

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO FISILOGIA E FARMACOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

**ESTRADIOL E CANAL TRPV1 CONTRIBUEM PARA O CONTROLE
VASOMOTOR E FLUXO SANGUÍNEO DA ARTÉRIA DA CAUDA:
CONSEQUENCIAS PARA A DISSIPACÃO DE CALOR EM RATAS**

Flávia Magalhães Araújo

Belo Horizonte – MG

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO FISILOGIA E FARMACOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

**ESTRADIOL E CANAL TRPV1 CONTRIBUEM PARA O CONTROLE
VASOMOTOR E FLUXO SANGUÍNEO DA ARTÉRIA DA CAUDA:
CONSEQUENCIAS PARA A DISSIPACÃO DE CALOR EM RATAS**

Flávia Magalhães Araújo

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 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: Prof^a. Dr^a. Maristela Poletini

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Guatimosim

Belo Horizonte – MG

2021

043

Araújo, Flávia Magalhães.

Estradiol e canal TRPV1 contribuem para o controle vasomotor e fluxo sanguíneo da artéria da cauda: consequências para a dissipação de calor em ratas [manuscrito] / Flávia Magalhães Araújo. – 2021.

84 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Maristela Poletini. Coorientadora: Profa. Dra. Sílvia Guatimosim.

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

1. Fisiologia. 2. Regulação da Temperatura Corporal. 3. Canais de Receptores Transientes de Potencial. 4. Tirosina 3-Mono-Oxigenase. 5. Óxido Nítrico. 6. Receptores Estrogênicos. I. Poletini, Maristela de Oliveira. II. Guatimosim, Sílvia 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

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE TESE N° 349 DE FLÁVIA MAGALHÃES ARAÚJO

Estradiol e Canal TRPV1 Contribuem Para o Controle Vasomotor e Fluxo Sanguíneo da Artéria da Cauda: Consequências Para a Dissipação de Calor em Ratas

FLÁVIA MAGALHÃES ARAÚJO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **26 de outubro de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau, ICB/UFMG
Prof. Dr. Samuel Penna Wanner, EEFFTO/UFMG
Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos, CCS/UFES
Prof. Dr. Guilherme Gomes, IFSC/USP
Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini, ICB/UFMG - Orientadora

Belo Horizonte, 26 de outubro de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Samuel Penna Wanner, Professor do Magistério Superior**, em 28/10/2021, às 13:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Stefany Bruno de Assis Cau, Professor do Magistério Superior**, em 28/10/2021, às 18:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Gomes, Usuário Externo**, em 29/10/2021, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Maristela de Oliveira Poletini, Professora do Magistério**



Superior, em 01/11/2021, às 19:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roger Lyrio dos Santos, Usuário Externo**, em 04/11/2021, às 13:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



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 **1020834** e o código CRC **6842ED1D**.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai Antônio, à minha irmã Camila e ao meu namorado Daniel pelo amor, companheirismo e incentivo nessa caminhada.

À Flavinha e ao Itamar pela amizade e apoio de sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder saúde e sabedoria para chegar até aqui e por ter colocado as melhores pessoas e oportunidades em meu caminho.

Ao meu pai Antônio, agradeço todo amor e carinho. Você é meu maior exemplo de caráter, dedicação e persistência. Minha trajetória se tornou mais leve e segura com a sua presença. Obrigada por tudo. Amo você!

À minha irmã Camila por compartilhar comigo todos os momentos e ser meu porto seguro. Admiro sua força de vontade em tentar sempre evoluir como profissional e ser humano. Tenho certeza que juntas somos mais fortes para vencer qualquer desafio.

Ao Daniel, agradeço o carinho e companheirismo. Com você aprendi que os nossos sonhos e objetivos podem se tornar reais com nossa força de vontade e dedicação. Que eu me espelhe sempre em você para seguir em frente. Agradeço também a toda sua família por me acolher com tanto carinho e afeto.

À minha família e amigos que torceram por mim e estiveram ao meu lado. Vocês são essenciais em minha vida.

À Flavinha, por dividir comigo essa longa jornada que vem desde a nossa graduação. Que a vida nos permita conduzir essa amizade com a mesma delicadeza e carinho de sempre. Você é muito especial para mim e eu não estaria aqui sem você. Que continuemos nossa caminhada sempre de mãos dadas, pois isso nos representa. Te amo, minha Benzinha!

Ao Itamar, pela oportunidade de trabalharmos juntos e, além disso, sermos grandes amigos. Te admiro em todos os aspectos, seja como pessoa, amigo ou pesquisador. Obrigada por ser minha melhor companhia durante esses quase 7 anos e por tanto aprendizado adquirido nesse tempo. Você tornou meus dias mais leves e muito felizes. Que suas conquistas sejam do tamanho do seu esforço! Estarei sempre com você, mesmo quando estivermos fisicamente distantes. Sentirei saudades dos nossos dias de extrema alegria e descontração. Pra sempre meu amado Ponney...

Às amigas de república Castelo pela companhia, conselhos, apoio e momentos felizes.

À minha psicóloga, Camila Malta, por me ajudar a compreender a vida de outra forma e estar comigo nos momentos mais difíceis.

À prof.^a Maristela Poletini pela confiança, paciência e orientação durante toda a pós-graduação. Pra mim, você é exemplo de força, determinação e otimismo, ensinamentos que vão além daqueles obtidos dentro do laboratório e que trazem uma grande lição de vida. Em meio ao atual cenário da pandemia, a sua preocupação com a nossa saúde e bem estar nos mostrou ainda mais o seu lado humano de cuidar das pessoas. Desejo que a sua carreira seja brilhante e repleta de conquistas. E que os desafios sirvam para lembrá-la de como você é forte e capaz de superá-los. Dona de um coração enorme, você foi nossa amiga, nossa fortaleza. O impulso que nos faltava para acreditarmos que podemos chegar até aqui. E nós vencemos... Serei eternamente grata por tudo!

À prof.^a Silvia Guatimosim pela coorientação e colaboração. Seu laboratório se tornou minha casa. Sou muito grata por ter sido recepcionada com grande carinho e alegria. Você sempre me recebeu de forma gentil, com um sorriso no rosto e disposta a ajudar. Sua paixão pela ciência deve ser passada adiante. Tenho muito orgulho em dizer que fiz parte da sua equipe. Sinto uma admiração enorme pelo seu trabalho e por tudo que se tornou. Obrigada por tamanho aprendizado.

Às queridas amigas de laboratório: Nayara, Paola e Thaís por proporcionarem grande alegria aos meus dias. Guardarei vocês com muito carinho e sentirei eterna gratidão por tudo que me ensinaram. Desejo que cada uma encontre a felicidade nas escolhas que fizerem ao longo da vida. E que nunca deixemos para trás esse sorriso no rosto que nos energizava todos os dias. Essa conquista se tornou mais fácil porque vocês estiveram ao meu lado. Amo vocês!

Aos alunos de iniciação científica pelo interesse e dedicação à pesquisa. Vocês contribuíram enormemente com nosso trabalho e sempre se mostraram dispostos a aprender e a colaborar no que fosse preciso. Um agradecimento especial ao Tito, que me acompanhou e auxiliou em vários experimentos. Tê-lo como parceiro foi essencial. Espero ter contribuído um pouquinho com o seu crescimento. Porque

força de vontade e determinação eu aprendi com você. Siga em frente, pois há um mundo de oportunidades te esperando!

Aos amigos e professores do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo pela torcida.

Ao Laboratório de Sinalização Cardíaca pela amizade. Vocês sempre me acolheram com muito carinho e me proporcionaram muitos momentos felizes.

Aos grandes amigos e que conquistei ao longo desses anos, em especial: Lucas, Alan, Elder, Aline, Fernando e Quézia. Obrigada pelo carinho, colaboração e ensinamentos. Obrigada pela grande ajuda nos experimentos. Torço pelas conquistas de cada um de vocês.

Aos professores que ministraram aulas durante esses anos e compartilharam seus conhecimentos.

Aos funcionários do CEBIO e aos bioteristas, Samir e Cássio, por cuidarem tão bem dos nossos animais.

À técnica de laboratório, Simone, por não medir esforços em nos ajudar.

Aos funcionários da secretaria pela presteza.

À equipe de limpeza do prédio e dos laboratórios pela amizade e carinho. Um agradecimento especial à Kátia, que sempre nos alegra com seu sorriso estampado no rosto.

Aos animais por concederem a sua vida em prol da pesquisa.

À CAPES pelo financiamento.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl G. Jung

RESUMO

A regulação autonômica do fluxo sanguíneo para a periferia faz parte dos mecanismos neurais envolvidos no controle da variação da temperatura interna dentro de valores estreitos. No entanto, condições fisiológicas e/ou patológicas podem elevar a temperatura interna, o que pode ser desconfortável, como é o caso das ondas de calor e febre. O estradiol (E2) e o canal Receptor Potencial Transiente Vanilóide tipo 1 (canal TRPV1), participam do controle térmico em mamíferos, dessa forma, hipotetizamos que estes fatores são essenciais para o tônus vasomotor cutâneo regulando o fluxo sanguíneo da artéria da cauda, principal mecanismo de dissipação de calor em ratos. Para testar esta hipótese, ratas *Wistar* adultas foram ovariectomizadas (OVX) e tratadas ou não com E2. Além disso, a dessensibilização e ativação do canal TRPV1 foram as estratégias farmacológicas utilizadas para avaliar a contribuição desse canal (CEUA: 99/2018). A identificação de receptores de estrógenos (ER) na artéria da cauda de ratas aponta para uma possível ação direta do estradiol (E2) nesse leito vascular. Além disso, ratas OVX+E2 mostraram fluxo sanguíneo basal aumentado nesse vaso, mecanismo que favorece a perda de calor. Em contrapartida, a dessensibilização do canal TRPV1 reduziu esse fluxo, mesmo na presença de E2, mostrando a importância desse canal nesse processo. A fim de avaliar se o E2 altera a eferência simpática que chega nas terminações nervosas da artéria da cauda, avaliou-se a expressão da tirosina hidroxilase (TH), enzima limitante da biossíntese de catecolaminas. O tratamento com E2 reduziu a expressão dessa proteína na artéria da cauda, sugerindo, portanto, um possível mecanismo pelo qual o E2 contribui com a maior vasodilatação basal. Outro alvo molecular investigado foi o óxido nítrico (NO), cuja ação vasodilatadora já é descrita em outros leitos vasculares. Interessantemente, o E2 também aumentou a quantidade dessa molécula na artéria da cauda, outro fator que pode explicar a vasodilatação aumentada no grupo OVX+E2. No gânglio da raiz dorsal (DRG), um componente da via aferente da termorregulação, foi identificada a presença de ER- α , TRPV1 e TH, sendo que E2 reduziu a expressão desse canal. Outra vertente do trabalho investigou a ativação do canal TRPV1 sobre a temperatura abdominal ($T_{\text{abdominal}}$) e sobre a TH na presença e ausência dos hormônios ovarianos. Observou-se que a ativação do canal TRPV1 na presença de E2 restabeleceu essa temperatura mais rapidamente, enquanto na ausência do hormônio o retorno da

temperatura aos valores basais foi mais prolongado. Além disso, a ativação do canal TRPV1 não alterou a expressão da TH após 30 e 120 minutos da sua ativação, sugerindo que os efeitos do TRPV1 e do E2 sobre a dissipação de calor são por mecanismos distintos. Por último, avaliamos as respostas termorregulatórias de ratas OVX que tiveram o canal TRPV1 dessensibilizado e expostas ao ambiente aquecido (34°C, 40 min). Foi observado grande aumento da $T_{\text{abdominal}}$ que não foi acompanhado pelo aumento da temperatura da cauda (T_{cauda}), prejudicando dessa forma, a dissipação de calor na condição de ausência de ambos, E2 e TRPV1. Isto pôde ser constatado também pelo elevado limiar e reduzida sensibilidade na dissipação de calor mostrado pelas ratas OVX e com o TRPV1 dessensibilizado. Em conjunto, esses resultados mostram que o E2 e o canal TRPV1 são importantes para manutenção do tônus vasomotor cutâneo e fluxo sanguíneo da artéria da cauda, mecanismos importantes para dissipação de calor.

Palavras chaves: termorregulação, canal TRPV1, tirosina hidroxilase, óxido nítrico, receptores de estrógenos, artéria da cauda.

ABSTRACT

The autonomic regulation of vasomotor tonus defining the blood flow to periphery is part of neural mechanism triggered to maintain body temperature within narrow values. However, in some physiological and/or pathological conditions body temperature may raise, causing disturbances that may be uncomfortable, such as hot flashes and fever. The estradiol (E2) and Transient Receptor Potential Vanilloid-type 1 (TRPV1) channel are known to participate in the thermoregulation. Therefore, the present study test whether E2 and TRPV1 are essential for the cutaneous tonus vasomotor in a way that increase blood flow to tail artery favoring heat dissipation in female rats. For that, adult *Wistar* rats were ovariectomized (OVX) and treated with E2 or oil. Desensitization and activation of the TRPV1 channel were the pharmacological strategies used to evaluate the contribution of this channel (CEUA: 99/2018). The identification of estrogen receptors (ER) in the tail artery points to a possible direct action of estradiol (E2) in this vascular bed, which is the main route of heat dissipation of rats. In addition, OVX+E2 rats showed increased basal blood flow in this vessel. On the other hand, the desensitization of the TRPV1 channel reduced this flow, even in the presence of E2, showing the importance of this channel in this process. To evaluate whether E2 alters the sympathetic efference that reaches the nerve endings of the tail artery, the expression of tyrosine hydroxylase (TH), a limiting enzyme of catecholamine biosynthesis, was evaluated. Treatment with E2 reduced the expression of this protein in the tail artery, suggesting a possible mechanism by which E2 contributes to a greater basal vasodilation. Another E2 target investigated was nitric oxide (NO), whose vasodilator action is already described in other vascular beds. Interestingly, E2 also increased the amount of this molecule in the tail artery, which also may explain the increased vasodilation in the OVX+E2 group. The presence of ER- α , TRPV1 and TH was identified in the dorsal root ganglion (DRG), a component of the afferent pathway of thermoregulation. In this region, E2 was capable of reducing the expression TRPV1. On the other hand, the hypothermia induced by TRPV1 activation was more quickly reverted in ovary-intact rats, which suggest a participation of ovarian steroids on this response. However, TRPV1 activation did not alter the expression of TH either in OVX or ovary-intact rats, suggesting that the TRPV1-recruited pathways regulating heat dissipation may differ from those of E2. Finally, we evaluated the thermoregulatory responses of OVX rats

that had the TRPV1 channel desensitized to a warming environment (34°C, 40 min). Compared to vehicle, TRPV1 desensitized rats showed a large increase in the core body temperature that was not accompanied by an increase in tail temperature. In addition, TRPV1-desensitized OVX rats showed high threshold and reduced sensitivity in heat dissipation. Together these results show that E2 and TRPV1 are important for maintaining cutaneous vasomotor tone and blood flow of the tail artery, in a such way that favors heat dissipation. E2 and TRPV1 thermoregulation may be through different molecular targets.

Key words: thermoregulation, TRPV1 channel, tyrosine hydroxylase, nitric oxide, estrogen receptors, tail artery

LISTA DE ABREVIATURAS

APO – Área pré-óptica

DRG – *Dorsal root ganglion* (Gânglio da raiz dorsal)

E2 – Estradiol

ER – *Estrogen receptors* (Receptores de estrógeno)

ER- α – *Estrogen receptor alpha* (Receptor alfa de estrógeno)

ER- β – *Estrogen receptor beta* (Receptor beta de estrógeno)

GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina

GP1R – G protein-coupled estrogen receptor 1

NO – *Nitric Oxide* (Óxido nítrico)

NOS – *Nitric Oxide Synthase* (Óxido Nítrico Sintase)

OVX – Ovariectomia

PKC ϵ – Proteína kinase C épsilon

pPKC ϵ – Proteína kinase C épsilon fosforilada

pTH – Tirosina hidroxilase fosforilada

pTRPV1 – Canal TRPV1 fosforilado

RTX – Resiniferatoxina

TH – Tirosina Hidroxilase

T_{abdominal} – Temperatura abdominal

T_{ambiente} – Temperatura ambiente

T_{cauda} – Temperatura da cauda

TRP – Receptor Potencial Transiente

TRPV1 – Receptor Potencial Transiente Vanilóide tipo 1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Circuito neural responsável pelo controle de temperatura.....	23
Figura 2 – Anatomia dos vasos da cauda de ratos.....	25
Figura 3 – Mecanismos envolvidos do relaxamento do endotélio.....	28
Figura 4 – Estrutura do canal TRP.....	29
Figura 5 – Linha do tempo referente ao delineamento experimental 4.4.2.....	34
Figura 6 – Linha do tempo referente ao delineamento experimental 4.2.6.....	36
Figura 7 – Linha do tempo referente ao delineamento experimental 4.2.7.....	36
Figura 8 – Linha do tempo referente ao delineamento experimental 4.2.8.....	37
Figura 9 – Subtipos de receptores de estrógeno presentes na artéria da cauda de ratas intactas.....	47
Figura 10 – Avaliação do fluxo sanguíneo na artéria da cauda de ratas ovariectomizadas.....	48
Figura 11 – Expressão proteica da enzima TH na artéria da cauda.....	49
Figura 12 – Marcação de NO na artéria da cauda de ratas ovariectomizadas.....	50
Figura 13 – Expressão proteica de ER- α no DRG.....	51
Figura 14 – Expressão proteica da enzima TH no DRG.....	52
Figura 15 – Análise da expressão gênica do canal TRPV1 no DRG.....	53
Figura 16 – Avaliação do fluxo sanguíneo na artéria da cauda.....	55
Figura 17 – Ativação do canal TRPV1 pelo RTX.....	57
Figura 18 – Expressão proteica de TH na artéria da cauda após 30 minutos da ativação do canal TRPV1.....	59
Figura 19 – Avaliação das respostas termorregulatórias de ratas ovariectomizadas com implante óleo que receberam injeção de veículo ou RTX e foram expostas ao ambiente aquecido.....	61

Figura 20 – Análise dos parâmetros termorregulatórios de ratas ovariectomizadas com implante óleo que receberam injeção de veículo ou RTX e foram expostas ao ambiente aquecido.....	63
Figura 21 – Atividade locomotora espontânea de animais do grupo SHAM e OVX + Óleo que receberam injeção de RTX em dose agonista ou veículo.....	64
Figura 22 – Possível mecanismo de ação do E2 e canal TRPV1 sobre a temperatura interna.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos utilizados no <i>Western Blotting</i>	44
Tabela 2 – Peso do útero de ratas com implante óleo ou E2 após 14 dias de tratamento.....	46
Tabela 3 – Peso corporal das ratas em cada etapa experimental.....	46
Tabela 4 – Avaliação do limiar nociceptivo após as injeções de veículo e RTX.....	54
Tabela 5 – Avaliação do limiar nociceptivo de ratas intactas e após as injeções de veículo e RTX.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Aspectos gerais da termorregulação	21
1.2 Hormônios ovarianos e termorregulação	25
1.3 Moléculas envolvidas no tônus vasomotor cutâneo	27
1.4 Canal TRPV1 e termorregulação	29
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. METODOLOGIA	34
4.1 Animais	34
4.2 Delineamentos experimentais	34
4.3 Anestésicos e diluição de drogas	37
4.4 Ovariectomia	38
4.5 Remoção do DRG e artéria da cauda	38
4.6 Ativação do canal TRPV1	38
4.7 Dessensibilização do canal TRPV1	39
4.8 Avaliação do limiar nociceptivo	39
4.9 Implante do sensor e registro da $T_{abdominal}$	39
4.10 Habituação e aquecimento dos animais	40
4.11 Avaliação da função vasomotora	40
4.12 Avaliação da produção de NO na artéria da cauda	41
4.13 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	41
4.13.1 Extração do RNA e tratamento com DNase	41
4.13.2 Reação da transcriptase reversa e formação do cDNA	42
4.13.3 Amplificação e quantificação do mRNA	42
4.14 Western Blotting	43
4.15 Cálculo do limiar e sensibilidade de dissipação de calor	44
4.16 Análise estatística	45
5. RESULTADOS	46
5.1 Validação do tratamento com E2	46
5.2 Identificação de ER na artéria da cauda	46

5.3 Efeito do tratamento com E2 sobre o fluxo sanguíneo da cauda	47
5.4 Efeito do tratamento com E2 sobre a enzima TH na artéria da cauda	49
5.5 Efeito do tratamento com E2 sobre o NO na artéria da cauda	50
5.6 Efeito do tratamento com E2 sobre o ER- α no DRG	51
5.7 Efeito do tratamento com E2 sobre a enzima TH no DGR	52
5.8 Efeito do tratamento com E2 sobre o canal TRPV1 no DRG	52
5.9 Efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre o fluxo sanguíneo da cauda de ratas tratadas com E2	54
5.10 Efeito da ativação do canal TRPV1 sobre a $T_{abdominal}$	56
5.11 Efeito da ativação do canal TRPV1 sobre a enzima TH na artéria da cauda ..	58
5.12 Efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre a $T_{abdominal}$ e T_{cauda} de ratas ovariectomizadas durante a exposição ao calor	59
5.13 Efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre o limiar e a sensibilidade de dissipação de calor em ratas ovariectomizadas	62
5.14 Efeito do aquecimento e das injeções de RTX/Veículo sobre a atividade locomotora espontânea	64
6. DISCUSSÃO	65
6.1 Efeito do E2 sobre o fluxo sanguíneo e alvos moleculares da artéria da cauda	65
6.2 Efeito do E2 sobre alvos moleculares no DRG	67
6.3 Efeito do canal TRPV1 sobre o fluxo sanguíneo, $T_{abdominal}$ e alvos moleculares na artéria da cauda na presença e na ausência de E2	69
7. CONCLUSÃO	73
8. REFERÊNCIAS	74
9. APÊNDICE	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da termorregulação

A temperatura é a unidade mensurável de calor, caracterizada pela energia cinética produzida pelo movimento aleatório de moléculas num determinado volume (MERCER, 2001). Seguindo as leis da termodinâmica, o calor flui por gradiente, das regiões de temperatura mais quente para a mais fria. Em animais, a estabilidade da temperatura interna dentro de uma faixa estreita acontece porque mecanismos regulatórios são acionados. De outra forma, o calor interno seria continuamente trocado com o meio ambiente por meio de condução, convecção, radiação e evaporação (SAWKA et al., 2011).

