

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

**EFEITOS DO ESTRADIOL E DOS CANAIS TRPV1 SOBRE A
TERMORREGULAÇÃO EM RATAS**

Flávia Magalhães Araújo

Belo Horizonte – MG

2016

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

**EFEITOS DO ESTRADIOL E DOS CANAIS TRPV1 SOBRE A
TERMORREGULAÇÃO EM RATAS**

Flávia Magalhães Araújo

Dissertação de mestrado 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 Mestre em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maristela de Oliveira Poletini

Belo Horizonte – MG

2016

**"EFEITOS DO ESTRADIOL E DOS CANAIS TRPV1 SOBRE A
TERMORREGULAÇÃO EM RATAS"**

FLÁVIA MAGALHÃES ARAÚJO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 26 de outubro de 2016, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. SAMUEL PENNA WANNER
EEFFTO/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. RAPHAEL ESCORSIM SZAWKA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRª. MARISTELA DE OLIVEIRA POLETINI
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

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

Belo Horizonte, 26 de outubro de 2016

Dedicatória

*Dedico este trabalho ao meu pai Antônio
e à minha irmã Camila pelo amor e carinho incondicional.
Ao Daniel pelo companheirismo, cumplicidade e incentivo.
À Flavinha pela linda amizade.
À toda minha família pela torcida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e perseverança durante a realização deste trabalho e por colocar as melhores pessoas e oportunidades em minha vida.

Ao meu pai Antônio, homem de caráter e completo nas duas funções que a vida lhe propôs, agradeço todo o amor, carinho, presença e dedicação. Tenho o senhor como a maior benção em minha vida e, por isso, retribuo com todo meu amor e gratidão.

Aos meus avós, por assumirem o papel de “segundos pais” e me dedicarem carinho e atenção.

À minha irmã Camila pelo apoio e companheirismo.

Ao Daniel pelo carinho, compreensão e incentivo. Você é meu exemplo de força de vontade e determinação. Com você aprendi a olhar sempre pra frente e jamais desistir dos sonhos que nos movem todos os dias. Obrigada por ser tão especial e engrandecer a minha vida. Agradeço também aos seus pais, D. Arlete e Sr. Joaquim e aos seus irmãos, Camila e Lucas, por me acolherem sempre com afeto e alegria.

Aos demais familiares pelo apoio e torcida.

À minha irmã de coração, Flavinha, que além de todos os momentos divididos em Ouro Preto, ainda se faz presente e essencial. Que a vida nos permita conduzir essa amizade com a mesma delicadeza e carinho de sempre.

À Prof.^a Maristela de Oliveira Poletini pela oportunidade, paciência e orientação. Além de uma excelente profissional, você se tornou amiga de cada uma das suas alunas, contribuindo com conselhos e palavras que nos fazem sentir cada vez mais confiantes de que somos capazes de alcançar o que almejamos. A pesquisa precisa de pessoas atenciosas e dedicadas como você.

À Prof.^a Leida Botion e suas alunas, em especial, Carolina Moreira, pela amizade e acolhimento.

Aos grandes amigos de laboratório - Nayara, Paola e Thaís pela paciência e boa vontade em ajudar em todos os momentos. Foram grandiosos os conhecimentos e experiências adquiridos com vocês. Obrigada por serem essenciais em minha vida e tornaram minha rotina de trabalho mais leve e repleta de alegria.

Ao Lucas pelos grandes ensinamentos e disponibilidade. Que a vida retribua toda sua dedicação em ajudar o próximo com muitas conquistas. Obrigada por ser tão solícito e me ajudar em todas as etapas de conclusão desse trabalho.

Ao Itamar, pela parceria e bela amizade. Que todo seu esforço e empenho te conduzam a um caminho repleto de realizações.

À Quezia por se tornar uma grande amiga e companheira durante esses dois anos.

À Andreza pela colaboração.

Ao Fred pela ajuda, paciência e boa vontade.

Às amigas de república pelo imenso carinho e momentos de descontração.

Aos amigos e professores do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo e Laboratório de Sinalização Intracelular de Cardiomiócitos pela amizade e excelentes momentos compartilhados.

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

Aos funcionários do biotério, em especial, Sílvio e Claudiomar, por serem tão solícitos e dispostos a colaborar.

Às técnicas de laboratório Simone e Luciana por não medirem esforços em me ajudar.

Aos funcionários da secretaria pela presteza.

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

À CAPES, FAPEMIG e FAPESP pelo financiamento.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALE - Atividade Locomotora Espontânea

