam no coração de camundongos, em seus dois principais sítios

regulatórios, a Ser16 e Thr17. Logo, sabendo que atividade simpática em roedores é maior durante a fase escura (Hashimoto *et al.*, 1999), sugerimos que o aumento da contratilidade do cardiomiócito ventricular durante o ZT13, pode ter ocorrido devido a uma série de ajustes intracelulares, induzidos pelo aumento da atividade simpática e que culminaram no aumento do desempenho contrátil.

Neste contexto, se fez necessário entender qual a contribuição da flutuação na atividade simpática para oscilação dos *clock genes* no coração. Sendo assim, ao tratarmos camundongos com propranolol nos ZT6 e ZT10, não observamos aumento da frequência cardíaca entre as fases clara e escura, o que confirma a participação da atividade simpática no ajuste circadiano da função cardíaca. Neste cenário, o bloqueio β -adrenérgico causado pelo propranolol, preveniu completamente o aumento na expressão do *Per1* cardíaco no ZT13, quando comparado ao ZT1, sem causar alterações nos demais *clock genes* avaliados. Vale ressaltar que apesar de não serem observadas alterações causadas pelo propranolol nos demais genes, a análise realizada em apenas dois pontos neste experimento (ZT1 x ZT13), não descarta o fato de que alterações em outros *clock genes* podem ocorrer em outros ZTs. No entanto, independentemente deste fato, estes dados são claros em mostrar como o aumento da sinalização β -adrenérgica na fase escura representa uma importante pista para a transcrição de *Per1* no coração.

Curiosamente, Ushijima *et al.*, 2013, demonstraram que o tratamento com propranolol durante 4 semanas em ratos Wistar, reduziu a expressão cardíaca do *Bmal1* e de dois genes controlados pelos *clock genes*, o *Ldha* e *Pdk4*, sem causar modificações na expressão do *Per1*, *Per2* e *Rev-Erba*. Uma

explicação plausível para as diferenças observadas entre o nosso trabalho e o de Ushijima e colaboradores, pode estar no tempo de tratamento com propranolol utilizado nos dois estudos. Especulamos que o tratamento crônico com propranolol possa estar associado a uma série de adaptações estruturais, funcionais e moleculares que podem repercutir na expressão e oscilação dos *clock genes* cardíacos. Além disto, alguns trabalhos têm demonstrado que os *clock genes* regulados pela sinalização β -adrenérgica, podem variar entre a linhagem celular em estudo, a espécie do animal e o tipo de experimento que está sendo realizado (*in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*), dentre outros fatores (Komoto *et al.*, 2012; Takata *et al.*, 2005; Wongchitrat *et al.*, 2011).

Outro resultado importante obtido no nosso trabalho foi o fato de que uma dose única de isoproterenol, administrada no ZT1, foi suficiente para promover aumento na expressão de *Per1* após uma hora do tratamento seguido de uma diminuição gradual, atingindo os valores mais baixos 4 horas após o tratamento. Importante, confirmamos *in vitro* que o *Per1* é regulado diretamente pela sinalização β -adrenérgica, uma vez que nestes experimentos, a única pista potencial para alterar a transcrição de *Per1*, foi o isoproterenol adicionado ao meio.

De forma interessante, as alterações na expressão de *Per1* observadas após a injeção de isoproterenol, ocorreram sem nenhuma alteração pronunciada no *Cry1*. Estes resultados são curiosos, uma vez que tanto o *Per1* como *Cry1*, são modulados pelo complexo CLOCK/BMAL1. Logo, o efeito do isoproterenol somente na transcrição de *Per1*, sugere que a sinalização β -adrenérgica modula a transcrição deste *clock gene* de forma independente do complexo CLOCK/BMAL1. Neste sentido, os resultados obtidos em animais

tratados com 6-OHDA (figura 22d-e) corroboram esta ideia, uma vez que estes resultados mostram que a desnervação simpática alterou a oscilação de *Per1* em um contexto no qual a oscilação do *Cry1* não foi modificada após o tratamento com 6-OHDA. Neste contexto, Travnickova-Benova *et al.*, 2002, descreveram que a transcrição de *Per1* está sob a regulação de dois principais mecanismos: (i) o heterodímero CLOCK/BMAL1 (*Clock regulation*) ou (ii) através de outros fatores de transcrição, de forma independente do complexo CLOCK/BMAL1, como por exemplo, o CREB.

No entanto, outros experimentos são necessários para confirmar a hipótese de que a sinalização β -adrenérgica pode regular a transcrição de *Per1* no coração de forma independente do complexo CLOCK/BMAL1. Discussão mais detalhada relativa a este ponto será apresentada no item 8.4 da tese.

8.3. Um fosfo-mecanismo regula a transcrição de *Per1* no coração

A partir dos experimentos realizados neste trabalho, observamos um aumento transitório na fosforilação da ERK1/2 nos corações dos animais tratados com isoproterenol. De forma interessante, o padrão temporal de alteração na fosforilação da ERK1/2 foi semelhante ao perfil oscilatório de *Per1*. A participação da ERK1/2 na regulação da transcrição cardíaca de *Per1* foi confirmada por meio do inibidor da ERK1/2, PD 98059, que bloqueou o efeito do isoproterenol sobre a regulação deste *clock gene*. Resultado semelhante foi descrito por Terazono *et al.*, 2003, que mostrou em experimentos *ex vivo* a participação da ERK1/2 na transcrição de *Per1* induzida pelo agonista α -adrenérgico fenilefrina no fígado.