A maioria dos seres vivos na Terra (incluindo fungos, plantas, micróbios e a maioria das espécies animais) não são capazes de produzir calor, ou seja, são ectotérmicos, sua temperatura está à mercê das variações de temperatura ambiental. Alguns destes organismos (limitados a alguns grupos taxonômicos) possuem um repertório de mecanismos comportamentais, os quais podem garantir algum ajuste da temperatura interna. Já os animais capazes de produzir calor endogenamente, os endotérmicos, apresentam uma estreita variação da temperatura interna, independente das flutuações de temperatura que ocorrem no ambiente (ROMANOVSKY, 2018). Nestes animais (pássaros e mamíferos), a combustão metabólica dos alimentos, a energia cinética das contrações musculares e a fricção do sangue circulante produzem calor continuamente que deve ser armazenado ou dissipado de maneira adequada com o objetivo de manter a função celular (BLACK; HARTLEY, 1985). Evolutivamente, estes animais desenvolveram uma notável habilidade de regular sua temperatura interna em valores mais altos que sua vizinhança, que pode ter sido uma consequência secundária das taxas metabólicas mais altas necessárias para a alta demanda energética exigida, por exemplo, em função de atividade sustentada (como no voo) ou ocupação de novos nichos ecológicos (por exemplo, durante o forrageamento noturno ou em climas frios) (BENNETT; RUBEN, 1979; CROMPTON; TAYLOR; JAGGER, 1978; KAMMER; HEINRICH, 1978). Dessa forma, durante o processo evolutivo, manter a temperatura interna elevada pode ter sido uma estratégia defendida como um meio de possibilitar a otimização dos processos celulares para uma faixa específica de temperatura (KAMMER; HEINRICH, 1978). O surgimento de temperatura interna

elevada, mas estável, foi um evento chave que acompanhou a proliferação de pássaros e mamíferos em todo o mundo. Dessa forma, uma compreensão do sistema termorregulador é fundamental para a compreensão de nossa própria fisiologia, ou do nosso estado de saúde. Por exemplo, valores de temperatura interna fora da faixa de variação para uma espécie pode representar um sinal de alerta (ou quebra) da homeostasia corporal. O exemplo mais emblemático disso é durante a febre, uma sintomatologia comum a diversas doenças, cuja etiologia pode variar desde a sepse (caso mais extremo), passando por reações medicamentosas e tromboembolismo venoso quando observada em pacientes em unidade de terapia intensiva (MEIER; LEE, 2016).

Sabe-se que a homeostase térmica é resultante da combinação de respostas autonômicas e comportamentais envolvidas no controle de temperatura (CHAPPUIS et al., 2013; NAGASHIMA et al., 2000). O controle autonômico de temperatura pode ser dividido, didaticamente, em três partes: via aferente, integração e via eferente (NAKAMURA, 2011; ROMANOVSKY et al., 2009). A figura 1 descreve esse circuito neuronal mostrando todas as regiões centrais e periféricas envolvidas no controle de temperatura, que compreende: receptores térmicos → gânglio da raiz dorsal (DRG) → corno dorsal da medula espinhal → núcleo parabraquial dorsal → núcleo pré-óptico mediano → área pré-óptica medial → hipotálamo dorso medial → núcleo da rafe → coluna intermédia lateral → gânglio simpático → vasos sanguíneos e tecido adiposo marrom (ROMANOVSKY et al., 2009). O DRG é o local de comunicação dos aferentes sensoriais da via neural responsável pela termorregulação (ROMANOVSKY et al., 2009).

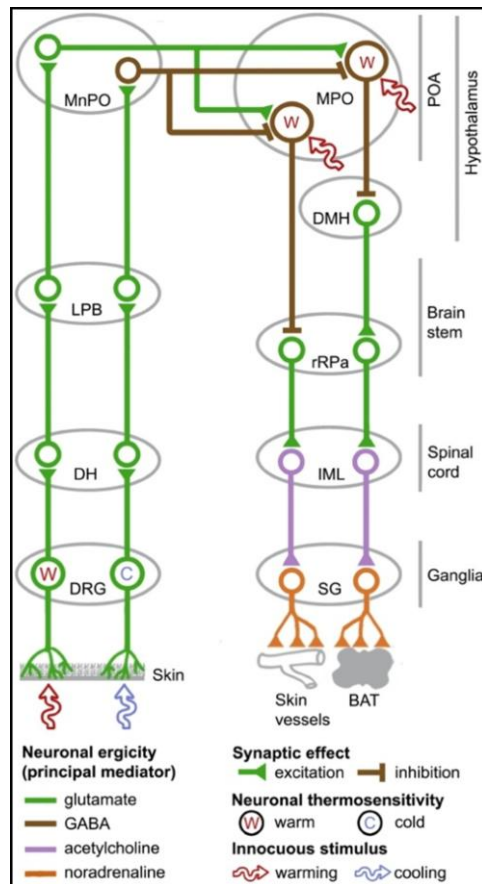


Figura 1: Circuito neural responsável pelo controle de temperatura (ROMANOVSKY et al., 2009). DRG = dorsal-root ganglion; DH = dorsal horn; LPB = lateral parabrachial nucleus; MnPO = median preoptic nucleus; MPO = medial preoptic area; DMH = dorsomedial hypothalamus; rRPa = rostral raphe pallidus nucleus; IML = intermediolateral column; SG = sympathetic ganglia.

Conforme mostrado no esquema da Figura 1, a percepção térmica de frio ou calor pelos terminais nervosos presentes na pele são determinantes para a excitação ou inibição dos neurônios envolvidos no controle de temperatura. Em ambientes de maior temperatura, por exemplo, esses termorreceptores geram potenciais de ação que são transmitidos até a área pré-óptica do hipotálamo (APO) e estimulam neurônios gabaérgicos sensíveis ao calor. Assim, a eferência provoca uma inibição da liberação de neurotransmissores simpáticos, reduzindo a vasoconstrição cutânea, termogênese pelo tecido adiposo marrom e tremor pelo músculo esquelético, contribuindo para dissipação de calor (NAKAMURA, 2011; ROMANOVSKY et al., 2009). Em contrapartida, durante a exposição à menores temperaturas ocorre inibição dos neurônios gabaérgicos sensíveis ao calor. Como

consequência, há um desimpedimento da via responsável pela ativação simpática, resultando em aumento da vasoconstrição cutânea, termogênese pelo tecido adiposo marrom e tremor pelo músculo esquelético, favorecendo a produção e/ou conservação de calor (NAKAMURA, 2011; ROMANOVSKY et al., 2009). É importante ressaltar que apesar de muitos trabalhos da literatura proporem a ativação ou inibição do circuito gabaérgico na transmissão das informações de temperatura, um estudo recente de Machado e colaboradores (2018) mostraram que as projeções que saem do hipotálamo para o núcleo da rafe também são glutamatérgicas (MACHADO et al., 2018).

A zona termoneutra pode ser definida como a faixa de temperatura ambiente (T_{ambiente}) em que o controle da temperatura interna ocorre apenas por perda de calor seco através da variação do tônus vasomotor cutâneo (vasoconstrição e vasodilatação) (DACKS; RANCE, 2010). Em faixas de temperatura abaixo ou acima da zona termoneutra, pelo fato dos vasos sanguíneos estarem completamente contraídos ou dilatados (ROMANOVSKY; IVANOV; SHIMANSKY, 2002), outros mecanismos são acionados para a manutenção da temperatura interna, como alteração da produção de calor metabólico e sudorese (DACKS; RANCE, 2010; ROMANOVSKY; IVANOV; SHIMANSKY, 2002).

Algumas características anatômicas da cauda do rato fazem com que essa região seja de extrema importância para a dissipação de calor, como por exemplo: (i) ausência de pêlos, (ii) elevada vascularização e (iii) extensa superfície para troca de calor (GORDON, 1990). Pelo fato da cauda apresentar grande relação superfície/volume, a troca de calor com o meio externo é facilitada, tornando essa região uma ótima janela térmica (ROMANOVSKY; IVANOV; SHIMANSKY, 2002). Além disso, os vasos da cauda (tanto as veias laterais quanto a artéria ventral) recebem inervação simpática adrenérgica (JOHNSON; CONEY; MARSHALL, 2001), que é responsável pelo controle do tônus vasomotor cutâneo (NAKAMURA, 2011; ROMANOVSKY et al., 2009). A figura 2 mostra a distribuição anatômica dos vasos sanguíneos na cauda do rato. Pelo fato de estudos mostrarem que a artéria ventral da cauda fornece a maior quantidade de sangue para essa região (YOUNG; DAWSON, 1982), esse foi o leito vascular escolhido para investigar as respostas termorregulatórias neste trabalho. Utilizou-se o termo “artéria da cauda” para se referir a esse leito vascular.

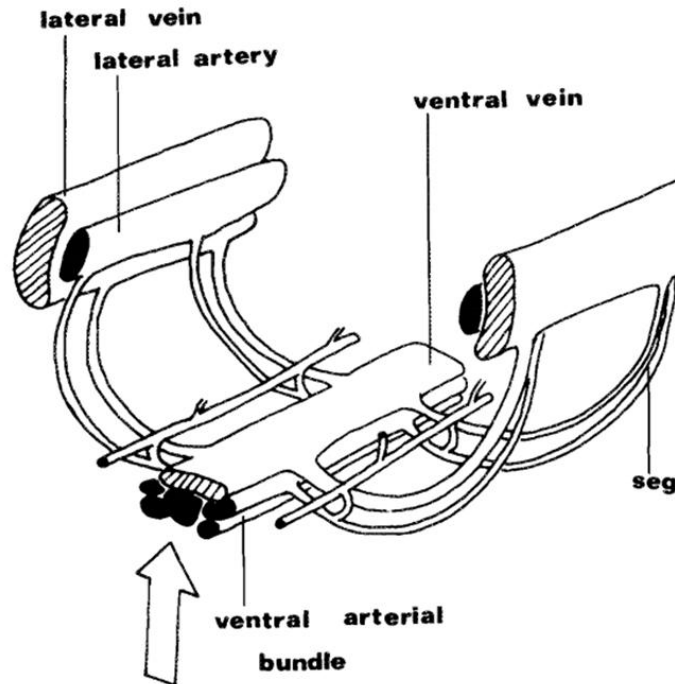


Figura 2: Anatomia dos vasos da cauda de ratos (YOUNG; DAWSON, 1982)

Além do controle autonômico, as respostas comportamentais também são importantes para a manutenção da temperatura interna. Como exemplo, o aumento da produção de saliva seguido pelo seu espalhamento nos pêlos é um comportamento comum em roedores expostos ao ambiente aquecido, pois aumenta a perda de calor por evaporação (NAGASHIMA et al., 2000). Por outro lado, ratos expostos ao frio tendem a buscar por um ambiente com temperatura mais amena, se aglomerar com os outros animais da caixa ou deitar sobre a cauda para diminuir a perda de calor (UCHIDA et al., 2012).

Dessa forma, a ação integrada dos efetores autonômicos e comportamentais é fundamental para impedir grandes variações de temperatura interna e garantir a sobrevivência em condições adversas de temperatura ambiente.

1.2 Hormônios ovarianos e termorregulação

Os hormônios ovarianos possuem um amplo espectro de ação no organismo, atuando não só na função reprodutiva, como também em vários outros sistemas, por exemplo, no sistema cardiovascular, renal e neural (CHARKOUDIAN et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2014). Os principais hormônios ovarianos são os estrogênios e a progesterona, cujos níveis flutuam de acordo com a fase do ciclo menstrual, uso

de contraceptivo oral, gravidez e menopausa. No contexto da termorregulação, alguns estudos mostram a importância desses hormônios na manutenção da temperatura interna (CHARKOUDIAN; STACHENFELD, 2014), de tal maneira que estas flutuações impactam diretamente a temperatura (CHARKOUDIAN; STACHENFELD, 2014; DACKS; KRAJEWSKI; RANCE, 2011).

As ações dos estrogênios são desencadeadas pela ligação desses hormônios aos seus receptores, podendo ser nucleares como o alfa e o beta (ER- α e ER- β) ou de membrana acoplado à proteína G (GPER) (SAMPLE et al., 2012). No controle térmico, os estrogênios são descritos como responsáveis por promover vasodilatação cutânea, que tem como consequência o aumento da dissipação de calor e a redução da temperatura interna (CHARKOUDIAN; STACHENFELD, 2014).

A progesterona é um hormônio envolvido no crescimento e diferenciação celular durante o ciclo reprodutivo e na gravidez (GRIMM; HARTIG; EDWARDS, 2016). Participa do controle da temperatura interna por induzir, na maioria das vezes, respostas contrárias às acionadas pelos estrogênios (CHARKOUDIAN; STACHENFELD, 2014).

A relação dos hormônios sexuais com o tônus vasomotor também já foi demonstrada em roedores. Em um estudo realizado *in vitro*, Li e colaboradores (1997) mostraram que a redução dos hormônios ovarianos devido à castração aumentou a vasoconstrição da artéria da cauda em resposta à noradrenalina quando comparada às ratas intactas (LI et al., 1997). Além disso, Riedel e colaboradores (2019) avaliaram o efeito dos hormônios sexuais masculinos e femininos sobre o tônus vasomotor de roedores e mostraram que houve maior relaxamento em diferentes leitos vasculares das ratas. Essa resposta foi atribuída aos estrogênios, e não à progesterona. (RIEDEL et al., 2019).

Em humanos, as alterações vasomotoras (como as presentes na menopausa) também estão associadas à deficiência de um hormônio estrogênico, o estradiol (E2) (17- β -estradiol) (DACKS; RANCE, 2010). Silvia e Boulant (1986) demonstraram em experimentos *in vitro* que o E2 é capaz de estimular neurônios sensíveis ao calor na APO (SILVA; BOULANT, 1986). Além disso, um estudo mais recente investigou a ação desse hormônio em diferentes regiões cerebrais envolvidas no controle de temperatura e constatou relevante modulação do E2 sobre o núcleo pré-óptico mediano, região descrita como importante para a vasodilatação (CHARKOUDIAN; STACHENFELD, 2014; DACKS; KRAJEWSKI; RANCE, 2011).

Apesar de muitos estudos investigarem a participação do E2 sobre regiões centrais envolvidas no controle de temperatura, pouco se sabe a respeito da contribuição desse hormônio sobre a dissipação de calor a nível periférico, que foi a principal a linha de investigação deste trabalho.

1.3 Moléculas envolvidas no tônus vasomotor cutâneo

Vários fatores são importantes para o relaxamento do vaso, como moléculas com ação vasodilatadora, neurotransmissores, alguns canais e receptores, como mostrado na figura 3 (FRANCISCO; MINSON, 2018; OZKOR; QUYYUMI, 2011). O canal Receptor Potencial Transiente Vanilóide tipo 1 (canal TRPV1) e o óxido nítrico (NO) são dois alvos importantes que podem estar envolvidos no processo de dissipação de calor.

Alguns estudos relacionam os canais vanilóides ao controle do tônus vascular (BRATZ et al., 2008). Além disso, a presença do canal TRPV1 no endotélio vascular (PHAN et al., 2020) levanta a hipótese de que esse canal possa contribuir para a eficiência da dissipação de calor.

O óxido nítrico (NO) é um gás produzido a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Sua formação ocorre nas células endoteliais e, em seguida, essa molécula migra para a musculatura lisa do vaso, estimulando a enzima guanilato ciclase solúvel a aumentar a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Esse processo reduz o cálcio intracelular e promove o relaxamento da musculatura lisa vascular (ROBBINS; GRISHAM, 1997). Alguns estudos mostraram que o E2 aumenta a produção de NO em alguns leitos vasculares, como na artéria aorta (DARBLADE et al., 2002), artéria pulmonar e torácica (GONZALES; WALKER; KANAGY, 2001), artérias coronárias e mesentérica (OTTER; AUSTIN, 1998). Por esse motivo, a investigação dessa regulação na artéria da cauda torna-se importante para elucidar o mecanismo acionado por esse hormônio nesta região.

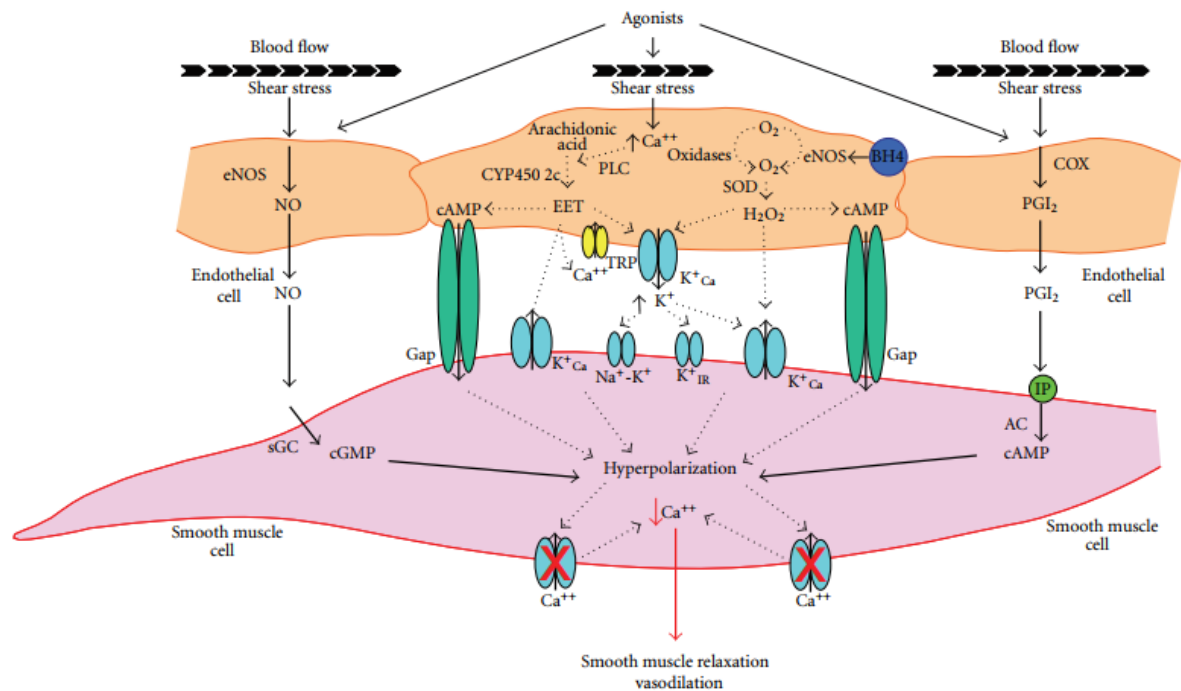


Figura 3: Mecanismos envolvidos no relaxamento do endotélio (OZKOR; QUYYUMI, 2011).

Além da possível participação do canal TRPV1 e NO na dissipação de calor, deve-se lembrar que o tônus vasomotor cutâneo é controlado pelo sistema nervoso autonômico simpático através da liberação de catecolaminas (NAKAMURA, 2011; ROMANOVSKY et al., 2009). A enzima tirosina hidroxilase (TH) é a enzima limitante da biossíntese, tendo como substrato o aminoácido tirosina (GORIDIS; ROHRER, 2002). Por esse motivo, a análise da expressão dessa enzima pode ser um indicativo de como está a ativação simpática na presença do E2. É importante ressaltar que o acionamento de mecanismos de vasodilatação tem como consequência o aumento do fluxo sanguíneo da pele para permitir a perda de calor para o ambiente (DACKS; RANCE, 2010). Por esse motivo, esse também foi um parâmetro muito importante avaliado no nosso trabalho.

Com base nessas informações, investigamos se o efeito do E2 sobre os mecanismos periféricos de dissipação de calor envolve: (i) a regulação do canal TRPV1, (ii) a modulação do tônus simpático pela enzima TH e (iii) a participação do agente vasodilatador, NO.

1.4 Canal TRPV1 e termorregulação

Os Canais Receptores Potencial Transiente (TRP) compõem um conjunto de proteínas que são divididas em 6 subfamílias em mamíferos (ROMANOVSKY et al., 2009). Estruturalmente, são formados por 4 subunidades idênticas, com 6 domínios transmembrânicos cada uma, e um poro que permite a passagem de cátions quando são ativados (POLETINI et al., 2015; TAKAHASHI; KOZAI; MORI, 2012), conforme ilustrado na figura 4.

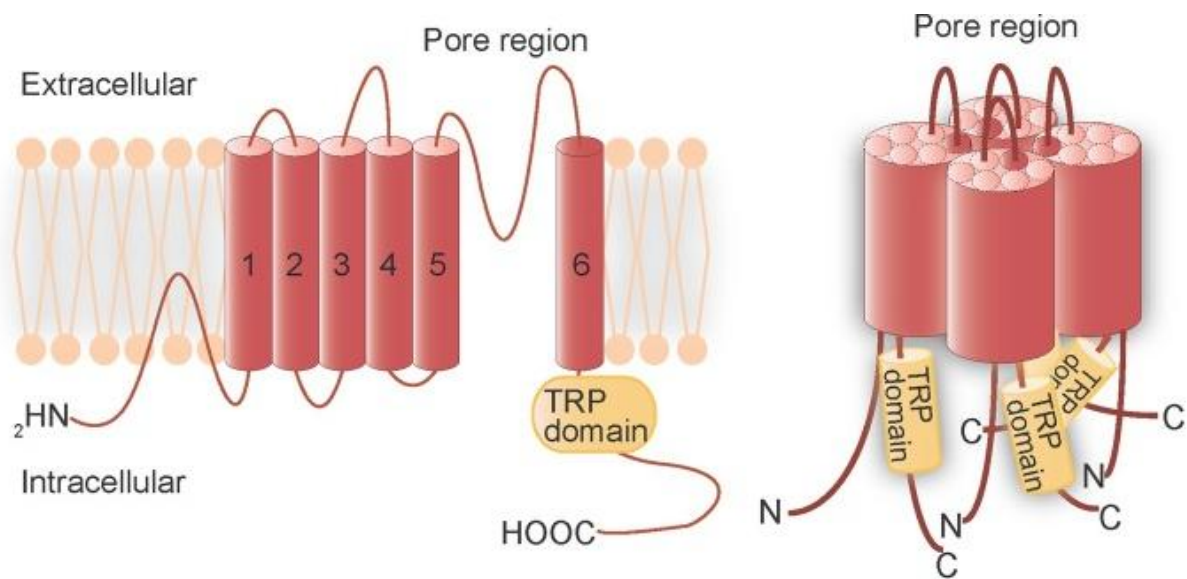


Figura 4: Estrutura do canal TRP (TAKAHASHI; KOZAI; MORI, 2012).