APO - Área pré-óptica anterior

CCK - Colecistoquinina

E2 - Estradiol

ER- α - Receptores alfa de estrógeno

ER- β - Receptores beta de estrógeno

ICV - intracerebroventricular

IDC - Índice de Dissipação de Calor

i.m. - Intramuscular

i.p. - Intraperitoneal

NSQ - Núcleo Supraquiasmático

OVX - Ovariectomizadas

p.c. - Peso corporal

PRL - Prolactina

RTX - Resiniferatoxina

s.c. – Subcutâneo

SNC – Sistema Nervoso Central

TAM - Tecido adiposo marrom

T_{ambiente} - Temperatura ambiente

T_{cauda} - Temperatura da cauda

T_{interna} - Temperatura interna

TRP - Receptores de Potencial Transiente

TRPV1 - Receptor de Potencial Transiente Vanilóide1

UCP-1 - *Uncoupling Protein-1*

VO₂ - Volume de oxigênio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático dos canais TRPs.....	23
Figura 2 - Desenho esquemático da temperatura de ativação dos canais TRP em mamíferos.....	24
Figura 3 - Esquema dos circuitos neurais mostrando os locais onde a ativação de canais TRPV1 por capsaicina leva à hipotermia.....	26
Figura 4 - Representação esquemática para obtenção circadiana de T_{interna} e ALE de ratas OVX com implantes de óleo e de E2.....	30
Figura 5 - Representação esquemática da dessensibilização dos canais TRPV1 abdominais para registros de parâmetros circadianos cujo teste de CCK realizado nos dias 14 e 16 após o início do tratamento.....	31
Figura 6 - Representação esquemática da dessensibilização dos canais TRPV1 abdominais para registros de parâmetros circadianos cujo teste de CCK realizado nos dias 10 e 12 após o início do tratamento.....	31
Figura 7 - Representação esquemática para registros de T_{interna} e T_{cauda} de ratas OVX contendo implantes de óleo ou de E2 expostas a ambiente aquecido.....	32
Figura 8 - Representação esquemática para avaliação da taxa metabólica de ratas OVX contendo implantes de óleo e de E2 expostas a ambiente aquecido.....	33
Figura 9 - Representação esquemática dos canais TRPV1 abdominais no controle da T_{interna} e T_{cauda} de ratas OVX com implantes de E2 em ambiente aquecido cujo teste de CCK realizado nos dias 14 e 16 após o início do tratamento.....	34
Figura 10 - Representação esquemática dos canais TRPV1 abdominais no controle da T_{interna} e T_{cauda} de ratas OVX com implantes de E2 em ambiente aquecido cujo teste de CCK foi realizado nos dias 10 e 12 após o início do tratamento.....	34
Figura 11 - Representação esquemática do teste de CCK para avaliar a eficiência da dessensibilização.....	37

Figura 12 - Efeito dos tratamentos com E2 e RTX em ratas OVX e variação do peso corporal e ingesta alimentar durante o período de tratamento.....	41
Figura 13 - Variação circadiana de T_{interna} de ratas OVX com implantes de óleo e de E2.....	43
Figura 14 - Actograma representativo de ratas OVX com implantes de óleo e de E2.....	44
Figura 15 - Variação circadiana de T_{interna} de ratas OVX com implante de E2 tratadas ou não com RTX.....	45
Figura 16 - Actograma representativo de ratas E2 + Veículo e E2 + RTX.....	46
Figura 17 - Respostas termorregulatórias de ratas OVX com implantes de óleo e de E2 expostas a ambiente aquecido.....	48
Figura 18 - Parâmetros termorregulatórios de ratas OVX com implantes de óleo e de E2.....	49
Figura 19 - Consumo de oxigênio de ratas OVX com implantes de óleo e E2 expostas a ambiente aquecido.....	50
Figura 20 - Respostas termorregulatórias de ratas OVX com implante de E2, tratadas ou não com RTX, expostas a ambiente aquecido.....	52
Figura 21 - Parâmetros termorregulatórios de ratas OVX com implante de E2, tratadas ou não com RTX.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações complementares sobre peso corporal no início e fim do tratamento.....	41
Tabela 2 - Limiar e sensibilidade da dissipação de calor de ratas com implante de óleo, E2, E2 + Veículo e E2 + RTX.....	54

RESUMO

A menopausa se caracteriza por um período de transição na vida da mulher em que ocorre a interrupção da menstruação durante 12 meses após o término do período menstrual. Nessa fase, ocorre um comprometimento na secreção de hormônios ovarianos, dentre eles o estradiol (E2). Considerando os distúrbios comumente relatados, estão presentes as alterações vasomotoras, no ciclo sono vigília e na termorregulação. As ondas de calor, também conhecidas como *hot flushes*, se enquadram como a principal manifestação clínica de desconforto, acometendo aproximadamente 75% das mulheres de meia idade. Sabe-se que esse sintoma pode ser amenizado pela terapia de reposição hormonal por um mecanismo pouco elucidado. Além disso, muitos estudos apontam os canais Receptores Potencial Transiente Vanilóide 1 (TRPV1) como importantes componentes no controle termorregulatório. Diante disso, levantamos a hipótese de que este canal, assim como o E2, podem estar envolvidos no controle circadiano e homeostático de temperatura em ratas. Avaliamos, em ratas adultas ovariectomizadas (OVX), o efeito do E2 sobre as variações circadianas de temperatura interna (T_{interna}) e atividade locomotora espontânea (ALE) durante 4 dias. Para verificar a importância dos canais TRPV1 em associação com esse hormônio, ratas OVX tratadas com E2 receberam injeção intraperitoneal (i.p.) do agonista resiniferatoxina (RTX) na dose suficiente para promover a dessensibilização desses canais da cavidade abdominal. Os mesmos parâmetros rítmicos foram novamente analisados. O efeito do estradiol sobre a termorregulação foi avaliado durante a exposição a ambiente aquecido de 34°C por 40 minutos, período onde se mensurou a T_{interna} e T_{cauda} . Com estes valores calculou-se o limiar e a sensibilidade de dissipação de calor. A taxa metabólica também foi medida nas mesmas condições do ambiente aquecido por meio da análise do consumo de oxigênio (VO_2). Ratas tratadas com E2 que passaram pelo processo de dessensibilização com RTX também foram expostas ao ambiente aquecido e tiveram os mesmos parâmetros termorregulatórios analisados. A duração do tratamento com E2 em todos os protocolos experimentais foi de 14 dias e os animais tratados com veículo do estradiol (óleo de milho) e do RTX (etanol 20% em salina) compuseram os grupos controles. A temperatura interna (T_{interna}) foi obtida através de um sensor de telemetria implantado na cavidade abdominal e a