A ERK1/2 faz parte da família das MAPKs (proteínas quinase ativadas por mitógeno) envolvidas em uma série de funções biológicas, incluindo a

regulação dos *clock genes* (Akashi *et al.*, 2008; Travnickova-Bendova *et al.*, 2002; Terazono *et al.*, 2003). Neste contexto, já foi demonstrado que a ERK1/2 é uma importante peça na regulação dos relógios biológicos, podendo fosforilar proteínas envolvidas na regulação transcricional dos *clock genes*, como o fator de transcrição CREB, ou fosforilar diretamente componentes do relógio biológico, como o CLOCK, BMAL1 e CRY1/2 (Goldsmith e Bell-Pedersen, 2013), contribuindo desta forma para o funcionamento dos *feedbacks* positivo e negativo da maquinaria dos *clock genes*. Sendo assim, os resultados deste trabalho corroboram e expandem o conhecimento sobre o importante papel ERK1/2 na regulação dos *clock genes* periféricos, incluindo o relógio biológico cardíaco.

Na análise realizada em animais tratados durante nove dias com isoproterenol, observamos hipertrofia cardíaca e alteração na expressão dos *clock genes* entre os ZT1 e ZT13. O tratamento crônico com isoproterenol é um modelo clássico de indução de hipertrofia cardíaca. Dentre as cascatas de sinalização envolvidas neste processo, estão: a via calcineurina/NFAT, PI3K/AKT, MEF2/HDAC, entre outras (Frey *et al.*, 2004). A hipertrofia é uma resposta adaptativa do coração ao estresse hemodinâmico, que inicialmente mantém a função podendo, por sua vez, evoluir para um estado de insuficiência cardíaca. É caracterizada pelo crescimento do miócito cardíaco, reexpressão de genes fetais e pode estar associada a alterações na matriz extracelular cardíaca (Nakamura e Sadoshima, 2018). Neste trabalho, confirmamos o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca por três experimentos complementares, a saber: (i) aumento da razão do peso do coração normalizado pelo tamanho da tíbia esquerda; (ii) aumento da área celular dos

cardiomiócitos e (iii) reexpressão da MYH7 no coração dos animais tratados com isoprotetenol.

De forma interessante, observamos que o aumento de *Per1*, esperado para acontecer no ZT13, não ocorreu nos corações de animais tratados cronicamente com isoproterenol. A hipertrofia cardíaca é caracterizada por uma série de alterações na sinalização β -adrenérgica. Neste contexto, já foi descrita a redução de expressão e dessensibilização dos receptores β -adrenérgicos (Saraiva *et al.* 2003; Ozakca *et al.*, 2013), além do remodelamento de importantes vias intracelulares, como a da AMPc/PKA (Saad *et al.*, 2018). Logo, sugerimos que todas estas alterações podem contribuir para a perda da oscilação de *Per1* entre os ZT1 e ZT13. Desta forma, os dados obtidos em um modelo clássico de hipertrofia cardíaca causada por hiperestimulação adrenérgica fortalecem os achados anteriores deste trabalho ao mostrar que a transcrição de *Per1* é sensível a perturbações na sinalização β -adrenérgica. Vale ressaltar que a análise da expressão de *Per1* em outros horários seria necessária para melhor caracterizar o perfil de oscilação deste *clock gene* na hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol e para caracterizar possíveis efeitos deste tratamento sobre outros *clock genes*.

Nossos resultados mostraram ainda, que o aumento de fosforilação da ERK1/2 promovido pelo isoproterenol ocorreu via PI3K γ . Em linha com os nossos resultados, Patrucco *et al.*, 2004; observaram no modelo de hipertrofia cardíaca induzida pela coarctação da aorta (TAC), aumento na fosforilação da ERK1/2 no coração de camundongos selvagens, e este aumento não foi observado em camundongos nocautes para PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$) ou nos camundongos que apresentaram a função quinase da PI3K γ inativa

(PI3K $\gamma^{KD/KD}$). PI3Ks (fosfatidilinositol 3-quinases) são uma família de enzimas responsáveis por fosforilar e ativar alvos envolvidos na sinalização e tráfego vesicular (Bilanges *et al.*, 2019). Esta família é dividida em 3 classes, sendo a classe I (composta pela PI3K α , $-\beta$, $-\delta$ e $-\gamma$) responsável por ativar vias de transdução de sinal (Bilanges *et al.*, 2019). No coração, a PI3K γ está envolvida na regulação da produção de AMPc via fosfodiesterase 3 e consequentemente na contratilidade cardíaca. Anteriormente, já foi descrito que a isoforma PI3K γ pode ser ativada ao formar heterodímeros com as subunidades $\beta\gamma$ da proteína G, via PKA ou pela família de pequenas GTPases (Ras) (Vadas *et al.*, 2013). Com os dados obtidos neste trabalho, não é possível definir por qual destes mecanismos os receptores β -adrenérgicos estaria ativando a PI3K γ , ou se até mesmo acontece uma sobreposição entre estes fenômenos, uma vez que eles são reconhecidamente *downstreams* dos receptores β -adrenérgicos.