Alguns canais TRPs são sensíveis à temperatura, sendo conhecidos como canais termo-TRPs. São ativados em faixas de temperatura específicas, que variam do frio ao calor nocivo. Essa característica faz com que esses canais sejam importantes para a percepção térmica em tecidos periféricos (ROMANOVSKY et al., 2009).

Um canal TRP bastante estudado é o canal TRPV1, também conhecido como receptor vanilóide ou de capsaicina (CATERINA, 2007; MILLS et al., 2008; RAMSEY; DELLING; CLAPHAM, 2006). Trata-se de um canal de cátions não seletivo, com elevada permeabilidade aos íons cálcio (MILLS et al., 2008). São ativados por calor, prótons, capsaicina, resiniferaxotina (RTX), baixo pH e vanilóides endógenos (CATERINA, 2007; MILLS et al., 2008; RAMSEY; DELLING; CLAPHAM, 2006; STEINER et al., 2007). Apesar da elevada temperatura de ativação do canal TRPV1 *in vitro*, a presença de moléculas endógenas reduz esse limiar *in vivo*,

tornando-o tonicamente ativo. Sua ativação tônica garante valores menores de temperatura interna, de tal maneira que a perda desta ativação leva à hipertermia (CATERINA, 2007; MILLS et al., 2008; ROMANOVSKY et al., 2009).

O canal TRPV1 é encontrado em vários tecidos, como fibras mielinizadas A δ , não mielinizadas tipo C (que são responsáveis pela percepção de dor e calor), DRG, gânglio trigêmeo e em regiões não neuronais (BEVAN; QUALLO; ANDERSSON, 2014; CATERINA, 2007; ROMANOVSKY et al., 2009). A APO é uma das principais regiões envolvidas na termorregulação, na qual o canal TRPV1 tem sido proposto como responsável por controlar a temperatura em mamíferos (CATERINA, 2007; MILLS et al., 2008). São propostos alguns mecanismos pelos quais o canal TRPV1 participa dessa homeostase térmica, tais como: *i*) ativação do canal TRPV1 em fibras sensíveis ao calor presentes na pele e órgãos que são transmitidas a regiões centrais, *ii*) ativação do canal TRPV1 em terminais pré-sinápticos que acionam neurônios sensíveis ao calor e inibem neurônios sensíveis ao frio na APO, *iii*) ativação direta do canal TRPV1 em neurônios sensíveis ao calor (CATERINA, 2007).

O isolamento de substâncias que ativam ou inibem o canal TRPV1 possibilitou grandes avanços na compreensão desse canal na termorregulação. A capsaicina, substância pungente da pimenta, é o principal agonista estudado. Outro importante ativador é a resiniferatoxina (RTX), um análogo ultra-potente da capsaicina, obtida da planta *Euphorbia* (DOGAN et al., 2004; ROMANOVSKY et al., 2009). Estudos mostraram que o tratamento com capsaicina ou RTX, ambos agonistas do canal TRPV1, provocam uma redução na temperatura interna em várias espécies, sugerindo a participação desse canal no controle da temperatura interna (MILLS et al., 2008). A dessensibilização é outra estratégia farmacológica muito utilizada para melhor compreensão desses canais (ROMANOVSKY et al., 2009). Em elevadas doses ou devido a uma exposição contínua e repetitiva, os agonistas promovem a dessensibilização do canal TRPV1, que é a inativação do canal devido à sua mudança conformacional (RANG, 2008; ROMANOVSKY et al., 2009). Quando isso ocorre, o canal TRPV1 não responde à ação de agonistas (MILLS et al., 2008; ROMANOVSKY et al., 2009). Mills e colaboradores (2008) observaram que ratos dessensibilizados apresentam uma elevação nociva da temperatura interna quando expostos ao ambiente aquecido, enquanto os animais do grupo controle mantiveram essa temperatura interna dentro da normalidade na mesma condição de calor (MILLS et al., 2008). Além disso, variações da temperatura induzidas por capsaicina

não são observadas em camundongos *knockout* para TRPV1, demonstrando mais uma vez o envolvimento dos mesmos no controle da temperatura interna (CATERINA et al., 2000). Outros trabalhos corroboram a importância do canal TRPV1 para a termorregulação através da utilização de antagonistas que, em muitos casos, provocam hipertermia por bloquear a ativação do canal por prótons (GARAMI et al., 2010; GAVVA et al., 2007). É importante ressaltar que algumas respostas termorregulatórias acionadas pelos antagonistas do canal TRPV1 podem ser diferentes entre machos e fêmeas, incluindo respostas comportamentais (GARAMI et al., 2020).

Apesar de renomados estudos mostrarem a participação do canal TRPV1 na termorregulação, pouco se sabe a respeito da influência desse canal sobre a temperatura interna e dissipação de calor periférico em fêmeas.

A relação entre E2 e canal TRPV1 já foi demonstrada em neurônios sensoriais, uma vez que esse hormônio foi capaz de reduzir o limiar de ativação do canal TRPV1 em resposta à dor provocada por estímulo mecânico e térmico, além de aumentar a expressão gênica do canal nesse tecido (PAYRITS et al., 2017). A modulação da expressão do canal TRPV1 pelo E2 também já foi observada em outras regiões do sistema nervoso central (RAMÍREZ-BARRANTES et al., 2020). Um estudo realizado *in vitro*, mostrou o aumento da corrente de cálcio induzida por diferentes concentrações de capsaicina na presença de E2 em uma linhagem celular imortalizada (RAMÍREZ-BARRANTES et al., 2020).

Dessa forma, neste trabalho, avaliamos se o canal TRPV1 participa da dissipação periférica de calor e se o E2 mantém os mecanismos de dissipação já conhecidos através da modulação da TH e produção de NO.

2 JUSTIFICATIVA

A manutenção da temperatura interna é fundamental para a sobrevivência dos seres vivos, garantindo o bom funcionamento das funções celulares. No entanto, algumas situações fisiológicas, como a menopausa (cujo principal sintoma são as ondas de calor) e patológicas (como a febre causada por um agente infeccioso), podem levar o indivíduo a uma desordem térmica, que varia desde desconfortos a quadros graves de colocam em risco a saúde.

Apesar de muitos trabalhos mostrarem claramente o efeito do E2 em controlar a temperatura interna, principalmente por agir em núcleos centrais, pouco se sabe a respeito da ação desse hormônio a nível periférico. Além disso, muitos estudos mostram a importância do canal TRPV1 para manutenção térmica, mas a contribuição desse canal em fêmeas ainda é pouco elucidado.

Dessa forma, o presente estudo buscou relacionar esses dois importantes fatores envolvidos na termorregulação para a melhor compreensão de um possível mecanismo que justifique a homeostase térmica em mulheres, abrindo novas oportunidades terapêuticas para o tratamento de condições que envolvem alterações de temperatura.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do E2 e do canal TRPV1 sobre o fluxo sanguíneo da cauda e tônus vasomotor cutâneo em ratas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Identificar receptores de estrógeno (ER) na artéria da cauda;

3.2.2 Avaliar o efeito do E2 sobre o fluxo sanguíneo da artéria da cauda;

3.2.3 Avaliar o efeito do E2 sobre a expressão da enzima TH e TH fosforilada (pTH) na artéria da cauda;

3.2.4 Avaliar o efeito do E2 sobre o conteúdo de NO na artéria da cauda;

3.2.5 Avaliar o efeito do E2 sobre a expressão dos seguintes alvos no DRG: ER- α , TH/pTH, canal TRPV1 e PKC ϵ ;

3.2.6 Avaliar o efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre o fluxo sanguíneo da cauda de ratas tratadas com E2;

3.2.7 Avaliar o efeito da ativação do canal TRPV1 sobre a $T_{\text{abdominal}}$ na presença e ausência dos hormônios ovarianos;

3.2.8 Avaliar o efeito da ativação do canal TRPV1 sobre a expressão da enzima TH e pTH na artéria da cauda na presença e ausência dos hormônios ovarianos;

3.2.9 Avaliar o efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre a $T_{\text{abdominal}}$ e da cauda de ratas ovariectomizadas durante a exposição ao calor;

3.2.10 Avaliar o efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre o limiar e sensibilidade de dissipação de calor em ratas ovariectomizadas;

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizadas ratas adultas da linhagem *Wistar*, com 3 meses de idade e peso aproximado de 250 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Os animais foram mantidos sob um ciclo de luz e escuridão de 12/12 horas à temperatura ambiente (24 ± 2 °C) com livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), protocolo de número 99/2018. A eutanásia ocorreu por decapitação e, em seguida, os tecidos foram removidos. Os experimentos de exposição ao calor e a retirada de tecidos foram realizados entre 12:00 e 14:00 horas.

4.2 Delineamentos experimentais

4.2.1 Identificação dos receptores de estrógeno (ER) na artéria da cauda

Ratas intactas foram eutanasiadas e o útero e a artéria da cauda foram removidos e colocados imediatamente na solução de lise para a extração das proteínas por *western blotting*. O útero foi utilizado como controle positivo para identificação dos ER (PRESS et al., 1986a).

4.2.2 Avaliação do efeito do E2 sobre o fluxo sanguíneo da cauda

Ratas foram ovariectomizadas (dia 0) e, após 7 dias, receberam um implante (s.c.) de silicone (*SILASTIC* 1,02 x 2,16 x 0,2 mm) de 2,0 cm de comprimento preenchido com óleo de milho (grupo controle, OVX + Óleo) ou com 17- β -estradiol (180 μ g/mL - E2, OVX + E2). Após 14 dias da inserção dos implantes (dia 21), o fluxo sanguíneo da cauda foi avaliado pela técnica *Doppler*. A figura 5 ilustra esse delineamento.

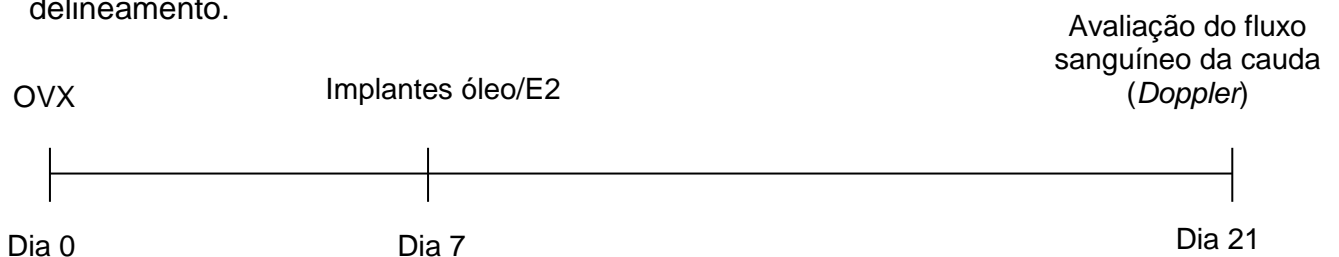


Figura 5: Linha do tempo referente ao delineamento experimental 4.2.2.

4.2.3 Avaliação do efeito do E2 sobre a expressão das enzimas TH e TH fosforilada (pTH) na artéria da cauda

Seguindo o mesmo delineamento descrito na figura 5, ratas dos grupos OVX + Óleo e OVX + E2 foram eutanasiadas no dia 21 para remoção da artéria da cauda e posterior análise das enzimas TH e pTH por *western blotting*.

4.2.4 Avaliação do efeito do E2 sobre a produção de NO na artéria da cauda

Seguindo o mesmo delineamento descrito na figura 5, ratas dos grupos OVX + Óleo e OVX + E2 foram eutanasiadas no dia 21 para remoção da artéria da cauda e posterior quantificação do NO através da marcação de fluorescência pelo DAF (diacetato de 4,5- diaminofluoresceína).

4.2.5 Avaliação do efeito do E2 sobre a expressão de ER- α , TH/pTH, canal TRPV1/pTRPV1 e da PKC ϵ /pPKC ϵ no DRG

Seguindo o mesmo delineamento descrito na figura 5, avaliamos se o tratamento com E2 interfere na expressão das proteínas ER- α , TH/pTH, e TRPV1/pTRPV1 no DRG. Outro conjunto de ratas dos grupos OVX + Óleo e OVX + E2 foram eutanasiadas no dia 21 para remoção dos DRG's e posterior análise das proteínas por *western blotting*. O RNAm do canal TRPV1 também foi avaliado nesse delineamento, utilizando outro grupo de animais.

4.2.6 Avaliação do papel do canal TRPV1 sobre o fluxo sanguíneo da cauda de ratas tratadas com E2

Ratas foram ovariectomizadas (dia 0) e, após 7 dias, receberam implantes contendo E2. Nesse mesmo dia, o grupo controle recebeu a injeção de veículo (OVX + E2 - Veículo) e o grupo tratado recebeu injeção de RTX (OVX + E2 - RTX). Após uma semana (dia 14), foi avaliado o limiar nociceptivo para verificar a efetividade da dessensibilização do canal TRPV1. No 21º dia do protocolo, foi avaliado o fluxo sanguíneo da cauda, pela técnica *Doppler*. A figura 6 ilustra esse delineamento.

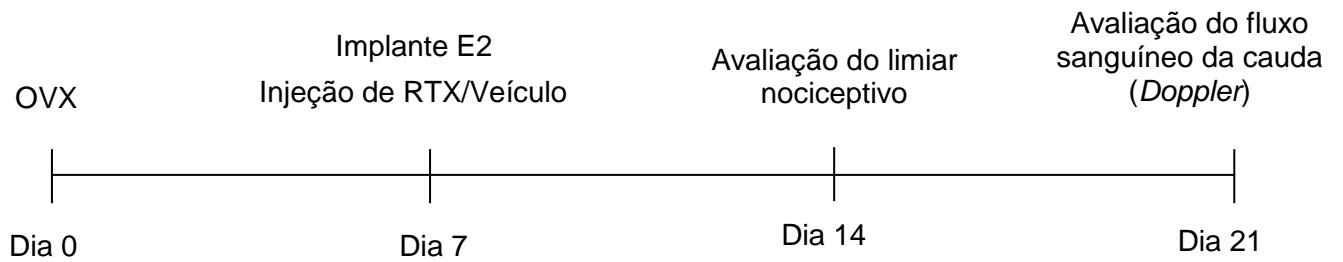


Figura 6: Linha do tempo referente ao delineamento experimental 4.2.6.

4.2.7 Avaliação do efeito os hormônios ovarianos sobre a ativação do canal TRPV1 e sobre a expressão da enzima TH

Ratas foram ovariectomizadas ou tiveram os ovários expostos (grupo SHAM) no dia 0. Após uma semana, todos os animais receberam um sensor de telemetria na cavidade abdominal e apenas o grupo de ratas ovariectomizadas recebeu um implante óleo (s.c.) (Dia 7). Após 14 dias (Dia 21), estes animais receberam a injeção i.p. do RTX na dose agonista (0,5 µg/kg, OVX + Óleo - RTX) e o grupo controle recebeu veículo (OVX + Óleo - Veículo). Os animais do grupo SHAM também receberam essas injeções (SHAM - RTX e SHAM - Veículo). Com o objetivo de monitorar a $T_{\text{abdominal}}$, os animais foram mantidos sobre placas de telemetria até o momento da eutanásia, que ocorreu após 30 minutos para um conjunto de animais de cada grupo e aos 120 minutos em outro conjunto. Em seguida, a artéria da cauda foi removida para avaliar a expressão proteica das enzimas TH e pTH. A figura 7 mostra esse delineamento.

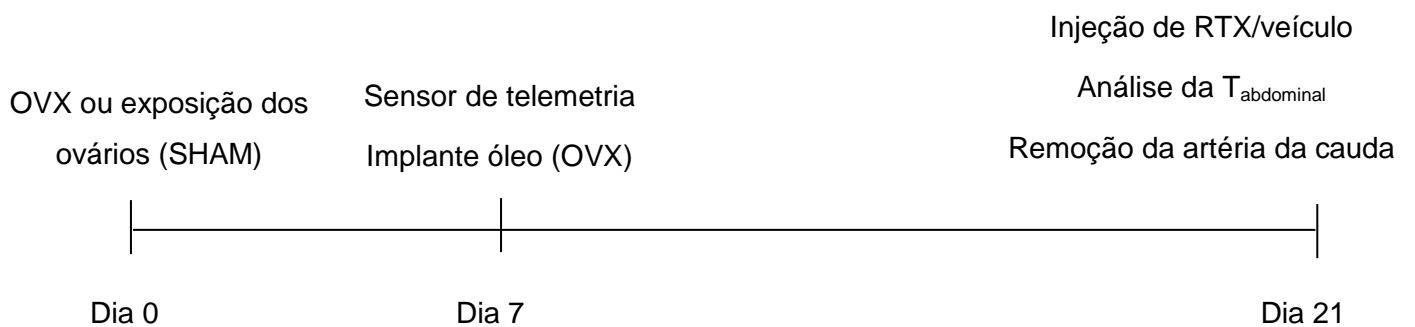


Figura 7: Linha do tempo referente ao delineamento experimental 4.2.7.

4.2.8 Avaliar efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre a termorregulação em ratas ovariectomizadas

Ratas foram submetidas ao procedimento cirúrgico de ovariectomia (dia 0), e após 7 dias, foi inserido um implante contendo óleo. Nesse mesmo dia, um grupo recebeu a injeção do RTX para dessensibilização do canal TRPV1 da região abdominal (20 µg/kg, OVX + Óleo - RTX) e outro grupo recebeu a injeção do veículo (OVX + Óleo – Veículo). Em seguida, foi inserido um sensor de telemetria na cavidade abdominal de todos os animais. Após uma semana (dia 14), foi avaliado o limiar nociceptivo para comprovar a eficiência da dessensibilização. Nos próximos 5 dias (dia 16 ao dia 20) foi realizada a habituação ao termômetro da cauda. No 21º dia do protocolo, as ratas foram expostas ao ambiente aquecido de 34 °C durante 40 minutos para avaliar as variações de $T_{\text{abdominal}}$ e T_{cauda} . A figura 8 ilustra esse delineamento.

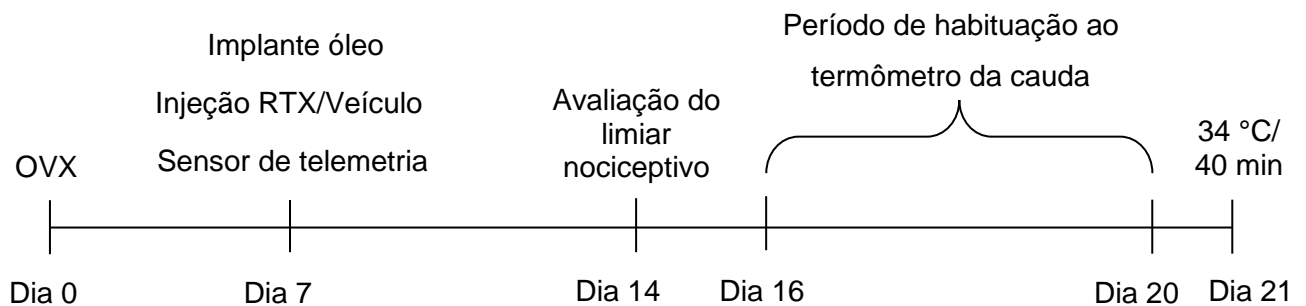


Figura 8: Linha do tempo referente ao delineamento experimental 4.2.8.

4.3 Anestésicos e diluição de drogas

Os procedimentos cirúrgicos de ovariectomia, inserção dos implantes contendo óleo de milho ou E2, sensor de telemetria, injeção de RTX para promover dessensibilização do canal TRPV1 da região abdominal e medida do fluxo sanguíneo da cauda foram realizados sob anestesia composta por ketamina (80 mg/Kg, i.p.) e xilazina (10 mg/Kg i.p.). Após as cirurgias, os animais receberam tratamento profilático com pentabiótico (240000 UI das penicilinas, 100 mg de estreptomicina e diidroestreptomicina) via intramuscular (i.m.) em cada pata traseira e uma injeção (s.c.) na dose de 1 mg/kg de peso corporal do analgésico e anti-inflamatório Flunixinina meglumina (Banamine®, 50 mg/ml, Schering-Plough).

A preparação da solução estoque de RTX (Sigma-Aldrich) foi feita através da diluição de 1 mg do RTX em 10 mL de álcool etílico absoluto, obtendo uma concentração final de 100 µg/mL. Esta solução foi armazenada no freezer - 80 °C ao abrigo de luz. No dia do experimento essa solução estoque foi novamente diluída em salina estéril para se obter a concentração desejada para injeção, de acordo com o protocolo experimental. O grupo veículo recebeu injeção de álcool absoluto diluído em salina estéril.

4.4 Ovariectomia

As ratas foram anestesiadas com uma mistura de ketamina e xilazina (i.p.) e um pequeno corte bilateral foi feito na pele e no músculo para expor os ovários. Nas ratas ovariectomizadas, os ovários foram removidos (OVX), levando a uma deficiência dos hormônios produzidos por esse órgão. No grupo SHAM, os ovários foram expostos e, em seguida, internalizados. A pele foi suturada com agulha e linha de algodão. Para finalizar, os animais receberam injeção profilática de pentabiótico (i.m.) e anti-inflamatório (s.c.).

4.5 Remoção do DRG e artéria da cauda

Após a eutanásia, os DRG's da região lombar e a artéria da cauda foram retirados e colocados imediatamente no nitrogênio líquido. Em seguida, foram guardados em freezer - 80 °C para posterior análise. Os experimentos destinados à expressão proteica foram realizados de forma independente dos experimentos de expressão gênica, ou seja, foram utilizados grupos de animais diferentes. Para ambas as técnicas, foram coletados de 8 a 10 gânglios de cada animal, sendo essa quantidade colocada em um único tubo, que fornece a quantidade suficiente de proteína ou RNA. O tamanho da artéria da cauda retirada de cada animal variou de 2 a 3 cm de comprimento, também fornecendo a quantidade necessária de proteínas para o *western blotting*.