temperatura da cauda (T_{cauda}), utilizada para avaliar a capacidade de dissipação de calor, foi medida através de um termômetro de precisão. Os implantes de óleo ou de E2 foram colocados no dorso do animal, via subcutânea (s.c.). O peso relativo do útero e o teste de CCK provaram a eficácia dos tratamentos com E2 e RTX, respectivamente. Algumas diferenças de T_{interna} foram observadas entre ratas E2 e óleo durante a fase escura, mas não houve alteração na amplitude deste ritmo. Ratas E2 + RTX e E2 + Veículo também apresentaram maiores valores de T_{interna} predominantemente na fase escura, de forma que a amplitude desse ritmo foi maior nos animais dessensibilizados. A amplitude da ALE não foi alterada nos grupos tratados em relação aos respectivos grupos controle. Em relação à exposição ao ambiente aquecido, foi observado um aumento crescente na T_{interna} em ratas óleo e E2. No entanto, a dissipação de calor pela pele da cauda foi mais efetiva nesse último grupo. Este hormônio reduziu o limiar de dissipação de calor e aumentou a sensibilidade. Nas ratas E2 + RTX, a T_{interna} durante a exposição ao calor foi notavelmente maior que no grupo E2 + Veículo, que pode estar relacionado a um prejuízo na dissipação de calor pela pele da cauda. A ausência do canal TRPV1 abdominal também elevou o limiar de dissipação de calor e reduziu a sensibilidade nesses animais em relação ao grupo controle. Em conclusão, tanto o E2 quanto os canais TRPV1 são importantes para o controle circadiano e homeostático de temperatura, visto que a falta de um desses componentes compromete os mecanismos termorregulatórios de ratas. Assim, ambos se classificam como possíveis alvos terapêuticos que ajudam a explicar os mecanismos envolvidos nas ondas de calor presentes na menopausa.

Palavras-chave: temperatura corporal interna, resiniferatoxina, menopausa.

ABSTRACT

Menopause is characterized by a transition period in a woman's life when occurs menses interruption for 12 months after the end of the menstrual period. At this stage, there is a commitment in ovarian hormones secretion, including estradiol's secretion (E2). Considering the common reported disorders, there are vasomotor, sleep–wake cycle and thermoregulation changes. Heat waves, also known as hot flushes, are considered the main clinical manifestation of discomfort, affecting approximately 75% of middle-aged women. It is known that this symptom can be minimized by hormone replacement therapy although the mechanism for this is not well elucidated. In addition, many studies show Transient Receptor Potential Channel-Vanilloid 1 (TRPV1) as an important component in thermoregulatory control. Therefore, we hypothesized that this channel as well as E2 may be involved in the circadian and homeostatic control of temperature in female rats. We evaluated in ovariectomized adult female rats (OVX) E2's effects on the circadian rhythms in body core temperature variations (T_{core}) and spontaneous locomotor activity (ALE) for 4 days. To check the importance of the TRPV1 channel in association with this hormone, OVX rats treated with E2 received resiniferatoxin (RTX) agonist intraperitoneal injection (i.p.) at sufficient dose to cause desensitization of these channels in abdominal cavity. The same rhythmic parameters were analyzed again (body core temperature and ALE). The hormone's effects on thermoregulation were evaluated during heat challenge at 34 ° C for 40 minutes, when T_{core} and T_{skin} were measured. Based on these values, we calculated the threshold and the sensitivity to heat dissipation response. The metabolic rate was also measured under the same conditions of thermal challenge through oxygen consumption (VO_2) rates. E2 treated rats desensitized by RTX were also subjected to thermal challenge and the same thermoregulatory parameters were analyzed. The duration of E2 treatment in all experimental protocol was 14 days and the control groups were represented by animals treated with E2 vehicle (corn oil) and RTX (20% ethanol in saline). The core temperature (T_{core}) was obtained by implantation of a telemetric sensor in the abdominal cavity and the tail skin temperature (T_{skin}), used to evaluate the heat dissipation capacity, was measured by a precision thermometer. The implants containing oil or E2 were inserted subcutaneously (s.c.) in animal's backs. Relative

uterine weight and CCK test proved the effectiveness of treatments with E2 and RTX, respectively. Some differences were observed between T_{core} of E2-treated rats and oil-treated rats during dark phase, but there was no change in the amplitude rhythm. Groups of animals treated with E2 + RTX and E2 + vehicle also showed higher values of T_{core} predominantly in the dark phase, so the amplitude of this rhythm was higher in animals desensitized. ALE's amplitude did not change in the RTX-treated groups compared to respective control groups. In relation to thermal challenge, there was an increase in T_{core} of oil and E2 rats. However, the heat dissipation from tail skin was most effective in this last group. Estradiol reduced the threshold of heat dissipation and increased sensitivity. In the E2 + RTX rats, the T_{core} during thermal challenge was notably higher than the E2 + vehicle group, which may be related to impaired heat dissipation through tail skin. The absence of abdominal TRPV1 channel also increased the threshold for heat dissipation and reduced sensitivity in these animals compared to the control group. In conclusion, both the E2 as TRPV1 channels are important for homeostatic and circadian temperature control, whereas the lack of these components compromises thermoregulatory rats' mechanisms. So both are classified as potential therapeutic targets that help to explain the mechanisms involved in heat waves present in menopause.

Key words: core body temperature, resiniferatoxin, menopause.