Confirmamos a participação da PI3K γ , como um sinal *upstream* na regulação da transcrição de *Per1*, ao observar que o isoproterenol não alterou a expressão deste *clock gene* no coração de camundongos PI3K $\gamma^{KD/KD}$. Importante, excluímos a possibilidade deste camundongo não ser responsivo ao isoproterenol, ao mostrar níveis semelhantes da expressão cardíaca dos receptores $\beta 1$ e $\beta 2$ -adrenérgicos entre os WT e PI3K $\gamma^{KD/KD}$ e , mais importante ainda, confirmamos a funcionalidade deste receptor por meio do aumento da fosforilação da GSK3 β nos corações PI3K $\gamma^{KD/KD}$ tratados com isoproterenol. Vários trabalhos têm citado a família das PI3K como ponto chave na regulação dos *clock genes*. Morishita *et al.*, 2016, mostraram que a amplitude de oscilação do *Dbp*, gene controlado pelos *clock genes*, foi reduzida pelo inibidor da PI3K, o LY294002, em cultura de fibroblastos de camundongo (NIH 3T3)

sincronizada com “choque” de soro. Parte deste efeito pode ser explicado pela diminuição da heterodimerização entre as proteínas CLOCK e BMAL1 causada pelo LY294002. Neste sentido, Yamajuku *et al.*, 2012, mostraram que este mesmo inibidor bloqueou o efeito da insulina sobre a transcrição de *Per2* em células de câncer de fígado de rato (H4IIE). Em conjunto, estes resultados confirmam e expandem o conhecimento acerca do importante papel da família das PI3K, em especial a PI3K γ , na regulação do relógio biológico, que no coração ocorre através da transcrição de *Per1*.

8.4. A ERK1/2 participa do recrutamento do complexo CREB/CRE e contribui para transcrição de *Per1* no coração

Para investigar a participação do complexo CREB/CRE na regulação do *Per1* cardíaco frente ao tratamento com isoproterenol, utilizamos um conjunto de experimentos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Primeiramente, realizamos um *screening* em células HEK CREB/CRE-Luc e observamos que o isoproterenol aumentou de forma concentração-dependente a atividade do promotor CRE. Este dado foi corroborado por duas outras formas: (i) ao verificarmos aumento de fosforilação do CREB na fração nuclear de cardiomiócitos ventriculares tratados com isoproterenol e (ii) ao medirmos o aumento da bioluminescência em corações de camundongos CRE-Luc que receberam injeção de isoproterenol e tiveram o coração removido 1 hora depois. A CREB é uma proteína que está predominantemente distribuída no compartimento nuclear das células e quando fosforilada no sítio Ser133 por diferentes quinases, como a PKA, CaMK, ERK1/2, dentre outras, é recrutada em conjunto com a CBP (proteína de ligação do CREB), e ligam-se a regiões CRE do DNA, regulando desta forma a transcrição de diferentes genes (Ichiki, 2006; Cardinaux *et al.*,

2000). Nossos dados mostraram que a ativação do complexo CREB/CRE ocorreu via ERK1/2, uma vez que o PD 98059 impediu completamente o efeito do isoproterenol nas células HEK CREB/CRE-Luc.

De forma interessante, ao utilizarmos o 666-15 para inibir a CREB, observamos que o efeito do isoproterenol sob a transcrição de *Per1* foi parcialmente bloqueado, indicando desta forma que além do complexo CREB/CRE outros fatores estão envolvidos na transcrição de *Per1* promovida pela sinalização β -adrenérgica no coração. Anteriormente, já foi descrito que o gene *Per1*, tanto em humanos como em camundongos, apresentam cinco regiões E-boxes que servem como sítios de ligação para o heterodímero CLOCK/BMAL1 e quatro regiões CRE nas quais o fator de transcrição CREB se liga e regula a transcrição de *Per1* (Hida *et al.*, 2000). Neste contexto, como mostrado acima, o estímulo luminoso é capaz de aumentar a fosforilação da CREB e conseqüentemente ativar o promotor CRE, contribuindo desta forma para transcrição de *Per1* (Obrietan *et al.*, 1999; Tischkau *et al.*, 2003). Além destes dois mecanismos (CLOCK/BMAL1 e CREB/CRE), a transcrição de *Per1* também pode ser regulada via DBP. A proteína DBP (proteína de ligação ao sítio D do gene da albumina) é um membro da família dos fatores de transcrição de zíper de leucina. Além de ser um *downstream* dos *clock genes*, que está sob o comando do complexo CLOCK/BMAL1, o DBP pode regular positivamente a transcrição de *Per1* ao ligar-se nos sítios DBP presentes no promotor do gene *Per1* (Yamaguchi *et al.*, 2000). Desta forma, experimentos adicionais serão necessários para avaliar a contribuição do DBP na indução do *Per1* por receptores β -adrenérgicos no coração.