4.6 Ativação do canal TRPV1

Animais receberam a injeção do RTX na dose 0,5 µg/kg (i.p.) para promover a ativação do canal TRPV1 (STEINER et al., 2007). O grupo veículo recebeu injeção de álcool etílico a 0,5% em salina estéril (i.p.).

4.7 Dessensibilização do canal TRPV1

Os animais foram anestesiados com uma solução composta por ketamina e xilazina e, em seguida, o RTX foi preparado e injetado na dose 20 µg/kg (i.p.) em um grupo de animais. O grupo veículo recebeu uma injeção de álcool etílico a 20% em salina estéril (i.p.). Estudos mostraram que a dose administrada é a mínima necessária para causar a dessensibilização do canal TRPV1 da cavidade abdominal (DOGAN et al., 2004; STEINER et al., 2007).

4.8 Avaliação do limiar nociceptivo

A eficiência da dessensibilização do canal TRPV1 foi comprovada pelo limiar nociceptivo através de um analgesímetro (modelo 7200 Ugo Basile, Italy) após 7 dias das injeções de RTX/Veículo. Uma força foi aplicada à pata traseira direita do animal por um cone de ponta arredondada, que não causa danos ao animal. A pressão foi medida por uma escala calibrada de 20 gramas por centímetro. A intensidade que causou a retirada da pata foi definida como limiar nociceptivo, sendo determinada pela média de três aferições consecutivas.

4.9 Implante do sensor e registro da $T_{\text{abdominal}}$

A $T_{\text{abdominal}}$ foi registrada continuamente pelo sensor de telemetria, utilizando o *Vital View Software (VitalView® Data Acquisition System, Software version 4.0)*. Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina e cada animal recebeu um sensor de telemetria (modelo G2 *E-Mitter, Starr Life Sciences, Oakmont, PA, USA*) na cavidade abdominal através de uma pequena abertura feita na pele e no músculo, que foram suturados em seguida. Ao término da cirurgia, os animais receberam uma injeção profilática de pentabiótico e anti-inflamatório. Cada caixa individual contendo o animal foi posicionada sobre uma placa receptora (ER-4000 *Energizer/Receiver, Starr Life Sciences, Oakmont, PA, USA*) conectada a um computador que contém o *software* de aquisição de dados. Os registros da $T_{\text{abdominal}}$ iniciaram assim que os animais se recuperaram da cirurgia e foram colocados sobre os receptores.

4.10 Habituação e aquecimento dos animais

A habituação ao termômetro da cauda consistiu em colocar os animais em uma gaiola acrílica individual com um termômetro de precisão preso à cauda por uma fita, por 40 minutos, durante os 5 dias que antecedem o aquecimento. Esse procedimento é de extrema importância para evitar possíveis alterações autonômicas no dia do aquecimento, como a vasoconstrição devido ao estresse da manipulação.

O protocolo de aquecimento consistiu em expor as ratas a um ambiente aquecido a 34 °C por 40 minutos. Para isso, a mesma caixa acrílica em que elas foram habituadas foi colocada sobre a placa receptora com uma sonda de temperatura (modelo 409 – *Reusable Temperature Probe skin*, Yellow Springs Instruments, OH, EUA) fixada no centro da parede da caixa e conectada a um termômetro de precisão (modelo 4,600 *Precision Thermometer*, Yellow Spring Instruments, OH, EUA) para registro da T_{ambiente} . O aquecimento foi promovido por dois aquecedores portáteis (*Ceramic Fan Heater – 1500W – Onix Smart Choice*, AUS) posicionados em cada extremidade da caixa. Após essa preparação, outra sonda de temperatura, com as mesmas especificações acima, foi inserida a 1 cm da base da cauda do animal. No momento em que a temperatura do interior da caixa atingiu 34 °C, as ratas foram colocadas em seu interior, com livre movimentação. O controle da temperatura foi feito manualmente durante os 40 minutos, com a temperatura ambiente permanecendo em $34^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. A $T_{\text{abdominal}}$ e T_{cauda} foram anotadas a cada minuto. Foram aquecidos apenas 2 animais por dia, sendo um de cada vez.

4.11 Avaliação da função vasomotora

O fluxo sanguíneo foi avaliado pela técnica de perfusão de imagem não invasiva *Laser Doppler*. Após completo estado de anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma manta térmica a 37 °C. Imagens da intensidade de fluxo foram obtidas no modo *ImageScan*, em leitura a 50 ms/px e após normalização padrão pela intensidade de luz detectada (DC). Regiões de interesse (ROI) foram traçadas para toda a área da cauda e o fluxo médio foi obtido em unidades de perfusão (UP). O fluxo sanguíneo em pontos específicos da cauda foi obtido no modo de medição de ponto único por 5 minutos (P1, P2 e P3), sendo

que P1 localiza-se na base da cauda e os outros 2 pontos, a uma distância equivalente a 128 e 256 pixels, respectivamente. Todos os pontos estavam localizados na linha mediana da cauda. Toda a quantificação foi feita utilizando o *software* MoorLDI V5.0. O experimento foi realizado à temperatura ambiente de aproximadamente 31 °C.

4.12 Avaliação da produção de NO na artéria da cauda

A artéria da cauda foi coberta com a solução *Optimal Cutting Temperature* (OCT) (*Tissue Tek*®, USA) e armazenada em freezer - 80 °C. Foram feitos cortes transversais de 10 µm utilizando criostato (*Leica*, Alemanha) e as fatias foram colocadas em lâminas de vidro polarizadas (*Star Frost*, Alemanha). As lâminas foram incubadas com PBS a 37 °C durante 15 minutos em câmara protegida da luz. Em seguida, foram incubadas com 150 µL do marcador de NO DAF-FM (diacetato de 4,5-diaminofluoresceína) durante 30 minutos, a 37 °C, em câmara escura. Logo após, as lâminas foram lavadas com PBS e fixadas com PFA 4% durante 5 minutos. Uma nova lavagem com PBS foi realizada e, em seguida, as lâminas foram fixadas com glicerol e lamínula. As imagens foram capturadas através de um microscópio de fluorescência (*Apotome Zeiss LSM 880*) situado no Centro de Aquisição de Processamento de Imagem (CAPI/ICB/UFMG). A camada média do vaso foi analisada pelo programa *ImageJ*.

4.13 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

4.13.1 - Extração do RNA e tratamento com DNase

Os DRG's da região lombar foram removidos e homogeneizados em 700 µL de TRIzol (Invitrogen, E.U.A.). Adicionou-se 200 µL de BCP (1-bromo-cloropropano) seguido de agitação vigorosa por 15 segundos, e repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, 4 °C durante 15 minutos. A fase aquosa superior foi transferida para outro tubo, onde foram adicionados 650 µL de isopropanol 100% para precipitação do RNA. As amostras permaneceram à temperatura ambiente por mais 10 minutos. Foi realizada uma nova centrifugação, nas mesmas condições da primeira, durante 35 minutos. Os gânglios foram mantidos *overnight* para maior precipitação do RNA. Em seguida, foram adicionados 1,3 mL de etanol 75%, agitou-se e centrifugou durante 15 minutos

(12000 rpm, 4 °C). Essa etapa foi realizada duas vezes. As amostras foram armazenadas em freezer - 80 °C para posterior uso.

No dia da continuação do procedimento, as amostras foram retiradas do freezer e centrifugadas imediatamente (12.000 rpm, 4 °C) durante 35 minutos, para precipitar novamente o RNA que poderia estar suspenso no etanol. Logo após, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados em posição invertida em um lenço de papel para secagem do *pellet*. O RNA foi ressuspendido em 8 µL de água DEPC (*Life Technologies*, EUA). As amostras foram tratadas utilizando o Kit turbo-DNA-free™ (*Life Technologies*, EUA) com 10% do volume de Turbo DNase *buffer* e em seguida acrescentou-se 1 µL da Turbo DNase. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, acrescentou-se 3 µL do reagente de inativação da DNase. As amostras foram incubadas durante 2 minutos a temperatura ambiente e mantidas sob agitação durante todo esse tempo. Logo após, foram centrifugadas (12.000 rpm, 4 °C) durante 2 minutos para precipitar o reagente de inativação e o sobrenadante foi removido para um novo tubo. As amostras foram dosadas para determinar a concentração de RNA por absorbância em nano-espectrofotômetro (Nanodrop, EUA)

4.13.2 - Reação da transcriptase reversa e formação do cDNA

Nesta etapa, utilizou-se 1 µg de RNA. Além disso, foram adicionados os seguintes reagentes: 1 µL de *random primers* (33,3 ng/µL, *Life Technologies*), 1 µL de dNTP Mix (10 mM, *Life Technologies*) e água DEPC até completar volume total de 13,75 µL. Em seguida, as amostras foram agitadas delicadamente, centrifugadas em centrífuga de bancada e incubadas a 65 °C por 5 minutos e 1 minuto no gelo. Na etapa seguinte foi preparado um mix com 4 µL do tampão 5X PCR *buffer*, 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de inibidor de ribonuclease (40 U/ µL, *Life Technologies*) e 0,25 µL da enzima *Superscript III RT* (200 U/µL, *SuperScript™ III Reverse Transcriptase*, *Life Technologies*), finalizando o volume de 20 µL por reação. Em seguida, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos, 50 °C por 50 minutos e 70 °C por 15 minutos. O cDNA resultante foi armazenado em freezer a - 20 °C.

4.13.3 – Amplificação e quantificação do mRNA

Para a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) foi utilizado *iTaq™ universal SYBR® Green supermix* (*BioRad*, EUA). Os ensaios foram

realizados em um termociclador *Abi-Prism* (Life Technologies, EUA). O ciclo de temperatura consistiu em 1 ciclo a 95 °C por 30 segundos seguido por 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C e 30 segundos a 60 °C, com posterior análise da curva de *Melting*.

As análises foram feitas em duplicatas e o GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como normalizador.

A sequência dos *primers* específicos para os genes são: GAPDH (Forward: 5'-ACA GCC GCA TCT TCT TGT CG-3'; Reverse: 5' - GCC TCA CCC CAT TTG ATG TT-3') e TRPV1 (Forward: 5' – GTG GAC AGC TAC AGT GAG ATAC -3'; Reverse: 5' – CAC CAT GGA AGC CAC ATA CT – 3'). Os dados foram analisados pelo método $\Delta\Delta CT$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.14 *Western Blotting*

Os DRG's da região lombar e a artéria da cauda foram macerados durante 35 minutos (intercalando o período de maceração e repouso a cada 5 minutos) em 120 μ L de 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 (NaF 20 mM e Na₃VO₄ 1 mM). Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação (12 minutos, 8000 rpm, 4°C). Coletou-se o sobrenadante e armazenou em freezer - 80 °C para posterior uso. As proteínas foram quantificadas de acordo com o método descrito por Bradford (BRADFORD, 1976).

As proteínas (30 μ g) foram separadas em gel de poliacrilamida 10%, de acordo com o peso molecular. As corridas foram realizadas em voltagem fixa em 120 V durante 90 minutos. A transferência foi realizada pelo aparato de transferência *semi-dry* (BioRad), com voltagem fixa em 20 volts e tempo de transferência de 27 minutos. Em seguida, as membranas foram lavadas em 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 desnatado a 5% por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas *overnight*, a 4°C, com anticorpo primário diluído em solução de leite 1% em TBS-T. Os anticorpos utilizados estão descritos na tabela 1.

Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-T por 30 minutos (troca da solução a cada 10 minutos) e incubadas com o anticorpo secundário adequado, conjugado a peroxidase por 1 hora em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários também estão descritos na tabela 1. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T por 30 minutos (troca da solução a cada 10 minutos). As bandas foram detectadas por reação de quimioluminescência utilizando o reagente ECL Plus[®] e analisadas no programa Image Quant TL[®]. Foram utilizados o GAPDH e a expressão total da proteína como normalizadores da expressão proteica.

Tabela 1: Anticorpos utilizados no *Western Blotting*

Anticorpos primários	Diluição	Fonte	N° Catálogo	Marca
GAPDH	1:3000	<i>Mouse</i>	SC32233	Santa Cruz
TRPV1 total	1:1000	<i>Rabbit</i>	ACC030	Santa Cruz
pTRPV1(Ser800)	1:1000	<i>Rabbit</i>	PAB8499	AB Nova
PKCε total	1:500	<i>Rabbit</i>	AB124806	Abcam
pPKCε (Ser729)	1:500	<i>Rabbit</i>	AB63387	Abcam
TH total	1:1000	<i>Mouse</i>	SC25269	Santa Cruz
pTH (Ser40)	1:1000	<i>Rabbit</i>	AB5935	Sigma-Aldrich
ER-α	1:1000	<i>Rabbit</i>	AS409	-
ER-β	1:1000	<i>Rabbit</i>	AB3576	Abcam
GPER	1:1000	<i>Rabbit</i>	AB39742	Abcam
Anticorpos secundários	Diluição	Fonte	N° Catálogo	Marca
<i>anti-rabbit</i>	1:15000	<i>Rabbit</i>	A0545	Sigma-Aldrich
<i>anti-mouse</i>	1:15000	<i>Mouse</i>	A2554	Sigma-Aldrich

4.15 Cálculo do Limiar e Sensibilidade de dissipação de calor

- **Limiar de dissipação de calor**

O limiar de dissipação de calor representa o valor de $T_{\text{abdominal}}$ em que o animal começa a dissipar calor pela pele da cauda. Para estabelecer esse valor, foi necessário calcular a média da $T_{\text{abdominal}}$ e a média da T_{cauda} para cada grupo. A partir do valor mínimo da T_{cauda} nos 40 minutos (geralmente observado nos primeiros minutos), o primeiro valor em que houve diferença estatística (em relação ao valor

mínimo de T_{cauda}) foi considerado o momento em que deu início à dissipação de calor. A $T_{\text{abdominal}}$ correspondente a esse fenômeno foi utilizada para o cálculo do limiar (Adaptado de DRUMMOND et al., 2016).

- **Sensibilidade de dissipação de calor**

A sensibilidade da dissipação de calor foi calculada através de uma regressão linear dos 5 primeiros pontos após o aumento exponencial da T_{cauda} de cada animal. Foi considerado como aumento exponencial a elevação de 0,3 °C em relação à T_{cauda} inicial. Após identificar esse aumento, utilizou-se os próximos 5 valores de T_{cauda} e $T_{\text{abdominal}}$ para a construção da curva, de modo que o valor de sensibilidade é representado pelo coeficiente angular da equação (Adaptado de DRUMMOND et al., 2016).

4.16 Análise estatística

Os dados de $T_{\text{abdominal}}$ e T_{cauda} foram analisados pelo teste de variância de duas vias seguido pelo teste de *Tukey*. A média da $T_{\text{abdominal}}$ e T_{cauda} foram analisadas pelo teste de variância de duas vias seguido pelo teste de *Tukey* ou teste *t-Student*, conforme a situação experimental. Os seguintes parâmetros foram analisados pelo teste *t-Student*: peso do útero, peso corporal, expressão gênica e proteica dos alvos estudados, quantificação do óxido nítrico, limiar e sensibilidade de dissipação de calor foram analisados. O limiar nociceptivo foi avaliado teste de variância de uma via seguido pelo teste de *Dunnett*. O nível de significância foi de $p < 0,05$. O teste de normalidade utilizado foi Shapiro-Wilk. As análises foram realizadas no programa estatístico *GraphPadPrism* 5.0 (San Diego, CA, EUA) ou *Sigma Plot* versão 11.0 (San Jose, CA, EUA), conforme a situação experimental.

5 RESULTADOS

5.1 Validação do tratamento com E2

A efetividade do tratamento com E2 foi analisada por meio da comparação do peso uterino nos grupos OVX + Óleo e OVX + E2. Os resultados mostraram que o tratamento foi efetivo, uma vez que o peso do útero foi maior no OVX + E2 em relação ao grupo controle (OVX + Óleo), conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2: Peso do útero de ratas com implante óleo ou E2 após 14 dias de tratamento

Grupo	Peso útero (mg/100g p.c.)
OVX + Óleo	56,33 ± 3,63
OVX + E2	164,5 ± 10,81****

Os dados estão representados pela média ± EPM. ****, $p < 0,0001$ em relação ao grupo OVX + Óleo pelo teste *t-Student*

O peso corporal dos animais em cada etapa do protocolo experimental está demonstrado na tabela 3. Nota-se que as ratas OVX + Óleo ganharam mais peso ($\Delta = 23,6 \pm 6,58$ g) ao longo dos 14 dias de tratamento em relação às ratas tratadas com E2 ($\Delta = 5,6 \pm 4,81$ g), avaliadas nesse mesmo período.

Tabela 3: Peso corporal das ratas em cada etapa experimental.

Grupo	Peso no dia da OVX (g)	Peso no dia do implante (g)	Peso após 14 dias do implante (g)
OVX + Óleo	241,4 ± 4,78	248,9 ± 4,23	272,5 ± 5,03***
OVX + E2	237,3 ± 3,76	244,6 ± 3,06	250,2 ± 3,71

Os dados estão representados pela média ± EPM. ***, $p < 0,001$ em relação ao grupo OVX + Óleo pelo teste *t-Student*.

5.2 Identificação de ER na artéria da cauda

Investigou-se a presença de ER na artéria da cauda, um leito vascular muito importante para a dissipação de calor em roedores (GORDON, 1990) com o objetivo de avaliar a responsividade desse leito vascular ao E2.

De fato, foram encontrados receptores nucleares para E2 do tipo alfa e beta (ER- α e ER- β , respectivamente) e de membrana (GPER) na artéria da cauda (Figura 9). O útero foi utilizado como controle positivo para identificação desse alvo, uma vez

que sabidamente expressa todos os subtipos de receptores para E2 (PRESS et al., 1986b).

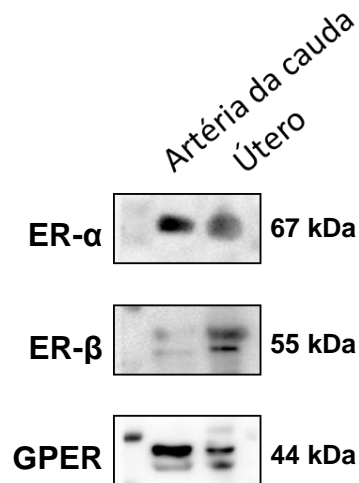


Figura 9: Subtipos de receptores de estrógenos presentes na artéria da cauda de ratas intactas. A artéria da cauda foi removida após a eutanásia dos animais e o *western blotting* foi realizado logo em seguida.

5.3 Efeito do tratamento com E2 sobre o fluxo sanguíneo da cauda

Ratas OVX + E2 apresentaram maior fluxo sanguíneo em relação ao grupo controle (OVX + Óleo), conforme demonstrado pela quantidade de pixels na figura 10 A e B representativa de uma rata de cada grupo. A medida do fluxo sanguíneo em três diferentes pontos da artéria da cauda (P1, P2 e P3, Figura 10 C) mostrou diferenças entre os grupos nos pontos P1 e P3 (Figura 10 B).

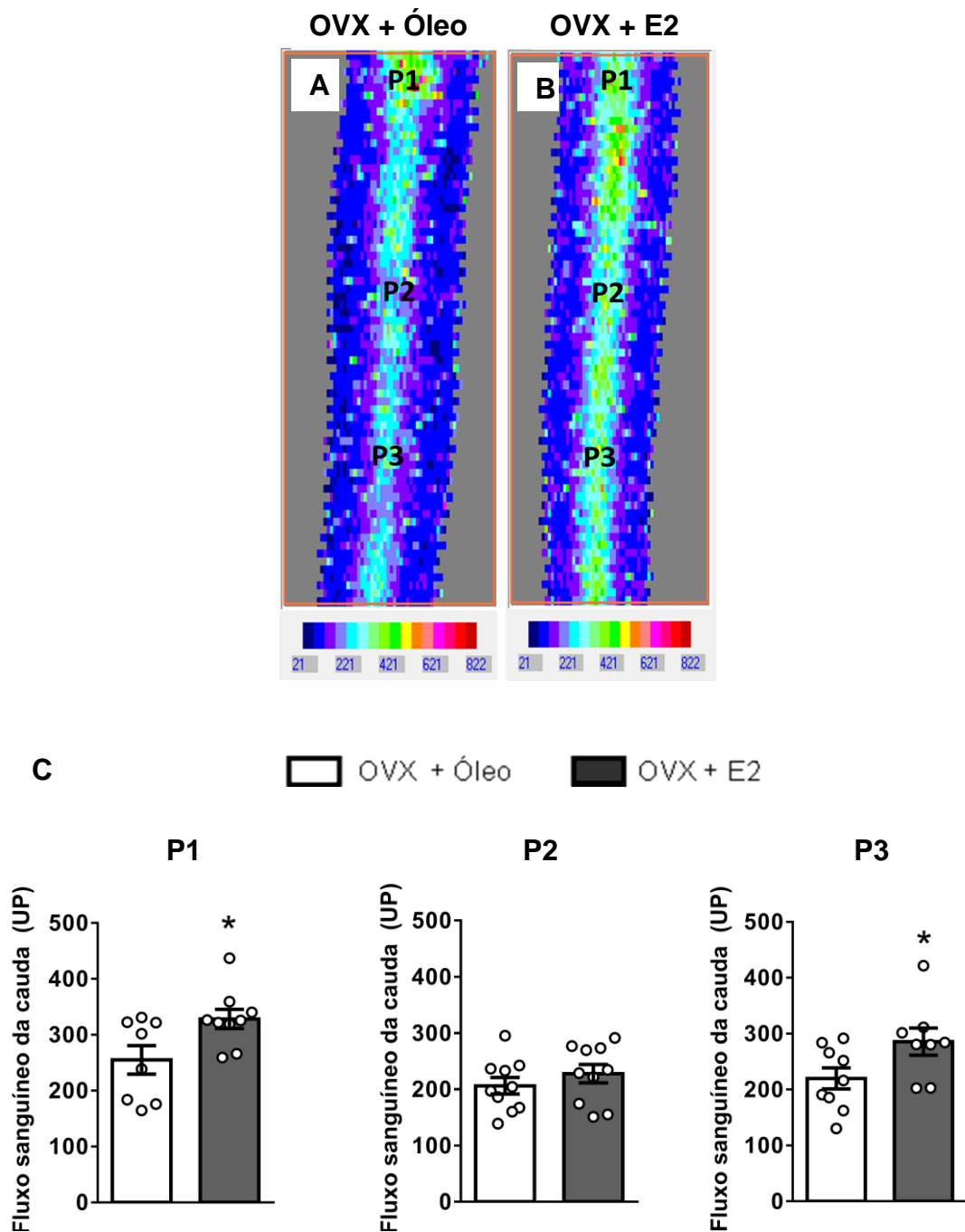


Figura 10: Avaliação do fluxo sanguíneo da artéria da cauda de ratas ovariectomizadas. **(A)** Imagem do fluxo sanguíneo de ratas com implante óleo. **(B)** Imagem do fluxo sanguíneo de ratas com implante E2. Cores frias representam menor fluxo sanguíneo. Cores quentes caracterizam maior fluxo sanguíneo. **(C)** Medição do fluxo sanguíneo durante 5 minutos em 3 regiões da artéria da cauda de ratas com implantes contendo óleo ou E2. Os dados estão apresentados pela média

\pm EPM. $n = 8-10$ animais por tratamento. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, pelo teste *t-Student*.