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA.....	17
2. INTRODUÇÃO.....	18
2.1 Aspectos gerais da termorregulação.....	18
2.2 Estradiol e termorregulação.....	20
2.2.1 Estradiol e temperatura corporal interna.....	20
2.2.2 Estradiol e termogênese.....	22
2.3 Papel dos canais TRPV1 na termorregulação.....	23
2.4 Estradiol e canais TRPV1.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais.....	29
4.2 Delineamento experimental.....	29
4.2.1 Efeito do E2 sobre variações circadianas de $T_{interna}$ e ALE em ratas OVX.....	29
4.2.2 Efeito dos canais TRPV1 abdominais sobre as variações circadiana de $T_{interna}$ e ALE em ratas OVX tratadas com E2.....	30
4.2.3 Efeito do E2 sobre a $T_{interna}$ e capacidade de dissipação de calor pela pele da cauda (T_{cauda}) em OVX durante exposição a ambiente aquecido.....	31
4.2.3.1 Efeito do E2 sobre a produção de calor metabólico em ratas OVX.....	32
4.2.4 Efeito dos canais TRPV1 abdominais sobre a $T_{interna}$ e capacidade de dissipação de calor pela pele da cauda (T_{cauda}) em ratas OVX tratadas com E2 expostas a ambiente aquecido.....	33
4.3 Anestésicos e drogas.....	34
4.4 Ovariectomia.....	35
4.5 Implante do sensor e Registro da $T_{interna}$ e ALE.....	35
4.6 Dessensibilização dos canais TRPV1.....	36
4.7 Teste de colecistoquinina (CCK).....	36

4.8	Habituação e aquecimento dos animais.....	38
4.9	Cálculo do Limiar e Sensibilidade de dissipação de calor.....	39
4.10	Análise estatística.....	39
5.	RESULTADOS.....	40
5.1	Efeito dos tratamentos com E2 e RTX em ratas OVX.....	40
5.2	Efeito do E2 e dos canais TRPV1 abdominais sobre variações circadianas de T_{interna} e ALE em ratas OVX.....	42
5.3	Efeito do E2 no controle termorregulatório de ratas OVX durante exposição a ambiente aquecido.....	46
5.4	Efeito do E2 na produção de calor metabólico em ratas OVX durante exposição a ambiente aquecido.....	50
5.5	Efeito dos canais TRPV1 no controle termorregulatório de ratas OVX tratadas com E2 durante exposição a ambiente aquecido.....	51
6.	DISCUSSÃO.....	55
6.1	Efeito do E2 e dos canais TRPV1 sobre controle circadiano de T_{interna} e ALE.....	55
6.2	Efeito do E2 e dos canais TRPV1 sobre a T_{interna} durante a exposição a ambiente aquecido.....	58
7.	CONCLUSÃO.....	62
8.	REFERÊNCIAS.....	63

1 JUSTIFICATIVA

A menopausa é uma fase de transição na vida da mulher caracterizada pela redução da secreção estrogênica e de progesterona devido à falência dos folículos ovarianos (MORROW; MATTAIR; HORTOBAGYI, 2011). Dentre os sintomas mais comuns estão presentes as alterações vasomotoras, *hot flushes*, fadiga e comprometimento psicológico (DELANOË et al., 2012).

Estudos mostram que os *hot flushes* são a principal manifestação clínica de desconforto e os principais responsáveis pelo aumento da procura por médicos e redução da produtividade em mulheres de meia idade (SMITH et al; 2016).

Devido ao impacto das ondas de calor na qualidade de vida, este trabalho foi proposto com a finalidade de investigar os mecanismos fisiológicos envolvidos no controle de temperatura que possibilitem o melhor entendimento na geração desse sintoma.

2 INTRODUÇÃO

2.1 Aspectos gerais da termorregulação

Dentre as diversas estruturas centrais envolvidas no controle da temperatura, o núcleo supraquiasmático do hipotálamo (NSQ), tem se destacado como um importante componente nesse processo. Considerado o relógio central em mamíferos, esse núcleo é capaz de receber informações fóticas através de células especializadas presentes na retina e traduzi-las em sinais neurais e humorais que sincronizam os ritmos corporais ao ciclo claro/escuro, além de ser capaz de gerar esses ritmos mesmo na ausência de pistas ambientais (LOWREY; TAKAHASHI, 2011). Assim, observamos que alguns fenômenos fisiológicos, como as oscilações de temperatura interna, secreção de hormônios e atividade locomotora ocorrem em um período aproximado de 24 horas, sendo, portanto, classificados como circadianos (ALBRECHT, 2012).

Estudos realizados com hamsters mostraram que a lesão do NSQ compromete a manifestação de diversos ritmos endógenos, como a temperatura interna, secreção de hormônios, e atividade locomotora espontânea (ALE). No entanto, quando esses animais foram transplantados com tecido de NSQ fetal sadio, alguns parâmetros circadianos voltaram a apresentar ritmicidade, como a ALE (LEHMAN et al., 1987).

Essa diversidade de ritmos controlados pelo NSQ se deve às numerosas projeções enviadas para diferentes regiões cerebrais, localizadas dentro e fora do hipotálamo. Assim, a comunicação existente entre esse núcleo e a área pré-óptica anterior (APO), principal região envolvida no controle termorregulatório, tem sido proposta como a responsável por controlar as variações circadianas de temperatura interna (BUIJS et al., 2003).

Sabe-se que a temperatura corporal interna de mamíferos é mantida dentro de uma faixa estreita de variação, independente das flutuações que ocorrem na temperatura ambiente. Essa manutenção térmica é possível porque existe uma interação contínua entre mecanismos circadianos e homeostáticos através da ação integrada de núcleos hipotalâmicos que processam as informações de temperatura (CHAPPUIS et al., 2013).