8.5. Os receptores β 2-adrenérgicos são os responsáveis pela transcrição de *Per1* no coração

Para investigar o subtipo dos receptores β -adrenérgicos envolvidos na transcrição de *Per1* no coração, uma série de experimentos complementares e mecanísticos foram realizados. Curiosamente, o tratamento com um antagonista seletivo dos receptores β 1-adrenérgico, atenolol, realizado na transição entre as fases clara e escura, não teve efeito sobre o aumento de *Per1* no coração durante o ZT13, sugerindo desta forma que os receptores β 1-adrenérgicos não estão envolvidos na transcrição de *Per1* no tecido cardíaco. Reforçando este resultado, observamos que o tratamento com dobutamina (agonista β 1-adrenérgico) não alterou a expressão de *Per1* no coração. Entretanto, o formoterol (agonista β 2-adrenérgico) aumentou a transcrição deste *clock gene* em torno de 4X quando comparado ao controle. Neste sentido, a participação dos receptores β 2-adrenérgicos na transcrição de *Per1* já foi mostrada em outros tipos celulares, por exemplo em células de glioma (células C6) (Morioka *et al.*, 2010) e em células humanas do epitélio brônquico (Takata *et al.*, 2006).

Levando em consideração a grande diferença que existe na expressão dos receptores β 1 e β 2-adrenérgicos (75/80% *versus* 15/18%, respectivamente) num coração saudável, os resultados obtidos neste trabalho tornam-se intrigantes. Curiosamente, nossos dados mostraram que no ZT13 (fase escura) há aumento na expressão proteica do receptor β 2-adrenérgico no coração (~20%), quando comparado ao ZT1 (fase clara). Neste contexto, a oscilação circadiana na expressão dos RNA mensageiros para os receptores adrenérgicos (α -AR e β -AR) já foi reportada em outros tecidos como na glândula

submandibular de camundongos (Tahara *et al.*, 2017). Tomados em conjunto, estes resultados indicam que dentre os vários ajustes fisiológicos e moleculares que acontecem no coração ao longo de 24 horas, o aumento na expressão proteica do receptor β 2-adrenérgico durante a fase escura, é um importante fenômeno, pois o mesmo está envolvido na transcrição do *Per1* cardíaco.

Curiosamente, em uma situação patológica, por exemplo, durante a insuficiência cardíaca, a relação na expressão entre os receptores β 1 e β 2-adrenérgicos passa a ser semelhante (50% β 1-AR e 50% β 2-AR) (Brum *et al.*, 2006). Logo, é plausível considerar que parte das alterações observadas na maquinaria molecular do relógio biológico cardíaco durante o desenvolvimento da doença, possa ocorrer devido às alterações na expressão destes receptores. No entanto, devido à complexidade de fatores que estão envolvidos nas doenças cardíacas, outros trabalhos são necessários para elucidar o papel do receptor β 2-adrenérgico no funcionamento do relógio biológico cardíaco durante a insuficiência cardíaca, por exemplo.

Por fim, validamos a participação do eixo ERK1/2-CREB/CRE na transcrição de *Per1* promovida pelos receptores β 2-AR, ao observar que tanto o PD 98059 como o 666-15, bloquearam parcialmente o efeito do formoterol. Apesar de não termos avaliado o efeito do formoterol no animal $PI3K\gamma^{KD/KD}$, alguns dados apresentados ao longo deste trabalho, indicam a participação da $PI3K\gamma$ na cascata intracelular iniciada pelos receptores β 2-AR, são eles: (i) o isoproterenol não apresentou efeito na fosforilação da ERK1/2 e transcrição de *Per1* em corações $PI3K\gamma^{KD/KD}$, (ii) a dobutamina não apresentou efeito na fosforilação da ERK1/2 e transcrição de *Per1* em corações WT e (iii) o

formoterol aumentou a fosforilação da ERK1/2 e transcrição de *Per1* em corações WT. Além disto, Zhang *et al.*, 2011, mostraram que há um *crosstalk* funcional entre os receptores β 2-adrenérgicos e as cascatas de sinalização coordenadas pela PI3K em corações de camundongos.

A figura 42 ilustra um modelo esquemático que resume os principais achados deste trabalho:

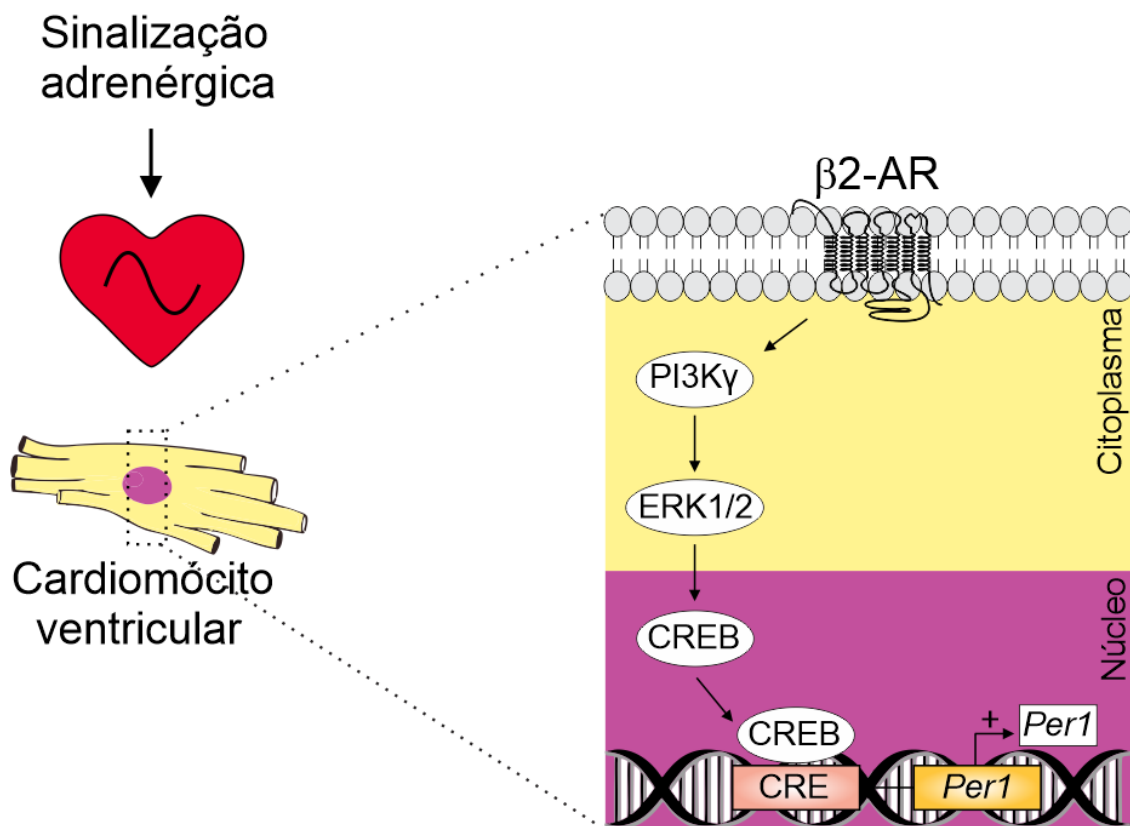


Figura 42: Esquema ilustrativo da cascata de sinalização desencadeada pelos receptores β 2-adrenérgicos, que culmina na transcrição de *Per1* no coração. β 2-AR = receptor β -adrenérgico 2; PI3K γ = fosfatidilinositol 3-quinase gama; ERK1/2 = quinases reguladas por sinal extracelular e CREB = proteína de ligação responsiva ao AMPc.

9. Conclusão

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que os receptores β 2-adrenérgico controlam a atividade transcricional de *Per1* no coração via um fosfo-mecanismo mediado pela PI3K γ -ERK1/2-CREB-CRE. Tendo em vista o fato de que alterações na atividade simpática contribuem para o desenvolvimento da disfunção cardíaca, o conhecimento acerca do papel dos receptores β 2-AR na regulação de *Per1* no tecido cardíaco irá contribuir para o entendimento dos mecanismos ativados durante a insuficiência cardíaca e possibilitar o desenvolvimento de novas formas de terapêutica.

10. Referências Bibliográficas

AGUILAR-ROBLERO, R. et al. Suprachiasmatic nucleus transplants function as an endogenous oscillator only in constant darkness. **Neuroscience Letters**, v. 69, n. 1, p. 47–52, ago. 1986.

AKASHI, M. et al. Mitogen-Activated Protein Kinase Is a Functional Component of the Autonomous Circadian System in the Suprachiasmatic Nucleus. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 18, p. 4619–4623, 30 abr. 2008.

BEESELEY, S.; NOGUCHI, T.; WELSH, D. K. Cardiomyocyte Circadian Oscillations Are Cell-Autonomous, Amplified by β -Adrenergic Signaling, and Synchronized in Cardiac Ventricle Tissue. **PloS One**, v. 11, n. 7, p. e0159618, 2016.

BERS, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198–205, jan. 2002.

BILANGES, B.; POSOR, Y.; VANHAESEBROECK, B. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 9, p. 515–534, 2019.

BLACK, N. et al. Circadian rhythm of cardiac electrophysiology, arrhythmogenesis, and the underlying mechanisms. **Heart Rhythm**, v. 16, n. 2, p. 298–307, 2019.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.

BROWN, T. M.; PIGGINS, H. D. Electrophysiology of the suprachiasmatic circadian clock. **Progress in Neurobiology**, v. 82, n. 5, p. 229–255, ago. 2007.

BRUM, P. C. et al. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 3, p. 485–503, set. 2006.

BUTTGEREIT, F. et al. Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 6, p. 349–56, jun. 2015.

CARDINAUX, J. R. et al. Recruitment of CREB binding protein is sufficient for CREB-mediated gene activation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 5, p. 1546–52, mar. 2000.

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

CURTIS, A. M. et al. Circadian variation of blood pressure and the vascular response to asynchronous stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 9, p. 3450–5, 27 fev. 2007.