5.4 Efeito do tratamento com E2 sobre a enzima TH na artéria da cauda

Em seguida, investigou-se alguns alvos moleculares presentes na artéria da cauda que poderiam ser modulados pelo E2, que justifique seu efeito em garantir um fluxo sanguíneo aumentado.

O primeiro alvo avaliado foi a enzima TH, que participa da síntese de catecolaminas. As bandas da proteína (Figura 11 A) mostraram que o tratamento com E2 provocou uma redução da expressão proteica da TH fosforilada (pTH) (Figura 11 B) e da proteína total (TH) (Figura 11 C), o que pode sugerir uma redução do tônus simpático na artéria da cauda.

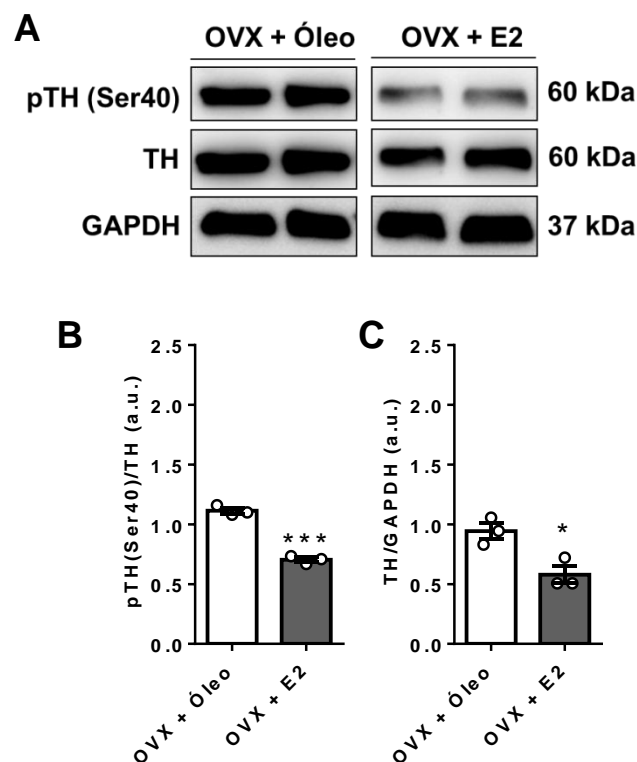


Figura 11: Expressão proteica da enzima TH na artéria da cauda. **(A)** Imagem representativa do *western blotting*. **(B)** Expressão de pTH e **(C)** TH total. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. $n = 3$ animais por tratamento. ***, $p < 0,001$ em relação ao grupo controle pelo teste *t-Student*. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle pelo teste *t-Student*.

5.5 Efeito do tratamento com E2 sobre o conteúdo de NO na artéria da cauda

Outro alvo avaliado na artéria da cauda foi o óxido nítrico (NO), que é um importante agente vasodilatador da musculatura lisa vascular (CHEN; PITTMAN; POPEL, 2008). A figura 12 mostra a marcação de NO em uma rata do grupo OVX + Óleo (Figura 12 A) e uma rata do grupo OVX + E2 (Figura 12 B). Através da medida de intensidade de fluorescência na camada média do vaso (Figura 12 C), observou-se que o tratamento com E2 aumentou a produção dessa molécula nesse leito vascular.

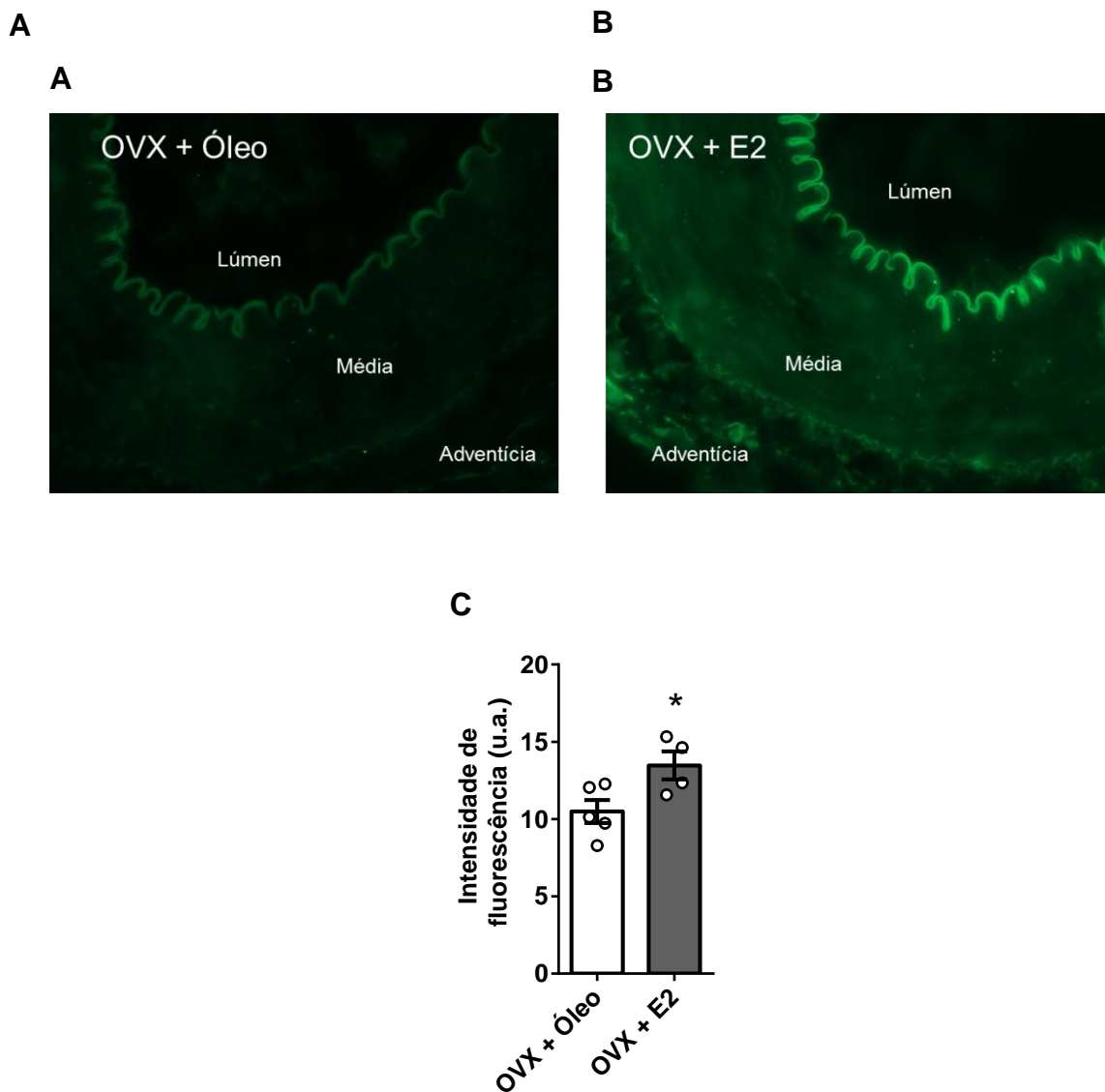


Figura 12: Marcação de NO na artéria da cauda de ratas ovariectomizadas. **(A)** Corte transversal da artéria da cauda de uma rata OVX + Óleo. **(B)** Corte transversal da artéria da cauda de uma rata OVX + E2. **(C)** Intensidade de fluorescência da

camada média do vaso. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. $n= 4-5$ animais por tratamento. *, $p<0,05$ em relação ao grupo controle pelo teste *t-Student*.

5.6 Efeito do tratamento com E2 sobre o ER- α no DRG

O DRG é um dos componentes da via aferente da termorregulação responsável por transferir informações periféricas de temperatura para núcleos centrais, que por sua vez, processam essas informações e controlam a resposta efetora (ROMANOVSKY et al., 2009). Inicialmente, identificamos que esse gânglio expressa o ER- α . No entanto, observou-se que o tratamento com E2 não alterou a expressão desse receptor nesse tecido, conforme demonstrado pelas bandas (Figura 13 A) e pelo gráfico (Figura 13 B).

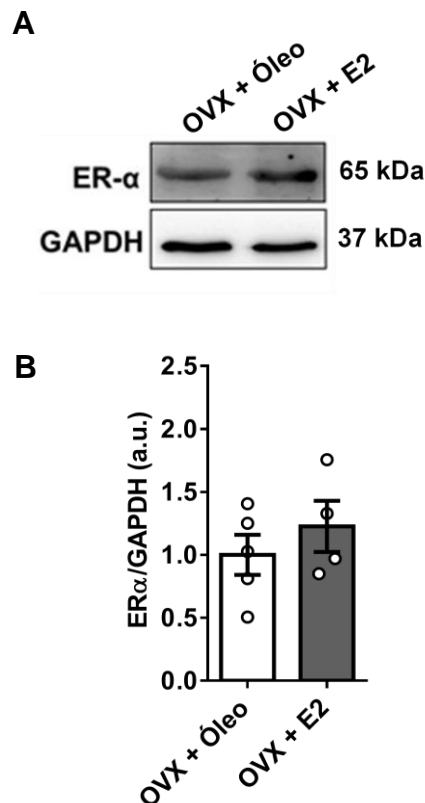


Figura 13: Expressão proteica de ER- α no DRG. **(A)** Imagem representativa do *western blotting*. **(B)** Expressão proteica de ER α . Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. $n = 4-5$ animais por tratamento.

5.7 Efeito do tratamento com E2 sobre a enzima TH no DRG

A enzima TH também foi avaliada no DRG. No entanto, o tratamento com E2 não alterou a expressão dessa proteína, conforme identificado pelas bandas (Figura 14 A) e pelos gráficos da pTH (Figura 14 B) e TH total (Figura 14 C).

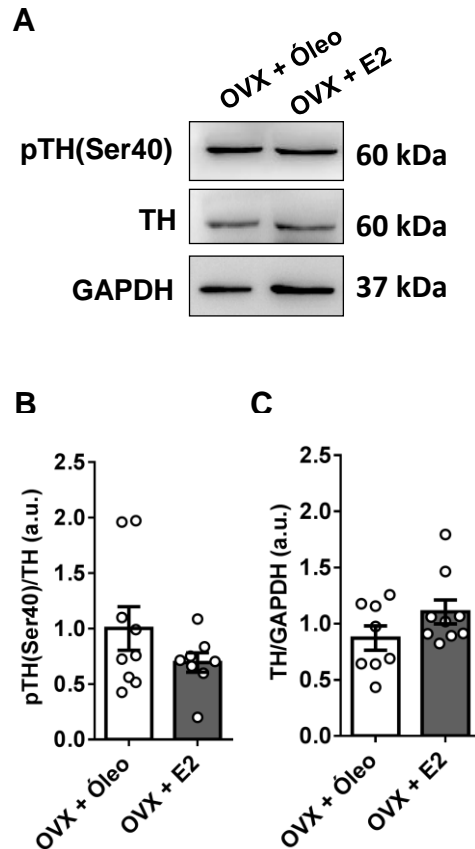


Figura 14: Expressão proteica da enzima TH no DRG. **(A)** Imagem representativa do *western blotting*. **(B)** Expressão proteica pTH. **(C)** Expressão proteica de TH total. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. $n = 8-9$ animais por tratamento.

5.8 Efeito do tratamento com E2 sobre o canal TRPV1 no DRG

Avaliou-se o efeito do tratamento com E2 sobre a expressão do canal TRPV1. Este canal é altamente expresso no DRG e está envolvido com a percepção de calor em mamíferos (CATERINA, 2007; ROMANOVSKY et al., 2009). Observou-se que o tratamento com E2 reduziu a expressão gênica (Figura 15 A) e proteica (Figura 15 B) desse canal, analisadas, respectivamente, por RT-PCR e *western blotting*. Com o objetivo de avançar no entendimento dos efeitos do E2 sobre a atividade deste canal, avaliamos a expressão da proteína quinase C ϵ (PKC ϵ), enzima responsável

pela fosforilação do canal TRPV1 no resíduo serina 800 do carbono C-terminal, tornando-o ativo (GOSWAMI et al., 2011). Dessa forma, analisou-se o efeito do E2 sobre a expressão proteica das enzimas PKC ϵ e PKC ϵ fosforilada (pPKC ϵ). Constatou-se que o tratamento com E2 não alterou a expressão de nenhum desses alvos (Figura 15 C).

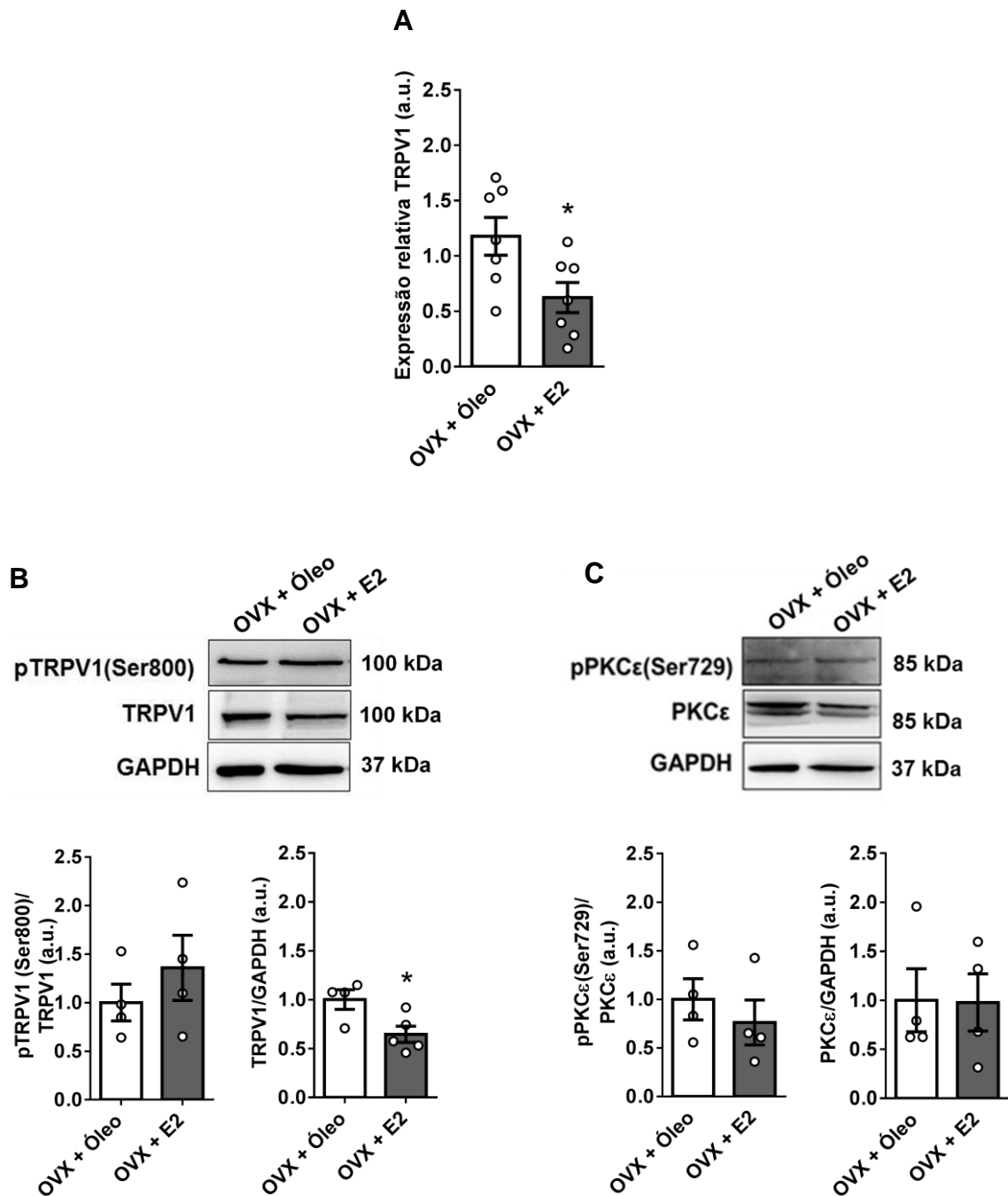


Figura 15: (A) Análise da expressão gênica do canal TRPV1 no DRG. (B e C) Imagens representativas do *western blotting* da expressão proteica de pTRPV1 e

TRPV1 total e de pPKC ϵ e PKC ϵ total. Os gráficos de barras representam a análise da expressão gênica e proteica pela média \pm EPM. $n = 3-7$ animais por tratamento. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle pelo teste *t-Student*.

5.9 Efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre o fluxo sanguíneo da cauda de ratas tratadas com E2

Utilizando-se da ferramenta farmacológica de dessensibilização do canal TRPV1, investigou-se a participação desse canal sobre o fluxo sanguíneo na artéria da cauda de ratas OVX + E2.

A efetividade da dessensibilização do canal TRPV1 foi avaliada pelo teste do limiar nociceptivo. Além da participação na termorregulação, esse canal também está envolvido na percepção de estímulos dolorosos. Assim, quando o canal TRPV1 é ativado, ele imediatamente responde à dor. Mas quando esse canal é bloqueado, ocorre elevação do limiar nociceptivo. (HUANG; ZHANG; MCNAUGHTON, 2006). Esta avaliação demonstrou que os animais dessensibilizados suportam uma maior pressão na pata (portanto, maior limiar), quando comparado ao grupo veículo, indicando redução da funcionalidade do canal nos animais dessensibilizados. Devido a limitações experimentais, não foi possível obter o limiar dos animais antes de qualquer procedimento, que é uma medida importante para descartar qualquer alteração de limiar nociceptivo intrínseco do animal. A tabela 4 mostra os valores encontrados em cada grupo.

Tabela 4: Avaliação do limiar nociceptivo após a as injeções de veículo e RTX

Grupo	Limiar nociceptivo após dessensibilização (g)
OVX + E2 - Veículo	172,8 \pm 2,64
OVX + E2 - RTX	238,5 \pm 3,69****

Os dados estão representados pela média \pm EPM. $n = 6 - 9$ animais por tratamento. ****, $p < 0,0001$ em relação ao grupo veículo pelo teste *t-Student*.

Observou-se que ratas tratadas com E2 que tinham o canal TRPV1 funcional apresentaram maior fluxo sanguíneo da cauda (Figura 16 A) em relação ao grupo tratado com o hormônio que teve o canal TRPV1 dessensibilizado (Figura 16 B). A leitura do fluxo sanguíneo em pontos fixos também corrobora esse resultado, de forma que houve redução do fluxo em um ponto intermediário da cauda (P2) (Figura

16 C). Portanto, o canal TRPV1 também é importante para a manutenção do fluxo sanguíneo da cauda

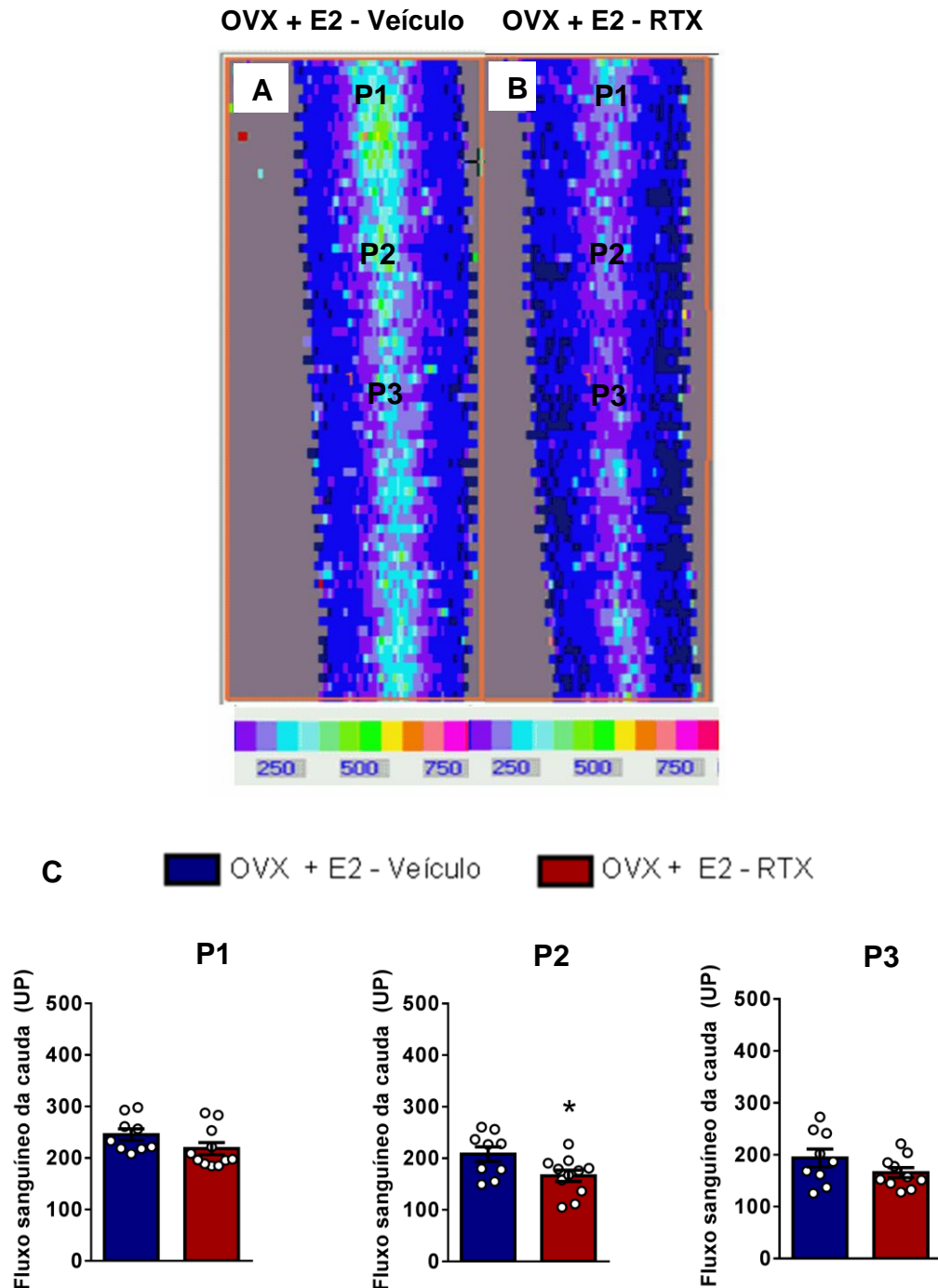


Figura 16: Avaliação do fluxo sanguíneo da artéria da cauda. **(A)** Imagem do fluxo sanguíneo de ratas com implante E2 que receberam injeção de Veículo. **(B)** Imagem do fluxo sanguíneo de ratas com implante E2 que receberam injeção de RTX. Cores frias representam menor fluxo sanguíneo. Cores quentes caracterizam maior fluxo sanguíneo. **(C)** Medição do fluxo sanguíneo durante 5 minutos em ponto fixo em 3

regiões da cauda de ratas com implante E2 que receberam injeção de veículo ou RTX. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. $n = 9-11$ animais por tratamento. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, pelo teste *t-Student*.