O controle homeostático de temperatura pode ser dividido em 3 partes: aferentes sensoriais, integração e eferentes sensoriais. Informações térmicas são percebidas por termossensores presentes na pele, vísceras e regiões cerebrais e são transmitidas, através da medula espinhal, para o centro termorregulador – área pré-óptica do hipotálamo (APO). Esta, por sua vez, reúne essas informações e, através de eferências sensoriais, promove o controle da temperatura (ROMANOVSKY et al., 2009; NAKAMURA, 2011).

São propostos alguns modelos de circuitos neuronais envolvidos no controle autonômico e somático da temperatura para garantir a sobrevivência dos organismos.

Em ambientes quentes, por exemplo, o calor ativa terminações nervosas presentes na pele que geram potenciais de ação em uma extensa rede neuronal aferente que vai desde o gânglio da raiz dorsal até a APO. Nesse núcleo, ocorre estimulação de neurônios gabaérgicos sensíveis ao calor que, ao processar essas informações de temperatura, geram eferências que impedem a liberação de neurotransmissores simpáticos. Como resultado, ocorre supressão dos mecanismos de vasoconstrição cutânea e termogênese pelo tecido adiposo marrom (TAM), evitando o aumento nocivo da temperatura interna (ROMANOVSKY et al., 2009; NAKAMURA, 2011).

O mecanismo de defesa contra o frio é oposto ao que acontece no ambiente quente, de forma que as aferências que chegam à APO inibem neurônios gabaérgicos sensíveis ao calor. Em consequência, a resposta eferente provoca liberação de neurotransmissores simpáticos que irão promover a vasoconstrição cutânea e a termogênese pelo TAM, impedindo a redução brusca de temperatura (ROMANOVSKY et al., 2009; NAKAMURA, 2011).

Além do controle autonômico, existem respostas comportamentais envolvidas na regulação da temperatura. Em roedores, o “*grooming*”, que consiste em espalhar a saliva na pele durante exposição em ambientes quentes, é uma forma efetiva de perda de calor por evaporação (NAGASHIMA et al., 2000). A redução da atividade locomotora e o urijar dos pêlos também ajudam a manter a temperatura interna em ambientes frios (GAVVA, 2008).

Juntos, os mecanismos circadianos, homeostáticos e comportamentais compõem um sistema eficaz de controle que garante a manutenção da temperatura interna em diferentes condições ambientes.

2.2 Estradiol e termorregulação

2.2.1 Estradiol e temperatura corporal interna

O estradiol é um hormônio derivado do colesterol que atua em várias partes do corpo, como cérebro, hipófise, tecido ósseo, sistema imune, dentre outros. Receptores nucleares denominados ER- α (receptores alfa de estrógeno) e ER- β (receptores beta de estrógeno) são amplamente expressos em diversos tecidos (WEND; WEND; KRUM, 2012), garantindo o amplo espectro de ação desse hormônio.

Alguns estudos sugerem que a atividade neuronal circadiana do NSQ pode ser regulada por hormônios sexuais, uma vez que esses receptores nucleares de estrógenos foram encontrados nesse núcleo (ZUCKER; FITZGERALD; MORIN, 1980; BAILEY; SILVER; 2014).

Em experimentos realizados *in vitro*, Fatehi e Fatehi-hassanabad (2008) confirmaram que o estradiol é capaz de aumentar a excitabilidade de células do NSQ, demonstrando o possível envolvimento deste hormônio na geração de ritmos circadianos.

A menopausa é caracterizada como um período na vida da mulher em que cessam os episódios menstruais devido à falência ovariana (DUARTE; TRIGO; PAIM; 2016). Como resultado, ocorre redução nos níveis de hormônios estrogênicos e de progesterona, com conseqüente aumento das gonadotrofinas (FEBRASGO, 1995).

Alguns parâmetros circadianos são alterados em conseqüência da redução das concentrações plasmáticas de estradiol. Como exemplo, ocorre elevação da temperatura interna e distúrbios do sono, sendo que esse último fator pode ser uma das causas do aumento da temperatura (SHINOHARA et al., 2000, MURPHY; CAMPBELL, 2007). O ritmo de atividade locomotora também varia de acordo com as concentrações desse hormônio, de forma que ratas e hamsters antecipam o início de atividade e aumentam a amplitude desse ritmo na noite de proestro (NAKAMURA et al, 2001; CARDOSO, 2015).

As respostas termorregulatórias são controladas por um sistema hierárquico de estruturas neurais, sendo que a área pré-óptica do hipotálamo anterior é a principal região envolvida na vasodilatação cutânea (BOULANT, 2000).

Silvia e Boulant (1986) demonstraram em experimentos *in vitro* que o estradiol afeta a atividade elétrica de neurônios termosensíveis na área pré-óptica. Essa ação pode ser explicada pela existência de receptores de estradiol em neurônios presentes em diversas regiões no cérebro do rato, com grande densidade no hipotálamo (SIMERLY et al 1990).

A redução do estradiol em decorrência da menopausa ou ovariectomia está associada a alguns sintomas que incluem alterações vasomotoras, ganho de peso e oscilação do humor (MORROW; MATTAIR; HORTOBAGYI, 2011).

As ondas de calor, também conhecidas como *hot flushes*, representam a maior manifestação clínica de desconforto na menopausa, acometendo mais de 75% das mulheres (MORROW; MATTAIR; HORTOBAGYI, 2011). Eles ocorrem em função de uma desordem central com ativações episódicas de perda de calor e sudorese, mas o mecanismo completo ainda é pouco compreendido (DACKS; RANCE, 2010). Sabe-se que a terapia de reposição hormonal com estrogênios alivia esses sintomas vasomotores (OPAS et al., 2006).