DEGAUTE, J. P. et al. Quantitative analysis of the 24-hour blood pressure and heart rate patterns in young men. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 18, n. 2, p. 199–210, ago. 1991.

DIBNER, C.; SCHIBLER, U.; ALBRECHT, U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. **Annual Review of Physiology**, v. 72, p. 517–49, 2010.

DURGAN, D. J. et al. The intrinsic circadian clock within the cardiomyocyte. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 4, p. H1530-41, out. 2005.

DURGAN, D. J. et al. Short communication: ischemia/reperfusion tolerance is time-of-day-dependent: mediation by the cardiomyocyte circadian clock. **Circulation Research**, v. 106, n. 3, p. 546–50, 19 fev. 2010.

DURGAN, D. J. et al. Evidence suggesting that the cardiomyocyte circadian clock modulates responsiveness of the heart to hypertrophic stimuli in mice. **Chronobiology International**, v. 28, n. 3, p. 187–203, abr. 2011.

DURGAN, D. J.; YOUNG, M. E. The cardiomyocyte circadian clock: emerging roles in health and disease. **Circulation Research**, v. 106, n. 4, p. 647–58, 5 mar. 2010.

EDERY, I. Circadian rhythms in a nutshell. **Physiological Genomics**, v. 3, n. 2,

p. 59–74, 9 ago. 2000.

FREY, N. et al. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? **Circulation**, v. 109, n. 13, p. 1580–9, 6 abr. 2004.

GOLDSMITH, C. S.; BELL-PEDERSEN, D. Diverse roles for MAPK signaling in circadian clocks. **Advances in Genetics**, v. 84, p. 1–39, 2013.

GREBE, K. M. et al. Cutting edge: Sympathetic nervous system increases proinflammatory cytokines and exacerbates influenza A virus pathogenesis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 184, n. 2, p. 540–4, 15 jan. 2010.

GRIMM, M.; BROWN, J. H. Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, n. 2, p. 322–30, fev. 2010.

HASHIMOTO, M. et al. Diurnal variation of autonomic nervous activity in the rat: investigation by power spectral analysis of heart rate variability. **Journal of Electrocardiology**, v. 32, n. 2, p. 167–71, abr. 1999.

HASTINGS, M. H.; REDDY, A. B.; MAYWOOD, E. S. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 8, p. 649–61, ago. 2003.

HASTINGS, M. H.; MAYWOOD, E. S.; BRANCACCIO, M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 453–469, 22 ago. 2018.

HERNANDEZ-BALTAZAR, D.; ZAVALA-FLORES, L. M.; VILLANUEVA-OLIVO, A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. **Neurologia (Barcelona, Spain)**, v. 32, n. 8, p. 533–539, out. 2017.

HIDA, A. et al. The human and mouse Period1 genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of mPer1 transcription. **Genomics**, v. 65, n. 3, p. 224–33, 1 maio 2000.

HIRAI, T.; TANAKA, K.; TOGARI, A. β -adrenergic receptor signaling regulates

Ptgs2 by driving circadian gene expression in osteoblasts. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. Pt 17, p. 3711–9, 1 set. 2014.

HOOD, S.; AMIR, S. The aging clock: circadian rhythms and later life. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 2, p. 437–446, 1 fev. 2017.

HUSSE, J. et al. The light-dark cycle controls peripheral rhythmicity in mice with a genetically ablated suprachiasmatic nucleus clock. **FASEB Journal**, v. 28, n. 11, p. 4950–60, nov. 2014.

ICHIKI, T. Role of cAMP response element binding protein in cardiovascular remodeling: good, bad, or both? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 3, p. 449–55, mar. 2006.

JARDINE, D. L. et al. Increased cardiac sympathetic nerve activity following acute myocardial infarction in a sheep model. **The Journal of Physiology**, v. 565, n. Pt 1, p. 325–33, 15 maio 2005.

JESUS, I. C. G. et al. Alamandine enhances cardiomyocyte contractility in hypertensive rats through a nitric oxide-dependent activation of CaMKII. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 318, n. 4, p. C740–C750, 2020.

JEYARAJ, D. et al. Circadian rhythms govern cardiac repolarization and arrhythmogenesis. **Nature**, v. 483, n. 7387, p. 96–9, 22 fev. 2012.

JOERS, V. et al. Cardiac sympathetic denervation in 6-OHDA-treated nonhuman primates. **PloS One**, v. 9, n. 8, p. e104850, 2014.

KIMURA, K. et al. Norepinephrine-induced nerve growth factor depletion causes cardiac sympathetic denervation in severe heart failure. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 156, n. 1–2, p. 27–35, 25 ago. 2010.

KOMOTO, S. et al. Comparison of β -Adrenergic and Glucocorticoid Signaling on Clock Gene and Osteoblast-Related Gene Expressions in Human Osteoblast. **Chronobiology International**, v. 29, n. 1, p. 66–74, 4 fev. 2012.

KORSHUNOV, K. S.; BLAKEMORE, L. J.; TROMBLEY, P. Q. Dopamine: A Modulator of Circadian Rhythms in the Central Nervous System. **Frontiers in**

Cellular Neuroscience, v. 11, p. 91, 2017.