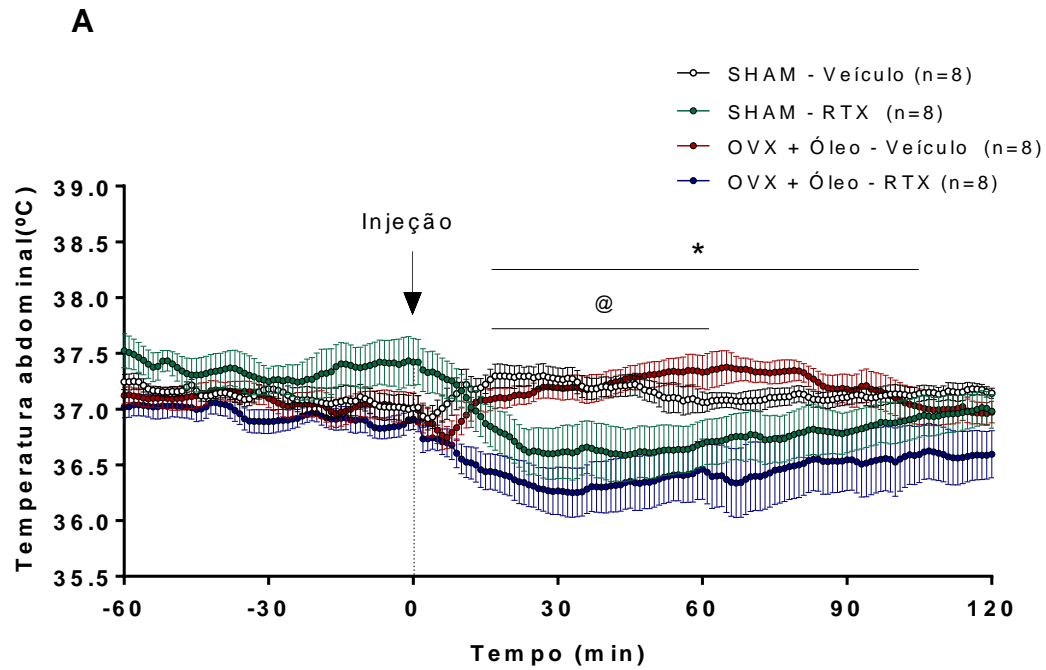
5.10 Efeito da ativação do canal TRPV1 sobre a $T_{\text{abdominal}}$

Uma vez que o canal TRPV1 mostrou ser importante para a manutenção do fluxo sanguíneo na artéria da cauda na presença de E2, investigamos se a ativação deste canal modula a expressão da enzima TH, identificada como alvo molecular do E2, justificando uma possível ação sinérgica entre o E2 e o TRPV1.

Primeiramente, avaliou-se o efeito da ativação do canal TRPV1 sobre a $T_{\text{abdominal}}$ de ratas. Para isso, ratas OVX + Óleo receberam uma injeção de RTX na dose agonista (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.) (STEINER et al., 2007) ou de veículo. Nota-se que houve uma redução acentuada da $T_{\text{abdominal}}$ no grupo que teve o canal TRPV1 ativado (OVX + Óleo - RTX) em relação ao grupo controle (OVX + Óleo - Veículo) (Figura 17 A). Além disso, observa-se que essa diferença de $T_{\text{abdominal}}$ foi mantida por aproximadamente 90 minutos entre os grupos.

Em seguida, investigou-se o efeito da ativação do canal TRPV1 em ratas SHAM, ou seja, ratas que estavam sob efeito dos hormônios ovarianos, dentre eles, o E2. De forma semelhante ao observado no delineamento acima, houve uma grande redução da $T_{\text{abdominal}}$ nas ratas que receberam a injeção de RTX na dose agonista (SHAM - RTX) em relação ao grupo controle (SHAM - Veículo) (Figura 17 A). No entanto, é notável que a queda da $T_{\text{abdominal}}$ promovida pelo RTX nesse delineamento foi mantida por menos tempo (aproximadamente 45 minutos) em relação às ratas ovariectomizadas.

A fim de comparar o efeito da ativação do canal TRPV1 entre as ratas OVX + Óleo e ratas SHAM, avaliou-se a média da $T_{\text{abdominal}}$ durante os 120 minutos de registro. Nota-se que, nas ratas OVX + Óleo, a ativação do canal TRPV1 (OVX + Óleo - RTX) provocou uma redução da média da $T_{\text{abdominal}}$ em relação ao grupo controle (OVX + Óleo - Veículo) (Figura 17 B). Essa diferença não foi encontrada no grupo SHAM. Em contrapartida, quando comparamos os grupos que tiveram o canal TRPV1 ativado pelo RTX, a presença dos hormônios ovarianos (SHAM - RTX) impediu uma redução acentuada da $T_{\text{abdominal}}$ em relação às ovariectomizadas (OVX + Óleo - RTX).



B

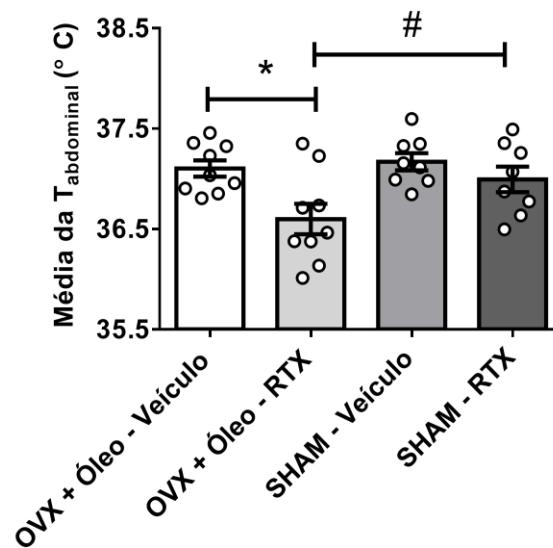


Figura 17: Ativação do canal TRPV1 pelo RTX. **(A)** Ativação do canal TRPV1 da região abdominal em ratas SHAM e OVX + Óleo. **(B)** Média da $T_{\text{abdominal}}$ durante 120 minutos de todos os grupos. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. $n = 8-9$ animais por tratamento. *, $p < 0,05$ dentro do grupo ovariectomizado; @, $p < 0,05$ dentro do grupo SHAM; #, $p < 0,05$ dentro do tratamento com RTX. Todas as análises foram feitas pelo teste de variância de duas vias seguido pelo teste de Tukey.

5.11 Efeito da ativação do canal TRPV1 sobre a enzima TH na artéria da cauda

Uma vez confirmada a ativação do canal TRPV1 pela dose agonista através da constatação da redução da $T_{\text{abdominal}}$, investigou-se se isso afetaria o tônus vasomotor simpático. Para isso, avaliou-se a expressão proteica da enzima TH na artéria da cauda, identificado como um importante alvo molecular do E2.

No entanto, observou-se que após 30 minutos da ativação do canal TRPV1, não houve alteração na expressão proteica de pTH na artéria da cauda de ratas ovariectomizadas, conforme demonstrado pelas bandas de proteína e pelo gráfico (Figura 18 A). Devido a limitações experimentais, não foi possível avaliar a expressão proteica de TH total nesse experimento.

Na presença dos hormônios ovarianos, a ativação do canal TRPV1 por 30 minutos também não alterou a expressão proteica de pTH e TH total nesse tecido, conforme demonstrado na figura 18 B.

É importante ressaltar que a expressão proteica dessas proteínas também foi avaliada após 120 minutos da ativação do canal TRPV1, tanto na presença quanto na ausência dos hormônios ovarianos. No entanto, também não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos tratamentos (dados não apresentados).

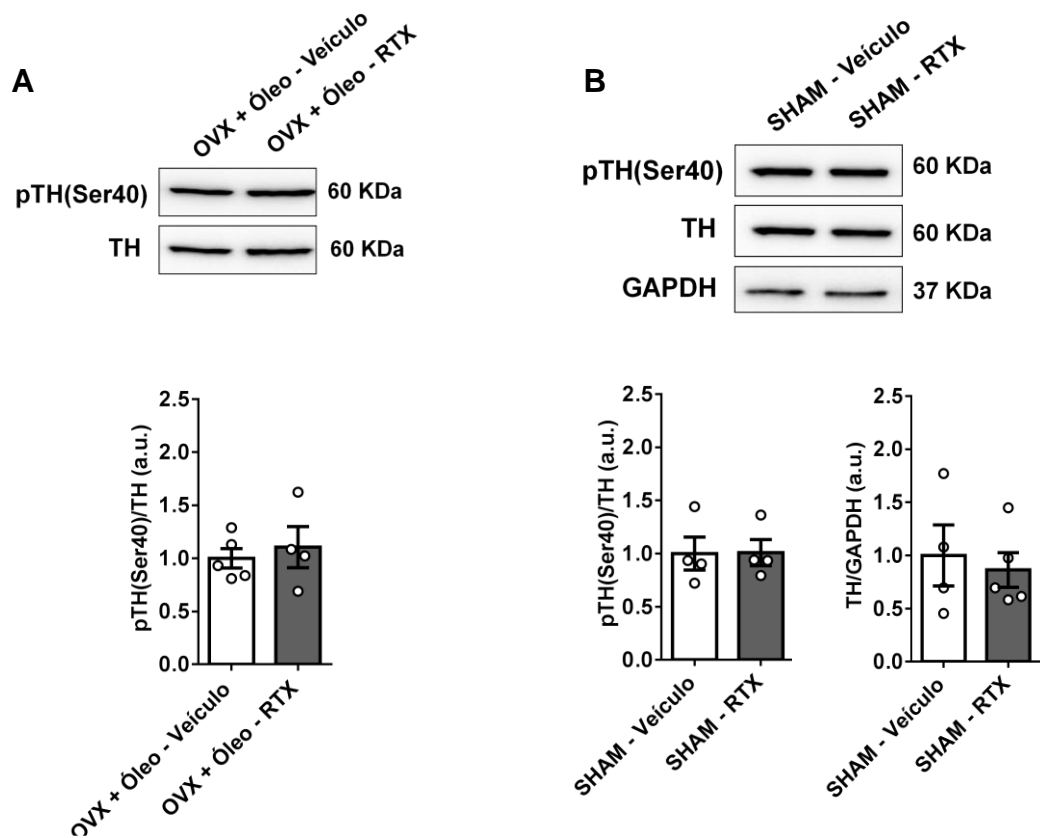
30 minutos

Figura 18: Expressão proteica de TH na artéria da cauda após 30 minutos da ativação do canal TRPV1. **(A)** Expressão proteica de pTH no grupo OVX + Óleo. **(B)** Expressão proteica de pTH e TH no grupo SHAM. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. $n = 4-5$ animais por tratamento.

5.12 Efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre a $T_{\text{abdominal}}$ e T_{cauda} de ratas ovariectomizadas durante a exposição ao calor

Considerando os resultados obtidos no presente estudo mostrando um efeito claro tanto do E2 quanto do TRPV1 sobre o fluxo sanguíneo, nos perguntamos quais seriam os prejuízos causados pela ausência simultânea do E2 e do canal TRPV1 sobre o controle termorregulatório de ratas. Este dado faz completar os resultados prévios obtidos no mestrado, os quais mostraram que ratas tratadas com E2 que tiveram o canal TRPV1 da região abdominal dessensibilizados apresentaram grande elevação da $T_{\text{abdominal}}$ e uma redução da dissipação de calor pela pele da cauda

durante a exposição ao calor (em relação ao grupo tratado com E2 que recebeu injeção de veículo), conforme mostrado na figura do apêndice.

O teste do limiar nociceptivo confirmou a dessensibilização do canal TRPV1 nesse delineamento. A tabela 5 mostra os valores encontrados em cada grupo.

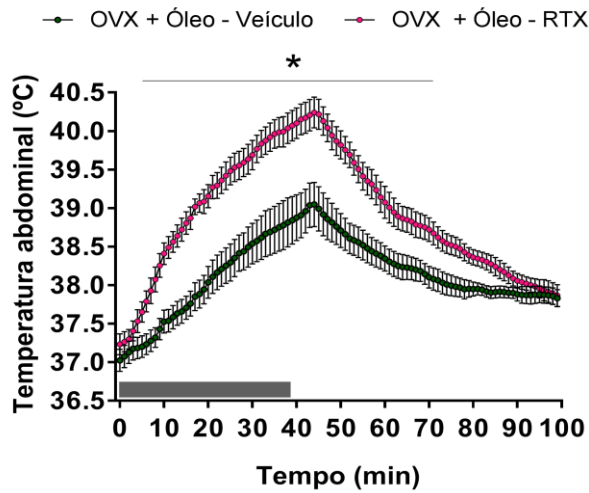
Tabela 5: Avaliação do limiar nociceptivo de ratas intactas e após as injeções de veículo ou RTX

Grupo	Limiar nociceptivo de ratas intactas (g)	Limiar nociceptivo após as injeções (g)
OVX + Óleo - Veículo	175,2 ± 2,02	177,1 ± 2,66
OVX + Óleo - RTX		243,8 ± 7,50****

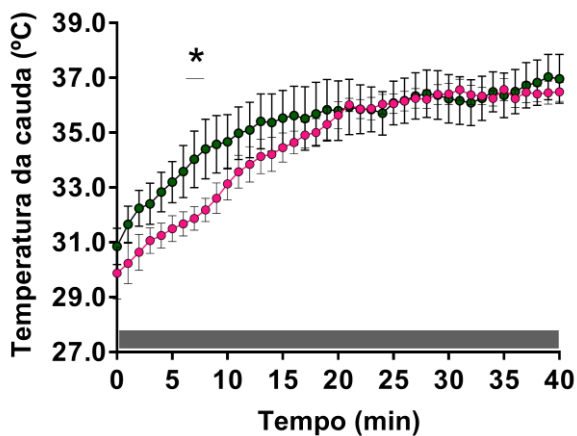
Os dados estão representados pela média ± EPM. n = 7 animais por tratamento. ****, p<0,0001 em relação ao grupo intacto pelo teste de variância de uma via seguido pelo teste *Dunnett*.

Observou-se que durante a exposição ao calor, ratas ovariectomizadas e dessensibilizadas (OVX + Óleo - RTX) apresentaram um grande prejuízo no controle da temperatura interna em relação ao grupo veículo (OVX + Óleo - Veículo). Devido à dissipação de calor insuficiente pela pele da cauda, foram alcançados valores de $T_{\text{abdominal}}$ superiores a 40 °C no grupo dessensibilizado (Figura 19 A e B). A média da $T_{\text{abdominal}}$ dos grupos confirma essa diferença (Figura 19 C).

A



B



C

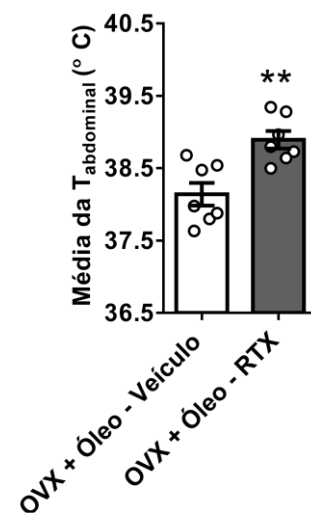


Figura 19: Avaliação das respostas termorregulatórias de ratas ovariectomizadas com implante óleo que receberam injeção de veículo ou RTX e foram expostas ao ambiente aquecido. **(A)** Variação da $T_{abdominal}$, **(B)** Variação da T_{cauda} , e **(C)** Média da $T_{abdominal}$. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. $n = 6-7$ animais por tratamento. **, $p < 0,01$ em relação ao grupo controle pelo teste *t-Student*. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle pelo teste *t-Student*.

5.13 Efeito da dessensibilização do canal TRPV1 sobre o limiar e a sensibilidade de dissipação de calor em ratas ovariectomizadas

A relação $T_{\text{abdominal}} \times T_{\text{cauda}}$ (Figura 20 A) permite avaliar o limiar e a sensibilidade de dissipação de calor.

Dados prévios obtidos no mestrado mostraram que ratas OVX + E2 possuem menor limiar e maior sensibilidade de dissipação de calor em relação ao grupo OVX + Óleo. No entanto, a dessensibilização do canal TRPV1 nas ratas tratadas com E2 inverteu essa relação (houve aumento do limiar e redução da sensibilidade), sugerindo uma possível participação desse canal nesse processo.

Diante desses resultados, nos perguntamos como estariam esses parâmetros na ausência simultânea do E2 e do canal TRPV1. Observou-se que a dessensibilização do canal TRPV1 elevou o limiar (Figura 20 B) e reduziu a sensibilidade de dissipação ao calor (Figura 20 C) em relação ao grupo veículo. Os valores de limiar e sensibilidade encontrados foram semelhantes aos grupos que receberam injeção de RTX e veículo na presença de E2 (dados não apresentados). Apesar disso, no grupo OVX + Óleo - RTX foram encontrados os maiores valores de $T_{\text{abdominal}}$.

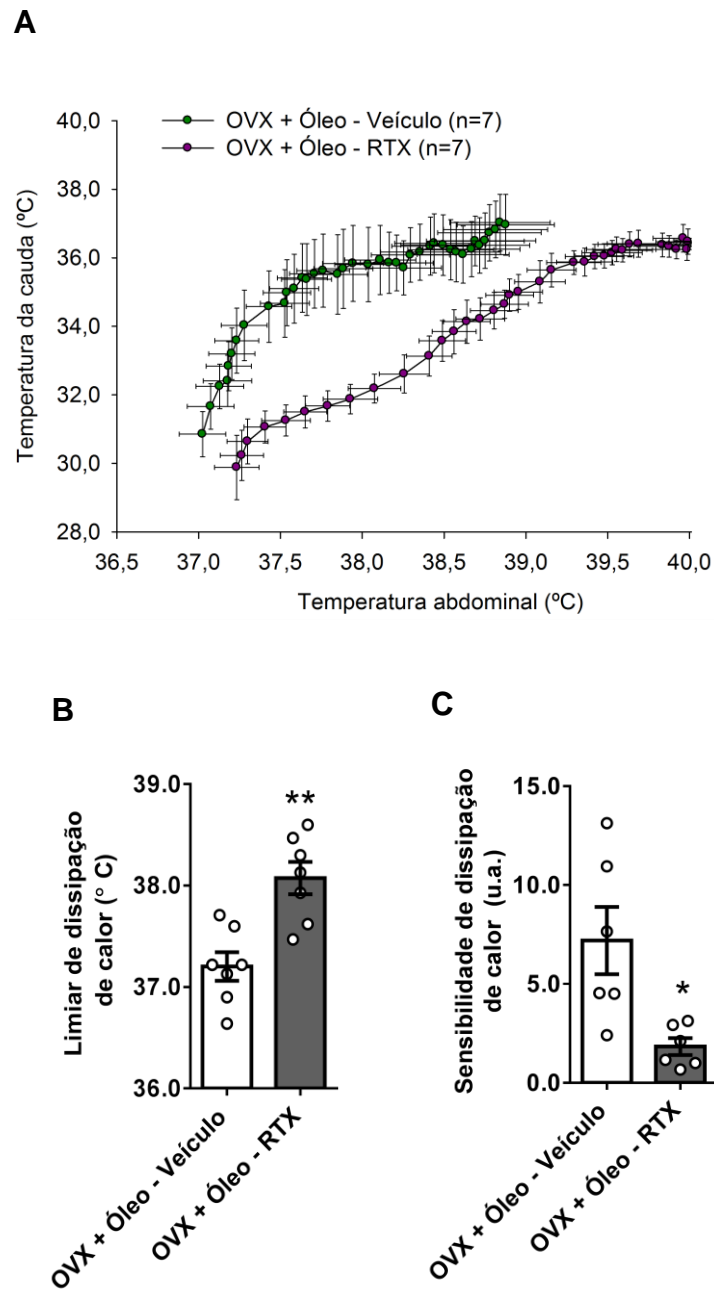


Figura 20: Análise dos parâmetros termorregulatórios de ratas ovariectomizadas com implante óleo que receberam injeção de veículo ou RTX e foram expostas ao ambiente aquecido. **(A)** Relação da $T_{\text{abdominal}} \times T_{\text{cauda}}$. **(B)** Limiar de dissipação de calor de ratas. **(C)** Sensibilidade de dissipação de calor de ratas. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. $n = 6-7$ animais por tratamento. **, $p < 0,01$ em relação ao grupo controle pelo teste *t-Student*. *, $p < 0,05$, em relação ao grupo controle pelo teste *t-Student*.