Estudos mostram que os *hot flushes* ocorrem em função de um aumento da sensibilidade de vias hipotalâmicas que controlam efetores da dissipação de calor. Assim, dentre as alterações fisiológicas aparentes, estão a vasodilatação cutânea, com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo e aumento da temperatura da pele devido à perda de calor (DACKS; RANCE, 2010). Em ratos, a resposta autonômica de vasodilatação da pele da cauda representa o principal mecanismo envolvido na termorregulação (GORDON, 1990).

A zona termoneutra pode ser definida como a faixa de temperatura ambiente (T_{ambiente}) em que a termorregulação ocorre apenas por perda de calor seco através do tônus vasomotor cutâneo (DACKS; RANCE, 2010).

Estudos prévios realizados com ratas OVX contendo implantes salina (grupo controle) e E2 (grupo tratado) mostraram que as ratas tratadas com esse hormônio estão na zona termoneutra em maiores valores de T_{ambiente} quando comparado às ratas OVX + salina. Isso quer dizer que a dissipação de calor nas ratas tratadas com E2 ocorre mais tardiamente que no grupo controle (DACKS; RANCE, 2010). Essa situação se aproxima ao que acontece em mulheres na menopausa, cuja redução das concentrações plasmáticas de E2 faz com que elas tenham episódios frequentes de ondas de calor, devido a pequenos aumentos na temperatura corporal interna (FREEDMAN, 2005).

Em um estudo realizado com mulheres para avaliar o limiar de sudorese durante exposição a ambiente aquecido ou exercício na bicicleta, foi observado em mulheres que apresentavam *hot flushes* uma menor faixa de temperatura em que se encontra na zona termoneutra quando comparado às mulheres assintomáticas (FREEDMAN, 2005). Esses resultados corroboram os achados nas ratas, demonstrando a importância do E2 em promover a homeostase térmica (DACKS; RANCE, 2010).

Baseado no trabalho de Dacks e Rance (2010), nos perguntamos como seria o controle termorregulatório de ratas em uma temperatura ambiente fora da zona termoneutra. Para avaliar isso, ratas OVX com implante de óleo e de E2 foram expostas a ambiente aquecido de 34 °C durante 40 minutos para registro das temperaturas interna e da cauda.

2.2.2 Estradiol e termogênese

A termogênese, ou produção de calor metabólico, ocorre em todos os tecidos corporais, em maiores ou menores proporções. No entanto, o tecido adiposo marrom (TAM) é o principal responsável por esse processo em muitas espécies (MORRISON; MADDEN; TUPONE, 2014). É um tecido rico em mitocôndrias que utilizam a oxidação de ácidos graxos e glicose para gerar calor (CANOON; NEDERGAARD, 2004).

A membrana mitocondrial do adipócito do tecido adiposo marrom possui uma proteína desacopladora chamada UCP-1 (*Uncoupling Protein-1*), também conhecida como termogenina. Essa proteína tem a função de desviar prótons da ATP-sintase, fazendo com que a energia estocada na mitocôndria seja dissipada na forma de calor. Esse processo ocorre desacoplado da produção de ATP, por isso a origem do nome (CANOON; NEDERGAARD, 2004).

A termogênese no tecido adiposo marrom é alterada em resposta à sensação cutânea e visceral de frio ou calor para proteger o cérebro e demais tecidos. Condições que demandam aumento da taxa metabólica não são sustentadas em baixas concentrações de combustíveis, como volume de oxigênio, glicose e lipídeos (MORRISON; MADDEN; TUPONE, 2014).

Estudos mostram que a ação central do estradiol resulta na ativação da termogênese pelo tecido adiposo marrom quando administrado via

intracerebroventricular (ICV). Esse hormônio também participa de mecanismos periféricos de vasodilatação cutânea (MORENTIN et al., 2014).

2.3 Papel dos canais TRPV1 na termorregulação

Os canais TRPs foram descobertos em moscas do gênero *Drosophila*, cuja importância está relacionada à condução de sinais visuais pelos fotorreceptores presentes na retina (MONTELL; RUBIN, 1989). Após um experimento com mutantes para TRP, foi observado um prejuízo em resposta ao sinal luminoso, demonstrando a importância desse canal nesse processo (MONTELL, 2003).

Sabe-se hoje que os canais TRP respondem a uma série de estímulos, e não apenas à luz (RAMSEY; DELLING; CLAPHAM, 2005). Dentre estes, estão presentes a temperatura, pressão, ligantes químicos, estresse mecânico e osmótico (BAYLIE; BRAYDEN, 2011).

A superfamília dos Receptores de Potencial Transiente (TRP) é composta por 30 canais que são divididos em 6 subfamílias em mamíferos, identificadas como: TRPC (canônico), TRPV (vanilóide), TRPM (melastatina), TRPML (mucoliptina), TRPP (policistina), e TRPA (anquirina) (ROMANOVSKY, 2007). Dessa totalidade, 11 canais são ativados por temperatura, de forma que TRPM8, TRPA1 e TRPC5 são ativados pelo frio e TRPV1–4 e TRPM2–5 são ativados pelo calor (WANG; SIEMENS, 2015; HUDSON et al., 2016).

A figura 1 mostra a estrutura dos canais TRPs, formado por 4 subunidades idênticas, com 6 domínios transmembrana cada uma e um poro entre os domínios 5 e 6 que permite a passagem de cátions (POLETINI et al., 2015).