KOSTRZEWA, R. M.; JACOBOWITZ, D. M. Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. **Pharmacological Reviews**, v. 26, n. 3, p. 199–288, set. 1974.

LAVERTY, R.; SHARMAN, D. F.; VOGT, M. ACTION OF 2, 4, 5-TRIHYDROXYPHENYLETHYLAMINE ON THE STORAGE AND RELEASE OF NORADRENALINE. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 24, p. 549–60, abr. 1965.

LEFTA, M. et al. Development of dilated cardiomyopathy in Bmal1-deficient mice. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 303, n. 4, p. H475-85, 15 ago. 2012.

LESAUTER, J.; SILVER, R. Localization of a suprachiasmatic nucleus subregion regulating locomotor rhythmicity. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 13, p. 5574–85, 1 jul. 1999.

LOWREY, P. L. et al. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5465, p. 483–92, 21 abr. 2000.

LYMPEROPOULOS, A.; RENGO, G.; KOCH, W. J. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. **Circulation Research**, v. 113, n. 6, p. 739–53, 30 ago. 2013.

MANCIA, G.; GRASSI, G. The autonomic nervous system and hypertension. **Circulation Research**, v. 114, n. 11, p. 1804–14, 23 maio 2014.

MANFREDINI, R. et al. Relationships of the circadian rhythms of thrombotic, ischemic, hemorrhagic, and arrhythmic events to blood pressure rhythms. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 783, p. 141–58, 15 ago. 1996.

MANFREDINI, R. et al. Chronobiology of rupture and dissection of aortic aneurysms. **Journal of Vascular Surgery**, v. 40, n. 2, p. 382–8, ago. 2004.

MARTINO, T. A. et al. Circadian rhythm disorganization produces profound

cardiovascular and renal disease in hamsters. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 5, p. R1675-83, maio 2008.

MARTINO, T. A.; YOUNG, M. E. Influence of the cardiomyocyte circadian clock on cardiac physiology and pathophysiology. **Journal of Biological Rhythms**, v. 30, n. 3, p. 183–205, jun. 2015.

MENDOZA-VIVEROS, L. et al. Molecular modulators of the circadian clock: lessons from flies and mice. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 6, p. 1035–1059, 2017.

MOHRI, T. et al. Alterations of circadian expressions of clock genes in Dahl salt-sensitive rats fed a high-salt diet. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 42, n. 2, p. 189–94, ago. 2003.

MORIOKA, N. et al. Noradrenaline induces clock gene Per1 mRNA expression in C6 glioma cells through beta(2)-adrenergic receptor coupled with protein kinase A - cAMP response element binding protein (PKA-CREB) and Src-tyrosine kinase - glycogen synthase kinase-3beta (Src-GSK). **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 113, n. 3, p. 234–45, 2010.

MORISHITA, Y.; MIURA, D.; KIDA, S. PI3K regulates BMAL1/CLOCK-mediated circadian transcription from the Dbp promoter. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 80, n. 6, p. 1131–40, jun. 2016.

MULLER, J. E. et al. Circadian variation in the frequency of sudden cardiac death. **Circulation**, v. 75, n. 1, p. 131–8, jan. 1987.

NAKAMURA, M.; SADOSHIMA, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 7, p. 387–407, 2018.

OBRIETAN, K. et al. Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 25, p. 17748–56, 18 jun. 1999.

OZAKCA, I. et al. Nebivolol prevents desensitization of β -adrenoceptor

signaling and induction of cardiac hypertrophy in response to isoprenaline beyond β 1-adrenoceptor blockage. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 304, n. 9, p. H1267-76, maio 2013.

PANDA, S. et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. **Cell**, v. 109, n. 3, p. 307–20, 3 maio 2002.

PATKE, A.; YOUNG, M. W.; AXELROD, S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 67–84, 2020.

PATRUCCO, E. et al. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. **Cell**, v. 118, n. 3, p. 375–87, 6 ago. 2004.

PILORZ, V.; HELFRICH-FÖRSTER, C.; OSTER, H. The role of the circadian clock system in physiology. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 470, n. 2, p. 227–239, 2018.

PODOBED, P. et al. The day/night proteome in the murine heart. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 307, n. 2, p. R121-37, 15 jul. 2014.

PREITNER, N. et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 251–60, 26 jul. 2002.

RANA, S.; PRABHU, S. D.; YOUNG, M. E. Chronobiological Influence Over Cardiovascular Function: The Good, the Bad, and the Ugly. **Circulation Research**, v. 126, n. 2, p. 258–279, 2020.

REILLY, D. F. et al. Peripheral circadian clock rhythmicity is retained in the absence of adrenergic signaling. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 1, p. 121–6, jan. 2008.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Molecular Analysis of Mammalian Circadian Rhythms. **Annual Review of Physiology**, v. 63, n. 1, p. 647–676, mar. 2001.

RIEDEL, C. S. et al. Mice Lacking EGR1 Have Impaired Clock Gene (BMAL1)

Oscillation, Locomotor Activity, and Body Temperature. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 64, n. 1, p. 9–19, jan. 2018.