5.14 Efeito do aquecimento e das injeções de RTX/Veículo sobre a atividade locomotora espontânea

Durante a realização do protocolo de aquecimento, pelo fato dos animais estarem habituados ao termômetro da cauda, eles permaneceram em repouso durante todo o tempo de exposição ao calor. Muitos dos animais dormiram durante a realização desse experimento ou se mantinham apoiados sobre as grades, em repouso.

Em contrapartida, durante as injeções de RTX na dose agonista ou veículo, os animais se movimentaram livremente no interior da caixa durante todo o experimento, conforme apresentado pela figura 21.

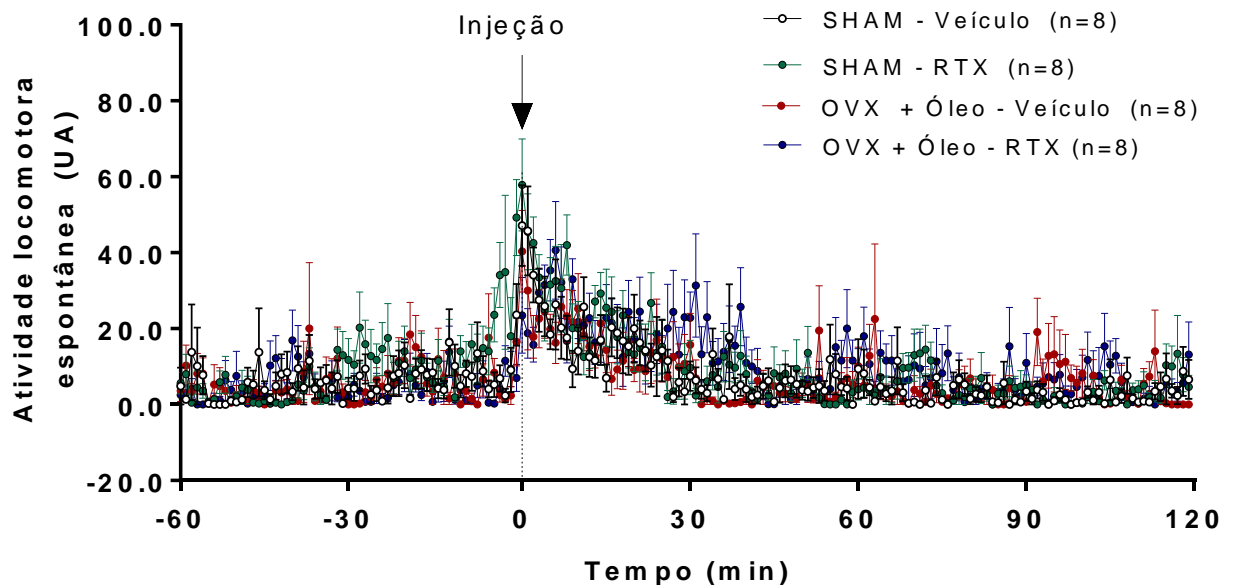


Figura 21: Atividade locomotora espontânea de animais do grupo SHAM e OVX + Óleo que receberam injeção de RTX em dose agonista ou veículo. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. n = 8 animais por tratamento.

6 DISCUSSÃO

Os principais achados desse trabalho foram: (i) identificação de ER na artéria da cauda; (ii) o E2 aumenta o fluxo sanguíneo da artéria da cauda e regula a expressão TH e a produção de NO nesse tecido; (iii) a dessensibilização do canal TRPV1 reduz o fluxo sanguíneo da artéria da cauda, mesmo na presença do E2; (iv) a dessensibilização do canal TRPV1 provoca grande aumento da $T_{\text{abdominal}}$ na ausência do E2; (v) a ativação do canal TRPV1 provoca uma redução acentuada da $T_{\text{abdominal}}$, mas a presença dos hormônios ovarianos (dentre eles o E2) impede a redução brusca dessa temperatura e restabelece os valores basais rapidamente (em relação ao grupo que não tem os hormônios). Juntos, esses resultados mostram a importância do E2 e do canal TRPV1 para o controle térmico de ratas. Pelo fato dos hormônios sexuais interferirem diretamente no controle da temperatura interna e o canal TRPV1 também participar desse processo, o presente trabalho investigou alguns alvos moleculares que poderiam ser regulados por esses fatores e assim, contribuir para a eficiência da dissipação de calor.

6.1 Efeito do E2 sobre o fluxo sanguíneo e alvos moleculares na artéria da cauda

Devido ao fato dos hormônios sexuais se comunicarem com a via responsável pelo controle da temperatura interna (DACKS; RANCE, 2010), o presente trabalho buscou compreender a importância do E2 para a homeostase térmica, principalmente nos mecanismos envolvidos na dissipação periférica de calor.

Sabe-se que o E2, através da ativação de seus receptores (ER- α , ER- β e GPER), desempenha um papel importante na homeostase endotelial e na vasodilatação por aumentar a produção de NO e prostaciclina no vaso (ARNAL et al., 2010; IORGA et al., 2017). Por esse motivo, o primeiro passo do nosso trabalho foi investigar a presença dos receptores para esse hormônio na artéria da cauda, principal local de dissipação de calor em ratos (GORDON, 1990). De fato, foram encontrados 3 subtipos de ERs nesse tecido: ER- α , ER- β e GPER, mostrando que o E2 atua sobre esse vaso. A existência dos receptores tipo alfa e beta já foi confirmada em outros leitos vasculares do rato, como na artéria uterina, aorta e da cauda (KHALIL, 2013). No entanto, estudos mostraram que esses receptores se distribuem de forma diferente nas camadas do vaso, de forma que a expressão de

ER- β é predominante nas células endoteliais, enquanto a expressão de ER- α é maior na musculatura lisa vascular (MENDELSON, 2002). O GPER também está expresso na musculatura lisa vascular de ratos e participa da sinalização envolvida no vasorelaxamento (DELGADO et al., 2021; LINDSEY; LIU; CHAPPELL, 2014). Até o momento, não avaliamos a distribuição dos ER na artéria da cauda de ratas no nosso modelo. No entanto, é um experimento importante para identificar em qual camada vascular estão distribuídos os receptores identificados na artéria da cauda.

Sabe-se que a principal função do fluxo sanguíneo cutâneo é trocar calor entre o meio interno e o externo promovendo a dissipação de calor e que essa resposta é modulada pelo sistema nervoso simpático (RAMAN; ROBERTS; VANHUYSE, 1983). Dados prévios obtidos pelo nosso grupo mostraram que o E2 aumenta a dissipação de calor de ratas durante a exposição ao ambiente aquecido (ARAÚJO, 2016). Por esse motivo, postulou-se a hipótese de que o E2 poderia aumentar o fluxo sanguíneo da artéria da cauda de ratas. De fato, observamos que o tratamento com E2 (OVX + E2) aumentou o fluxo sanguíneo da artéria da cauda em relação às ratas que não estavam sob efeito desse hormônio (OVX + Óleo). Esse resultado vai de encontro aos achados por Jiang e colaboradores (2017), que mostrou em seus experimentos que a ovariectomia reduziu o fluxo sanguíneo da cauda de ratas e que a reposição hormonal com E2 restabeleceu esse parâmetro próximo aos valores encontrados no grupo SHAM (JIANG et al., 2017).

O tônus vasomotor cutâneo é controlado pelo sistema nervoso autonômico simpático (NAKAMURA, 2011; ROMANOVSKY et al., 2009). Durante a exposição ao frio, ocorre aumento da liberação de noradrenalina e ativação dos mecanismos que permitem a produção e conservação de calor, como termogênese e vasoconstrição cutânea. Em contrapartida, durante a exposição ao calor, esse eixo simpático tem atividade reduzida, diminuindo a produção de catecolaminas e aumentando a dissipação de calor (ROMANOVSKY et al., 2009). Com o intuito de investigar se o E2 modula a eferência simpática, avaliamos a expressão proteica da enzima TH, enzima chave para a síntese de catecolaminas (GORIDIS; ROHRER, 2002). Observamos que o tratamento com E2 reduziu a expressão da TH, bem como a fosforilação dessa enzima (pTH). Considerando que a fosforilação da TH no resíduo Ser40 promove o aumento da atividade dessa enzima *in vitro*, *in vivo* e *in situ* (DUNKLEY et al., 2004) e que o tratamento com E2 reduziu esse processo, pode-se inferir que esse hormônio provocou uma redução da síntese de catecolaminas,

conseqüentemente, uma possível redução da eferência simpática responsável pela vasoconstrição deste leito. Esse resultado ajuda a explicar o aumento do fluxo sanguíneo promovido pelo E2, de forma que quando o vaso se encontra mais dilatado há uma maior passagem de sangue sobre esse leito para viabilizar a dissipação de calor.

A ação vasodilatadora atribuída ao E2 pode ser explicada também pela capacidade desse hormônio estimular a liberação de fatores derivados do endotélio, como o NO, e por agir na musculatura lisa do vaso (KYPREOS et al., 2014; WHITE, 2002). Pelo fato do NO ser muito importante para a manutenção do fluxo sanguíneo e também para a homeostase vascular (KYPREOS et al., 2014; WANG et al., 2004), aventamos a hipótese de que o tratamento com E2 poderia modular a quantidade dessa molécula na artéria da cauda. Sabe-se que o NO é produzido por células endoteliais e, em seguida, essa molécula migra para a musculatura lisa vascular (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). Por esse motivo, a camada média do vaso, que é constituída em sua grande maioria de músculo liso, foi utilizada para quantificar o NO (PUCOVSKÝ, 2010). De fato, o E2 aumentou a quantidade de NO liberado nesse leito vascular. Essa resposta induzida pelo E2 em promover o aumento da liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio já foi demonstrado em outros vasos sanguíneos, como em coronárias e artérias mesentérica, aorta e cerebral (TOSTES et al., 2003). Este efeito do E2 aumentar a produção de NO em células endoteliais também foi demonstrado *in vitro* (NEVZATI et al., 2015). Diante dessas evidências, acreditamos que a modulação do NO pelo E2 pode ser um fator que explique o aumento da vasodilatação nas ratas tratadas por esse hormônio e, conseqüentemente, é um dos possíveis mecanismos que promove o aumento do fluxo sanguíneo para possibilitar a dissipação de calor.

6.2 Efeito do E2 sobre alvos moleculares no DRG

O DRG é um importante componente da via aferente da termorregulação, sendo responsável por transmitir informações periféricas de temperatura para regiões centrais (ROMANOVSKY et al., 2009). Ele está envolvido também da condução de outras informações sensoriais, como o toque, a dor inflamatória e a dor somática (GUHA; SHAMJI, 2016).

Pelo fato dos ER estarem presentes em neurônios sensoriais (PAYRITS et al., 2017), nos perguntamos se o tratamento com E2 modularia esses receptores no

DGR. Entretanto, constatamos que o tratamento com E2 não alterou a expressão de ER- α no nosso modelo, apesar de identificarmos claramente a presença desse receptor nesse tecido. Diferentemente dos nossos achados, Sohrabji e colaboradores também identificaram a presença de receptores de estrógeno no DRG de ratas intactas e ovariectomizadas. No entanto, houve uma redução da expressão gênica desses receptores nas ratas castradas (SOHRABJI; MIRANDA; TORAN-ALLERAND, 1994). Diogenes e colaboradores (2006) também mostraram que o E2 controla vários genes envolvidos na nocicepção no gânglio trigêmeo, identificando a presença de ER- α , ER- β e GPER-1 no útero e no DRG de camundongos (DIOGENES et al., 2006). No nosso estudo também investigamos o efeito do tratamento com E2 sobre o ER- β , mas devido a limitações técnicas, o resultado não foi conclusivo.

Estudos realizados em camundongos adultos mostraram que a enzima TH é expressa em alguns DRG e também em algumas regiões da medula espinhal (BRUMOVSKY; VILLAR; HÖKFELT, 2006). A partir dessa informação, investigamos se o tratamento com E2 poderia modular a expressão dessa enzima nesse gânglio. Contudo, observamos que o E2 não alterou a expressão da TH, nem a sua fosforilação. Apesar da existência dessa enzima no DRG, sabe-se que a via aferente responsável por transmitir as informações de temperatura para os núcleos centrais é glutamatérgica (ROMANOVSKY et al., 2009). Sendo assim, uma estratégia farmacológica plausível seria investigar o efeito do E2 sobre esse aminoácido e seus receptores nessa região e avaliar uma possível modulação desse hormônio sobre a aferência que é enviada para o hipotálamo.

O canal TRPV1 também é expresso em neurônios sensoriais (DIOGENES et al., 2006; PAYRITS et al., 2017), local em que o E2 foi descrito como modulador em resposta à dor, reduzindo o limiar de ativação e aumentando sua excitabilidade (PAYRITS et al., 2017). Por esse motivo, nos perguntamos se o E2 também poderia modular esse canal em resposta à temperatura no DRG. De fato, observamos que o E2 reduziu a expressão gênica e proteica do canal TRPV1, mas não alterou a sua fosforilação. Resultados semelhantes foram encontrados por Yazğan e Nazıroğlu (2017), em que a ovariectomia aumentou a expressão de TRPV1 no DRG em relação às ratas intactas e que o tratamento crônico com E2 (14 dias, 80 μ g/kg/dia, s.c.) reduziu essa expressão em relação ao grupo ovariectomizado (YAZĞAN; NAZIROĞLU, 2017).

É descrito na literatura que hormônios esteroides têm a capacidade de ativar canais TRP's no DRG de ratas castradas, por um mecanismo ainda pouco elucidado (YAZĞAN; NAZIROĞLU, 2017). Além disso, sabe-se que a proteína kinase C ϵ (PKC ϵ) fosforila o canal TRPV1 no resíduo serina 800 do carbono C-terminal, tornando-o ativo. Essa enzima, por sua vez, também pode ser fosforilada no resíduo serina 729, tornando-se ativa (GOSWAMI et al., 2011). Diante dessas informações, investigamos se o efeito do E2 sobre o canal TRPV1 envolve a modulação da PKC ϵ por esse hormônio. Observamos, no entanto, que o E2 não interferiu na expressão dessa enzima nem na sua fosforilação. Esse resultado corrobora o resultado anterior, visto que, se não houve aumento da ativação dessa enzima pela fosforilação, de fato, não haveria aumento da fosforilação do canal TRPV1. É importante ressaltar que o canal TRPV1 também pode ser fosforilado por outras enzimas, como PKA, PKC e CAMKII, em diferentes resíduos de aminoácidos (YAO; KWAN; HUANG, 2005). Dessa forma, seria interessante investigar outras quinases que poderiam ser reguladas pelo E2 e, de fato, propor um possível mecanismo de ativação do canal TRPV1 por esse hormônio.

6.3 Efeito do canal TRPV1 sobre fluxo sanguíneo, $T_{\text{abdominal}}$ e alvos moleculares na artéria da cauda na presença e ausência de E2

Após a confirmação de que o E2 é importante para manutenção do fluxo sanguíneo da cauda, nos perguntamos se o canal TRPV1 também é importante para manutenção desse parâmetro, mesmo na presença desse hormônio. Para investigar essa hipótese, utilizamos a dessensibilização do canal TRPV1 como estratégia farmacológica, visto que ela provoca uma mudança conformacional no canal, inativando-o (ROMANOVSKY et al., 2009). Consequentemente, ocorre aumento da temperatura interna (ROMANOVSKY et al., 2009). Dessa forma, conseguimos avaliar a importância desse canal para a dissipação de calor de ratas.

A dessensibilização (inativação) do canal TRPV1 foi confirmada pelo teste do limiar nociceptivo, de forma que animais dessensibilizados suportam uma maior pressão na pata (portanto, maior limiar), quando comparado ao grupo veículo. Isso pode ser explicado pelo fato de que o canal TRPV1, além de participar do controle de temperatura interna, também está envolvido na nocicepção (HUANG; ZHANG; MCNAUGHTON, 2006). Quando ativado, esse canal responde à dor. No entanto, a

condução deste estímulo é reduzida na presença de um antagonista para TRPV1, elevando o limiar nociceptivo (HUANG; ZHANG; MCNAUGHTON, 2006).

De acordo com as imagens do *Doppler*, ficou evidente que o canal TRPV1 também é importante para a manutenção do fluxo sanguíneo da artéria da cauda, visto que a dessensibilização desse canal reduziu esse fluxo, mesmo na presença de E2. A expressão proteica do canal TRPV1 na artéria da cauda também foi investigada, visto que a sua presença nesse tecido alvo poderia trazer uma informação interessante sobre sua participação na dissipação de calor. No entanto, devido a limitações experimentais, os resultados não foram conclusivos. Diferentemente dos nossos resultados sobre a expressão do canal TRPV1 na artéria da cauda, Phan e colaboradores (2020) identificaram a presença do canal TRPV1 na musculatura lisa de arteríolas no coração, tecido adiposo e músculo esquelético (PHAN et al., 2020). Nesse estudo foi constatado que a ativação do canal TRPV1 por capsaicina aumentou a corrente de Ca^{2+} em células da musculatura lisa vascular de artérias, aumentou a constrição desses vasos e a pressão sanguínea e reduziu o fluxo coronário de maneira dose-dependente (PHAN et al., 2020). Com base nos nossos resultados e no trabalho descrito acima, há indícios de que o canal TRPV1 possa ter diferentes ações dependendo do leito vascular em que ele se encontra, sendo necessários novos estudos para essa confirmação.

Outra estratégia farmacológica utilizada para avaliar a participação do canal TRPV1 sobre o controle termorregulatório foi através da sua ativação pelo RTX. No presente trabalho, observou-se uma redução da $T_{abdominal}$ no grupo SHAM - RTX e no grupo OVX + Óleo - RTX em relação aos respectivos grupos controles. Essa redução brusca da $T_{abdominal}$ a curto prazo já foi demonstrada em outros estudos e pode ser explicada pelo aumento da vasodilatação cutânea após a ativação do canal TRPV1 (ROMANOVSKY et al., 2009; STEINER et al., 2007). É interessante notar que essa redução da $T_{abdominal}$ foi mais pronunciada e mantida por mais tempo na ausência dos hormônios ovarianos. Dessa forma, podemos inferir que os hormônios ovarianos, dentre eles o E2, foi importante para amenizar o efeito hipotérmico promovido pelo RTX.

Ainda nesse contexto, investigamos o efeito da ativação do canal TRPV1 sobre a enzima TH na artéria da cauda na ausência e presença dos hormônios ovarianos. O intuito desse experimento foi avaliar uma possível modulação da ativação do canal TRPV1 sobre a eferência simpática que controla a dissipação de calor. No entanto, a

ativação do canal TRPV1 não alterou a expressão da enzima TH nem a sua fosforilação em nenhum dos tempos analisados. Por outro lado, Chakraborty e colaboradores (2017) demonstraram em seus experimentos que a noradrenalina tem a capacidade de modular o canal TRPV1. Nesse trabalho, realizado *in vitro*, esses pesquisadores mostraram que a noradrenalina inibe a corrente de cálcio induzida por capsaicina em neurônios do DRG (CHAKRABORTY et al., 2017), mostrando que pode haver uma conversa entre a sinalização desencadeada pelo TRPV1 e pela noradrenalina.

O protocolo de aquecimento foi um experimento importante para investigar os prejuízos causados pela ausência simultânea do canal TRPV1 e do E2 sobre a $T_{\text{abdominal}}$ e T_{cauda} . De fato, foram alcançados valores elevados de temperatura no grupo dessensibilizado, que pode ser explicado pelo grande aumento da $T_{\text{abdominal}}$ que não foi acompanhado pela maior dissipação de calor pela pele da cauda. Dessa forma, podemos inferir que o E2 e o canal TRPV1, juntos, são importantes para a eficiência do processo termorregulatório de ratas frente a um desafio térmico e que a falta de ambos compromete de forma mais severa as respostas termorregulatórias durante a exposição ao calor, visto que foram alcançados valores de $T_{\text{abdominal}}$ superiores a 40°C.

A relação entre a $T_{\text{abdominal}}$ e T_{cauda} fornece informações importantes sobre o limiar e a sensibilidade de dissipação de calor. No presente trabalho, observamos que, na ausência de E2, a dessensibilização do canal TRPV1 elevou o limiar e reduziu a sensibilidade de dissipação de calor, quando comparado ao grupo veículo. Sabe-se que alterações no limiar e na sensibilidade de dissipação de calor são parâmetros importantes que sugerem, respectivamente, alterações centrais e periféricas dos mecanismos envolvidos na dissipação de calor (NADEL et al., 1971). Alterações no limiar podem estar relacionadas à alteração na atividade de neurônios sensíveis ao calor na APO ou nas eferências que controlam a dissipação de calor (NADEL et al., 1971). Já em relação à sensibilidade de dissipação de calor, propomos que a ausência do E2 e do canal TRPV1 interfira de alguma forma na vasomotricidade da cauda, comprometendo a dissipação de calor. Esta afirmação encontra respaldo nos resultados obtidos neste estudo sobre o efeito do E2 e TRPV1 sobre o fluxo sanguíneo.

É importante ressaltar que alguns protocolos experimentais importantes para a melhor compreensão dos resultados obtidos nesse estudo não foram concluídos em

tempo hábil, sendo considerados fatores limitantes deste trabalho, como a análise da temperatura interna por termografia, investigação de questões metabólicas e comportamentais e novos experimentos com o RTX, cuja produção foi descontinuada.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o E2 e o canal TRPV1 são importantes para manutenção do tônus vasomotor cutâneo e fluxo sanguíneo da artéria da cauda de ratas. Devido ao fato de alguns mecanismos fisiológicos e patológicos envolverem a alteração da temperatura interna, o conhecimento desse possível mecanismo, poderá abrir novas oportunidades de investigação de alvos terapêuticos para o tratamento de desordens termorregulatórias.

O esquema abaixo (figura 22) propõe um possível mecanismo responsável pelo controle de temperatura, de forma que a presença do E2 e do canal TRPV1 são importantes para aumentar a quantidade de NO na artéria da cauda e reduzir a síntese de catecolaminas nesse local, mecanismos que são responsáveis pelo aumento do fluxo sanguíneo e dissipação de calor pela pele da cauda.