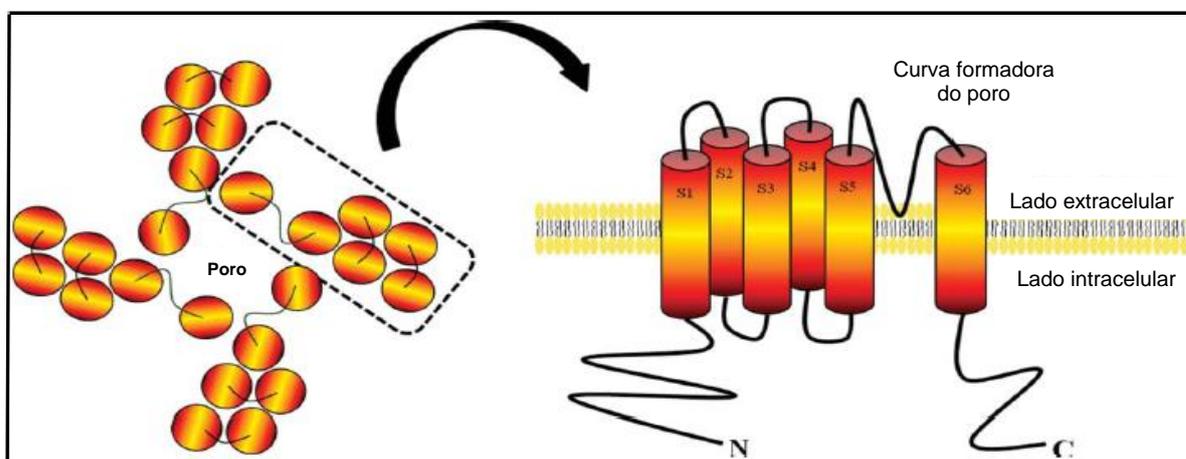


Figura 1 – Desenho esquemático dos canais TRPs (POLETINI et al, 2015).

A ativação de cada canal ocorre em faixas estreitas de temperatura, que variam do frio nocivo ao calor nocivo. Essa característica faz com que esses canais sejam de extrema importância para atuar como sensores de temperatura em tecidos periféricos (ROMANOVSKY, 2007). A figura 2 mostra as faixas de temperatura em que cada canal TRP é ativado em mamíferos.

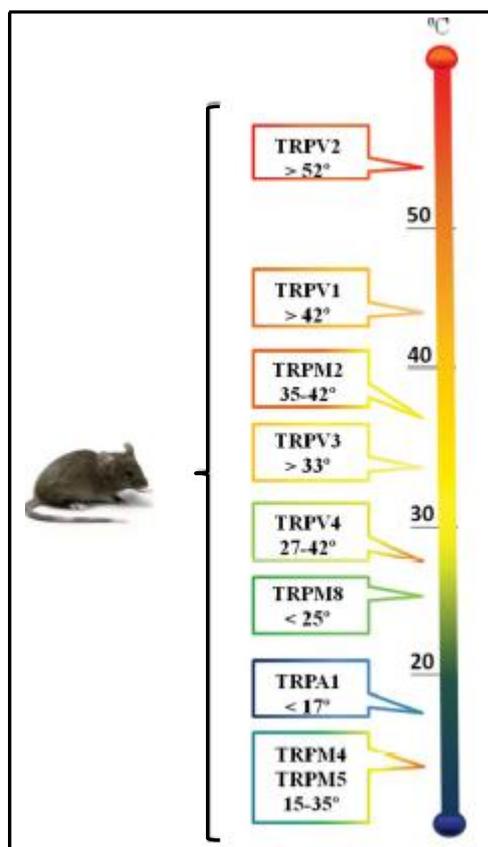


Figura 2 - Desenho esquemático que representa a temperatura de ativação dos canais TRP em mamíferos (Adaptado de POLETINI et al, 2015).

A subfamília TRPV é composta por 6 membros que podem ser divididos em dois grupos: TRPV1-4 e TRPV5-6. O primeiro grupo é ativado através do aquecimento e, pelo fato de estarem presentes em diversos tecidos, são responsáveis por impedir grandes variações de temperatura, garantindo a homeostase térmica (RAMSEY; DELLING; CLAPHAM, 2005). Além disso, alguns estudos mostram que os canais TRPV1, o fundador dos TRPVs, estão envolvidos no controle circadiano de temperatura (SZELENYI et al., 2004; JEONG; SEONG, 2014).

O canal TRPV1 também é conhecido como receptor de capsaicina ou vanilóide (RAMSEY; DELLING; CLAPHAM, 2005). Trata-se de um canal de cátions não

seletivo, cuja abertura é facilitada por fatores como baixo pH, calor nocivo e moléculas endógenas (GAVVA et al., 2008; CATERINA, 2008; MILLS et al., 2008). Embora os canais TRPV1 sejam ativados por elevadas temperaturas *in vitro* (> 42°C), a presença de moléculas endógenas, como vanilóides e prótons diminuem a temperatura de ativação desses canais *in vivo*, fazendo com que o limiar de ativação seja próximo a valores fisiológicos, tornando-os tonicamente ativos (CATERINA, 2008; MILLS et al., 2008; ROMANOVSKY et al., 2009).

Em relação à distribuição corporal, canais TRPV1 são amplamente expressos em tecidos, sendo sua função descoberta através de estudos com neurônios sensoriais, local em que foi identificado pela primeira vez (RAMSEY; DELLING; CLAPHAM, 2005). São encontrados em terminações periféricas mielinizadas (A δ) e não mielinizadas (fibra C) no gânglio da raiz dorsal e em aferentes no trato gastrointestinal, pele e músculos (ROMANOVSKY et al., 2009). A APO é uma das principais regiões envolvida na termorregulação, na qual os canais TRPV1 têm sido propostos como os responsáveis por controlar a temperatura em mamíferos (CATERINA, 2007; MILLS et al., 2008). No entanto, esses canais são encontrados também em outras regiões cerebrais e em tecidos periféricos não neuronais (ROMANOVSKY et al., 2009).