SAAD, N. S. et al. Protein Kinase A as a Promising Target for Heart Failure Drug Development. **Archives of Medical Research**, v. 49, n. 8, p. 530–537, 2018.

SACHAN, N. et al. Sustained hemodynamic stress disrupts normal circadian rhythms in calcineurin-dependent signaling and protein phosphorylation in the heart. **Circulation Research**, v. 108, n. 4, p. 437–45, 18 fev. 2011.

SAITOH, Y.; NIHONMATSU, I.; KAWAMURA, H. Location of the suprachiasmatic nucleus grafts in rats which restored circadian rhythmicity after transplantation. **Neuroscience Letters**, v. 118, n. 1, p. 45–48, out. 1990.

SANTULLI, G.; IACCARINO, G. Adrenergic signaling in heart failure and cardiovascular aging. **Maturitas**, v. 93, p. 65–72, nov. 2016.

SARAIVA, R. M. et al. Impaired beta-adrenergic response and decreased L-type calcium current of hypertrophied left ventricular myocytes in postinfarction heart failure. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 5, p. 635–48, maio 2003.

SCHRODER, E. A. et al. The cardiomyocyte molecular clock, regulation of Scn5a, and arrhythmia susceptibility. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 304, n. 10, p. C954-65, 15 maio 2013.

SHEARMAN, L. P. et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5468, p. 1013–9, 12 maio 2000.

STORCH, K.-F. et al. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. **Nature**, v. 417, n. 6884, p. 78–83, 2 maio 2002.

TAHARA, Y. et al. Age-related circadian disorganization caused by sympathetic dysfunction in peripheral clock regulation. **NPJ Aging and Mechanisms of Disease**, v. 3, p. 16030, 2017.

TAKAHASHI, J. S. et al. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. **Nature Reviews Genetics**, v.

9, n. 10, p. 764–75, out. 2008.

TAKATA, M. et al. Beta2-adrenoceptor agonists induce the mammalian clock gene, hPer1, mRNA in cultured human bronchial epithelium cells in vitro. **Chronobiology International**, v. 22, n. 4, p. 777–83, 2005.

TERAZONO, H. et al. Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 11, p. 6795–800, 27 maio 2003.

TISCHKAU, S. A. et al. Ca²⁺/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of Per1 is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 2, p. 718–23, 10 jan. 2003.

THOSAR, S. S.; BUTLER, M. P.; SHEA, S. A. Role of the circadian system in cardiovascular disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 6, p. 2157–2167, 1 jun. 2018.

TRAVNICKOVA-BENDOVA, Z. et al. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 11, p. 7728–33, 28 maio 2002.

USHIJIMA, K. et al. Influence of beta-blockers on the myocardial mRNA expressions of circadian clock- and metabolism-related genes. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 7, n. 2, p. 107–17, 2013.

VADAS, O. et al. Molecular determinants of PI3K γ -mediated activation downstream of G-protein-coupled receptors (GPCRs). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 47, p. 18862–7, 19 nov. 2013.

VYAS, M. V et al. Shift work and vascular events: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 345, p. e4800, 26 jul. 2012.

WANG, Y. et al. Circadian control of intrinsic heart rate via a sinus node clock and the pacemaker channel. **bioRxiv**, 2019.

WEHRWEIN, E. A. et al. Cardiac norepinephrine transporter protein expression is inversely correlated to chamber norepinephrine content. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 3, p. R857-63, set. 2008.

WHO, W. H. O. **The world health report 2002 - Reducing Risks, Promoting Healthy Life**. Disponível em: <<https://www.who.int/whr/2002/en/>>. Acesso em: 2 mar. 2020.

WONGCHITRAT, P. et al. A noradrenergic sensitive endogenous clock is present in the rat pineal gland. **Neuroendocrinology**, v. 94, n. 1, p. 75–83, 2011.

YAMAGUCHI, S. et al. Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 13, p. 4773–81, jul. 2000.

YAMAJUKU, D. et al. Real-time monitoring in three-dimensional hepatocytes reveals that insulin acts as a synchronizer for liver clock. **Scientific Reports**, v. 2, p. 439, 2012.

YOUNG, M. E.; RAZEGHI, P.; TAEGTMEYER, H. Clock genes in the heart: characterization and attenuation with hypertrophy. **Circulation Research**, v. 88, n. 11, p. 1142–50, 8 jun. 2001.

YUJNOVSKY, I. et al. Signaling mediated by the dopamine D2 receptor potentiates circadian regulation by CLOCK:BMAL1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 16, p. 6386–91, 18 abr. 2006.

ZHANG, E. E. et al. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. **Nature Medicine**, v. 16, n. 10, p. 1152–6, out. 2010.

ZHANG, L. et al. REV-ERB α ameliorates heart failure through transcription repression. **JCI insight**, v. 2, n. 17, 2017.

ZHANG, R. et al. A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences, v. 111, n. 45, p. 16219–16224, 11 nov. 2014.

ZHANG, W. et al. β -Adrenergic receptor-PI3K signaling crosstalk in mouse heart: elucidation of immediate downstream signaling cascades. **PloS One**, v. 6, n. 10, p. e26581, 2011.