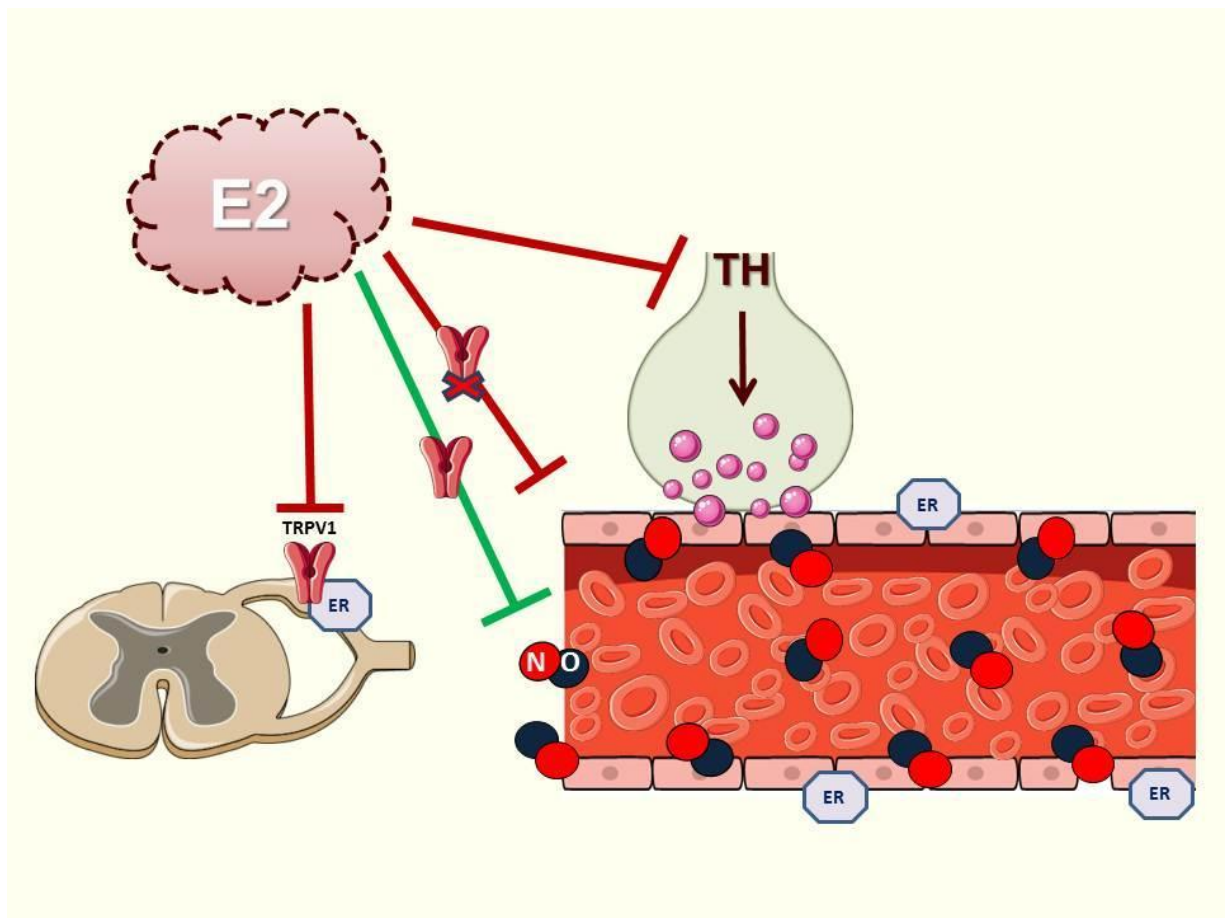


Figura 22: Possível mecanismo de ação do E2 e canal TRPV1 sobre a temperatura interna.

8 REFERENCIAS

ARAÚJO, F. M. **Efeitos do estradiol e dos canais trpv1 sobre a termorregulação em ratas.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

ARNAL, J.-F. et al. Estrogen receptors and endothelium. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 8, p. 1506–1512, 2010.

BENNETT, A.; RUBEN, J. Endothermy and activity in Vertebrates. **Science (New York, N.Y.)**, v. 206, p. 649–54, 1979.

BEVAN, S.; QUALLO, T.; ANDERSSON, D. A. TRPV1. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 222, p. 207–245, 2014.

BLACK, W. Z.; HARTLEY, J. G. **Thermodynamics.** [s.l.] Harper & Row, 1985.

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. 248–254, 1976.

BRATZ, I. N. et al. Impaired capsaicin-induced relaxation of coronary arteries in a porcine model of the metabolic syndrome. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 6, p. H2489-2496, 2008.

BRUMOVSKY, P.; VILLAR, M. J.; HÖKFELT, T. Tyrosine hydroxylase is expressed in a subpopulation of small dorsal root ganglion neurons in the adult mouse. **Experimental Neurology**, v. 200, n. 1, p. 153–165, 2006.

CATERINA, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5464, p. 306–313, 2000.

CATERINA, M. J. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 1, p. R64-76, 2007.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 417–423, 2002.

CHAKRABORTY, S. et al. Presynaptic inhibition of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) receptors by noradrenaline in nociceptive neurons. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 8, p. 2639–2660, 2017.

CHAPPUIS, S. et al. Role of the circadian clock gene Per2 in adaptation to cold temperature. **Molecular Metabolism**, v. 2, n. 3, p. 184–193, 2013.

CHARKOUDIAN, N. et al. Autonomic control of body temperature and blood pressure: influences of female sex hormones. **Clinical Autonomic Research**, v. 27, n. 3, p. 149–155, 2017.

CHARKOUDIAN, N.; STACHENFELD, N. S. Reproductive hormone influences on thermoregulation in women. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 2, p. 793–804, 2014.

CHEN, K.; PITTMAN, R. N.; POPEL, A. S. Nitric Oxide in the Vasculature: Where Does It Come From and Where Does It Go? A Quantitative Perspective. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 7, p. 1185–1198, 2008.

CROMPTON, A. W.; TAYLOR, C. R.; JAGGER, J. A. Evolution of homeothermy in mammals. **Nature**, v. 272, n. 5651, p. 333–336, 1978.

DACKS, P. A.; KRAJEWSKI, S. J.; RANCE, N. E. Ambient temperature and 17 β -estradiol modify Fos immunoreactivity in the median preoptic nucleus, a putative regulator of skin vasomotion. **Endocrinology**, v. 152, n. 7, p. 2750–2759, 2011.

DACKS, P. A.; RANCE, N. E. Effects of estradiol on the thermoneutral zone and core temperature in ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 151, n. 3, p. 1187–1193, 2010.

DARBLADE, B. et al. Estradiol Alters Nitric Oxide Production in the Mouse Aorta Through the α -, but not β -, Estrogen Receptor. **Circulation Research**, v. 90, n. 4, p. 413–419, 2002.

DELGADO, N. T. B. et al. Sex Differences in the Vasodilation Mediated by G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) in Hypertensive Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 659291, 2021.

DIOGENES, A. et al. Prolactin Modulates TRPV1 in Female Rat Trigeminal Sensory Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 31, p. 8126–8136, 2006.

DOGAN, M. D. et al. Lipopolysaccharide fever is initiated via a capsaicin-sensitive mechanism independent of the subtype-1 vanilloid receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 8, p. 1023–1032, 2004.

DOS SANTOS, R. L. et al. Sex hormones in the cardiovascular system. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 18, n. 2, p. 89–103, 2014.

DRUMMOND, L. R. et al. Brain Temperature in Spontaneously Hypertensive Rats during Physical Exercise in Temperate and Warm Environments. **PloS One**, v. 11, n. 5, p. e0155919, 2016.

DUNKLEY, P. R. et al. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. **Journal of Neurochemistry**, v. 91, n. 5, p. 1025–1043, 2004.

FRANCISCO, M. A.; MINSON, C. T. Cutaneous active vasodilation as a heat loss thermoeffector. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 156, p. 193–209, 2018.

GARAMI, A. et al. Contributions of different modes of TRPV1 activation to TRPV1 antagonist-induced hyperthermia. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 4, p. 1435–1440, 2010.

GARAMI, A. et al. Hyperthermia induced by transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonists in human clinical trials: Insights from mathematical modeling and meta-analysis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 208, p. 107474, 2020.

GAVVA, N. R. et al. The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 13, p. 3366–3374, 2007.

GONZALES, R. J.; WALKER, B. R.; KANAGY, N. L. 17 β -Estradiol increases nitric oxide-dependent dilation in rat pulmonary arteries and thoracic aorta. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 280, n. 3, p. L555–L564, 2001.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 5, p. 963–991, 1990.

GORIDIS, C.; ROHRER, H. Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 7, p. 531–541, 2002.

GOSWAMI, C. et al. Estrogen destabilizes microtubules through an ion-conductivity-independent TRPV1 pathway. **Journal of Neurochemistry**, v. 117, n. 6, p. 995–1008, 2011.

GRIMM, S. L.; HARTIG, S. M.; EDWARDS, D. P. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. **Journal of Molecular Biology**, Molecular Basis of Signal Transduction. v. 428, n. 19, p. 3831–3849, 2016.

GUHA, D.; SHAMJI, M. F. The Dorsal Root Ganglion in the Pathogenesis of Chronic Neuropathic Pain. **Neurosurgery**, v. 63, n. CN_suppl_1, p. 118–126, 2016.

HUANG, J.; ZHANG, X.; MCNAUGHTON, P. A. Inflammatory Pain: The Cellular Basis of Heat Hyperalgesia. **Current Neuropharmacology**, v. 4, n. 3, p. 197–206, 2006.

IORGA, A. et al. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. **Biology of Sex Differences**, v. 8, n. 1, p. 33, 2017.

JIANG, H. et al. Changes in cardiovascular function based on adrenalin and norepinephrine metabolism in ovariectomized rats. **Experimental Gerontology**, v. 91, p. 15–24, 2017.

JOHNSON, C. D.; CONEY, A. M.; MARSHALL, J. M. Roles of norepinephrine and ATP in sympathetically evoked vasoconstriction in rat tail and hindlimb in vivo. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, n. 6, p. H2432-2440, 2001.

KAMMER, A. E.; HEINRICH, B. Insect Flight Metabolism. In: TREHERNE, J. E.; BERRIDGE, M. J.; WIGGLESWORTH, V. B. (Eds.). . **Advances in Insect Physiology**. [s.l.] Academic Press, v. 13p. 133–228, 1978.

KHALIL, R. A. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 12, p. 1627–1642, 2013.

KYPREOS, K. E. et al. Regulation of endothelial nitric oxide synthase and high-density lipoprotein quality by estradiol in cardiovascular pathology. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, n. 3, p. 256–268, 2014.

LI, Z. et al. Ovariectomy eliminates sex differences in rat tail artery response to adrenergic nerve stimulation. **The American Journal of Physiology**, v. 272, n. 4 Pt 2, p. H1819-1825, 1997.

LINDSEY, S. H.; LIU, L.; CHAPPELL, M. C. Vasodilation by GPER in mesenteric arteries involves both endothelial nitric oxide and smooth muscle cAMP signaling. **Steroids**, v. 81, p. 99–102, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MACHADO, N. L. S. et al. A glutamatergic hypothalamomedullary circuit mediates thermogenesis but not heat conservation during stress-induced hyperthermia. **Current biology : CB**, v. 28, n. 14, p. 2291- 2301.e5, 2018.

MEIER, K.; LEE, K. Neurogenic Fever: Review of Pathophysiology, Evaluation, and Management. **Journal of Intensive Care Medicine**, 2016.

MENDELSON, M. E. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature¹¹ Discussion of unlabeled use of products: Estrogens are not labeled for any effects they may have on the cardiovascular system or for the treatment of cardiovascular disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 90, n. 1, Supplement 1, p. F3–F6, 2002.

MERCER, J. Glossary of terms for thermal physiology, Third edition. **Japanese Journal of Physiology**, v. 51, p. 245–280, 2001.

MILLS, C. et al. Effects of the transient receptor potential vanilloid 1 antagonist A-425619 on body temperature and thermoregulation in the rat. **Neuroscience**, v. 156, n. 1, p. 165–174, 2008.

NADEL, E. R. et al. Peripheral modifications to the central drive for sweating. **Journal of Applied Physiology**, v. 31, n. 6, p. 828–833, 1971.

NAGASHIMA, K. et al. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. **Autonomic Neuroscience**, Fever:the role of the vagus nerve. v. 85, n. 1, p. 18–25, 2000.

NAKAMURA, K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 5, p. R1207-1228, 2011.

NEVZATI, E. et al. Estrogen induces nitric oxide production via nitric oxide synthase activation in endothelial cells. **Acta Neurochirurgica. Supplement**, v. 120, p. 141–145, 2015.

OTTER, D.; AUSTIN, C. Effects of 17β -Oestradiol on Rat Isolated Coronary and Mesenteric Artery Tone: Involvement of Nitric Oxide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, n. 5, p. 531–538, 1998.

OZKOR, M. A.; QUYYUMI, A. A. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. **Cardiology Research and Practice**, v. 2011, p. 156146, 2011.

PAYRITS, M. et al. Estradiol Sensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in Pain Responses. **Endocrinology**, v. 158, n. 10, p. 3249–3258, 2017.

PHAN, T. X. et al. TRPV1 expressed throughout the arterial circulation regulates vasoconstriction and blood pressure. **The Journal of Physiology**, v. 598, n. 24, p. 5639–5659, 2020.

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

PRESS, M. F. et al. Estrogen receptor localization in the female genital tract. **The American Journal of Pathology**, v. 123, n. 2, p. 280–292, 1986a.

PRESS, M. F. et al. Estrogen receptor localization in the female genital tract. **The American Journal of Pathology**, v. 123, n. 2, p. 280–292, 1986b.

PUCOVSKÝ, V. Interstitial cells of blood vessels. **The Scientific World Journal**, v. 10, p. 1152–1168, 2010.

RAMAN, E. R.; ROBERTS, M. F.; VANHUYSE, V. J. Body temperature control of rat tail blood flow. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 1983.

RAMÍREZ-BARRANTES, R. et al. TRPV1-Estradiol Stereospecific Relationship Underlies Cell Survival in Oxidative Cell Death. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 444, 2020.

RAMSEY, I. S.; DELLING, M.; CLAPHAM, D. E. An introduction to TRP channels. **Annual Review of Physiology**, v. 68, p. 619–647, 2006.

RANG, H. P. Rang & Dale: Farmacologia. p. 1939, [s.d.].

RIEDEL, K. et al. Estrogen determines sex differences in adrenergic vessel tone by regulation of endothelial β -adrenoceptor expression. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 317, n. 2, p. H243–H254, 2019.

ROBBINS, R. A.; GRISHAM, M. B. Nitric oxide. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, n. 6, p. 857–860, 1997.

ROMANOVSKY, A. A. et al. The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 3, p. 228–261, 2009.

ROMANOVSKY, A. A. The thermoregulation system and how it works. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 156, p. 3–43, 2018.

ROMANOVSKY, A. A.; IVANOV, A. I.; SHIMANSKY, Y. P. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 92, n. 6, p. 2667–2679, 2002.

SAMPLE, S. J. et al. Functional adaptation in female rats: the role of estrogen signaling. **PloS One**, v. 7, n. 9, p. e43215, 2012.

SAWKA, M. N. et al. Integrated physiological mechanisms of exercise performance, adaptation, and maladaptation to heat stress. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 4, p. 1883–1928, 2011.

SILVA, N. L.; BOULANT, J. A. Effects of testosterone, estradiol, and temperature on neurons in preoptic tissue slices. **The American Journal of Physiology**, v. 250, n. 4 Pt 2, p. R625-632, 1986.

SOHRABJI, F.; MIRANDA, R. C.; TORAN-ALLERAND, C. D. Estrogen differentially regulates estrogen and nerve growth factor receptor mRNAs in adult sensory neurons. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 14, n. 2, p. 459–471, 1994.

STEINER, A. A. et al. Nonthermal Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channels in Abdominal Viscera Tonicly Inhibits Autonomic Cold-Defense Effectors. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 28, p. 7459–7468, 2007.

TAKAHASHI, N.; KOZAI, D.; MORI, Y. TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. **Frontiers in Physiology**, v. 3, 2012.

TOSTES, R. C. et al. Effects of estrogen on the vascular system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 36, n. 9, p. 1143–1158, 2003.

UCHIDA, Y. et al. Tail position affects the body temperature of rats during cold exposure in a low-energy state. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 198, n. 2, p. 89–95, 2012.

WANG, X. et al. Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 31, p. 11477–11482, 2004.

WHITE, R. E. Estrogen and vascular function. **Vascular Pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 73–80, 2002.

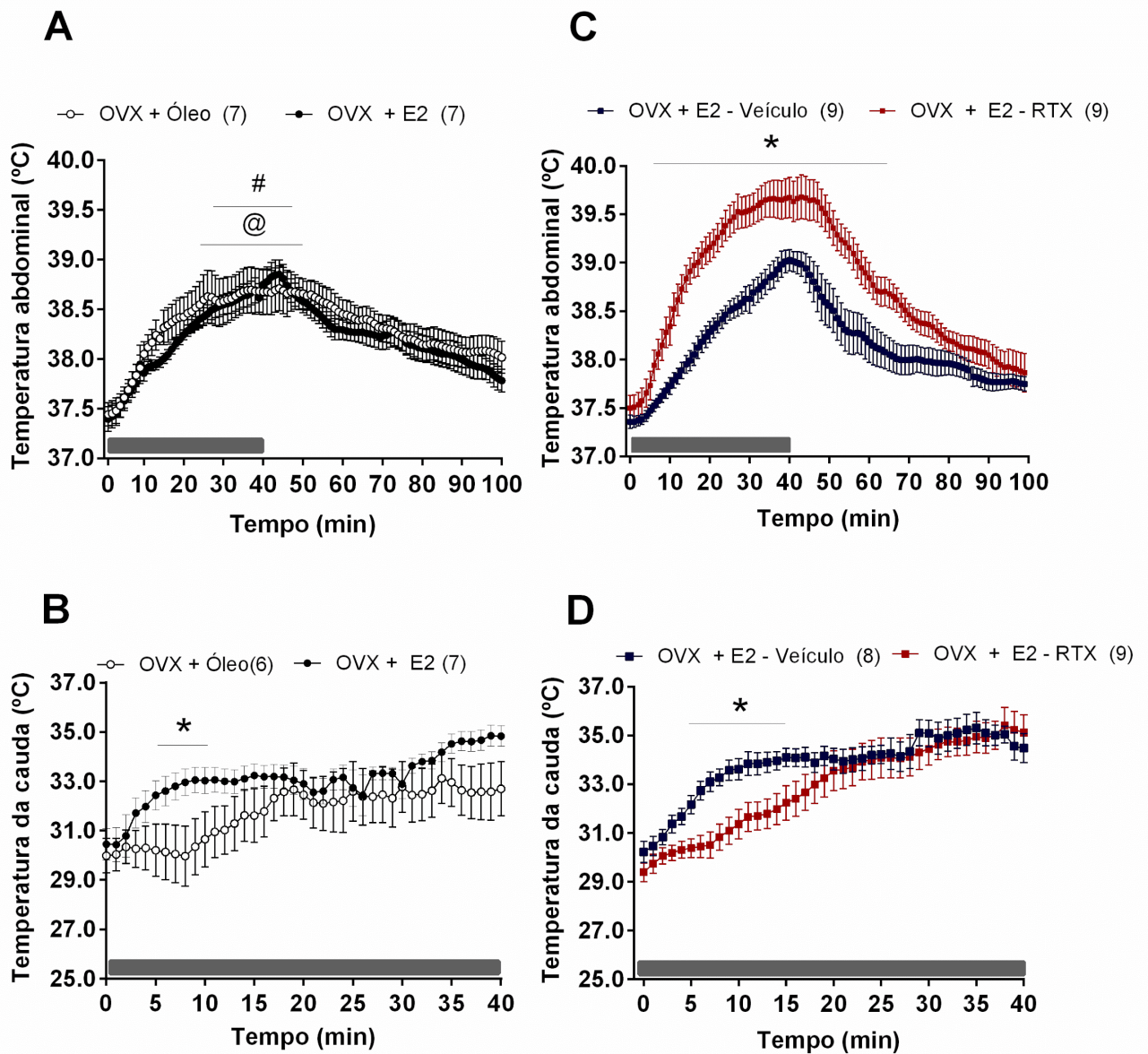
YAO, X.; KWAN, H.-Y.; HUANG, Y. Regulation of TRP channels by phosphorylation. **Neuro-Signals**, v. 14, n. 6, p. 273–280, 2005.

YAZĞAN, Y.; NAZIROĞLU, M. Ovariectomy-Induced Mitochondrial Oxidative Stress, Apoptosis, and Calcium Ion Influx Through TRPA1, TRPM2, and TRPV1 Are Prevented by 17 β -Estradiol, Tamoxifen, and Raloxifene in the Hippocampus and

Dorsal Root Ganglion of Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 7620–7638, 2017.

YOUNG, A.; DAWSON, N. Evidence for on–off control of heat dissipation from the tail of the rat. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 60, p. 392–8, 1982.

9. APENDICE



Avaliação das respostas termorregulatórias de ratas ovariectomizadas expostas ao ambiente aquecido. Variação da $T_{\text{abdominal}}$ (**A**) T_{cauda} (**B**) de ratas com implante óleo e estradiol. Variação da $T_{\text{abdominal}}$ (**C**) e T_{cauda} (**D**) de ratas com implante E2 que receberam injeção de veículo ou RTX. As barras de cor cinza representam o tempo de aquecimento. Os dados estão representados pela média \pm EPM. $n = 7-9$ animais por tratamento. #, $p < 0,05$ demonstra a elevação da $T_{\text{abdominal}}$ de ratas com implante E2 em relação ao primeiro minuto de aquecimento. @, $p < 0,05$ demonstra a elevação da $T_{\text{abdominal}}$ de ratas com implante óleo em relação ao primeiro minuto de

aquecimento. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Todas as análises foram obtidas pelo teste de variância de duas vias seguido pelo teste de *Tukey*.