A utilização de substâncias que ativam ou bloqueiam farmacologicamente o TRPV1 possibilitou um enorme avanço nos estudos desses canais e o seu envolvimento 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).

O efeito imediato dessas substâncias como agonistas é provocar uma hipotermia, seguida por hipertermia em diferentes espécies de animais (MILLS et al., 2008). A figura 3 ilustra os possíveis mecanismos que levam à redução da temperatura em resposta ao calor ou capsaicina. O número 1 representa a via em que o calor ativa fibras cutâneas e viscerais sensíveis ao calor cujos corpos celulares estão localizados no gânglio da raiz dorsal e ascendem pelo trato espinotalâmico até alcançar a ponte, e em seguida a área pré-óptica do hipotálamo, onde ocorre estimulação de neurônios sensíveis ao calor e inibição dos neurônios sensíveis ao frio. Além disso, existem canais TRPV1 nos terminais pré-sinápticos da

ponte ou outras regiões cerebrais que estimulam neurônios sensíveis ao calor (2) e inibem neurônios sensíveis ao frio (3) na área pré-óptica do hipotálamo. O número 4 representa a ativação direta dos canais TRPV1 nos neurônios sensíveis ao calor por vanilóides endógenos (Adaptado de CATERINA, 2007).

Interessantemente, variações da temperatura induzidas por capsaicina não são observadas em animais *knockout* para TRPV1, demonstrando a especificidade da ação desta substância sobre os canais TRPV1 e o envolvimento dos mesmos no controle da temperatura interna (STEINER et al., 2007; GAVVA et al., 2008).

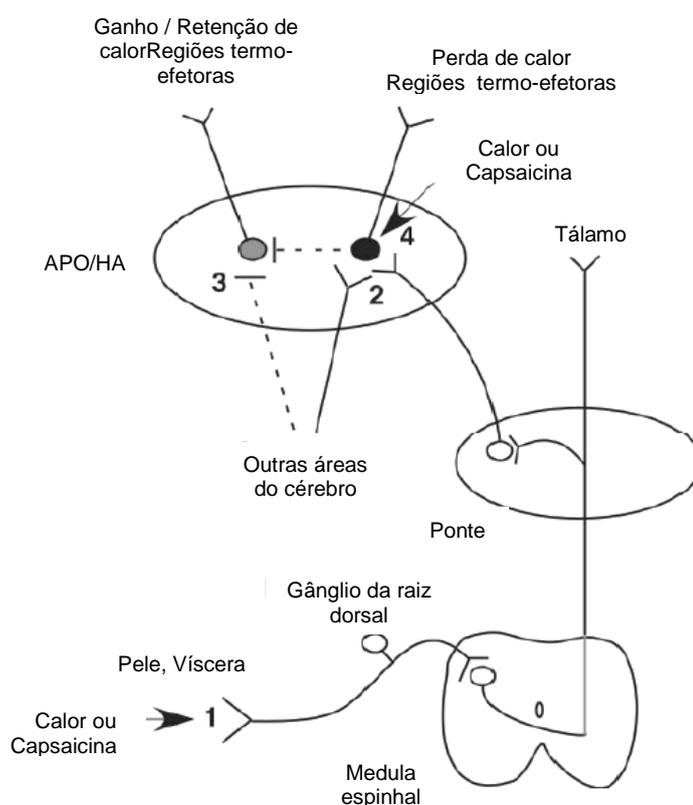


Figura 3 - Esquema dos circuitos neurais mostrando os locais onde a ativação de canais TRPV1 por capsaicina leva à hipotermia (CATERINA, 2007).

Outra importância farmacológica do RTX e capsaicina está relacionada à capacidade de dessensibilização dos canais TRPV1. Essas substâncias, quando administradas em elevadas doses, provocam uma mudança conformacional no canal, inativando-o, ou até mesmo, ocasionam destruição completa dos neurônios que expressam os canais TRPV1 (ROMANOVSKY et al., 2009). Estudos mostraram que animais dessensibilizados apresentam grave elevação da temperatura interna quando expostos ao calor, enquanto os animais controles apresentaram

mecanismos eficientes de controle de temperatura nessas mesmas condições (MILLS et al, 2008).

O tratamento com antagonistas também é uma ferramenta muito utilizada para investigar a funcionalidade desses canais. A resposta imediata encontrada após administração da maioria dessas substâncias é a hipertermia, principalmente por bloquear a ativação dos canais TRPV1 por prótons (GARAMI et al., 2010). No entanto, nem todo antagonista é responsável pela elevação da temperatura. A capsazepina é um exemplo dessa exceção, visto que ela não é capaz de bloquear a ativação dos canais TRPV1 por prótons em ratos (ROMANOVSKY et al., 2009, GARAMI et al., 2010).

2.4 Estradiol e canais TRPV1

Os canais TRPV1 estão presentes em diversas partes do sistema nervoso central (SNC) e em alguns tecidos periféricos, dentre eles, o útero. No entanto, a sua função nesse órgão ainda é pouco compreendida (POHÓCZKY et al., 2016). Pohócksky e colaboradores (2016) demonstraram em seus experimentos que o tratamento com agonista não seletivo dos receptores de estrogênio aumenta a expressão de canais TRPV1 e TRPA1 no endométrio tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Além disso, outros estudos sugerem que o aparecimento de doenças neurodegenerativas em mulheres na pós-menopausa pode estar relacionado à redução das concentrações plasmáticas de estradiol e ao aumento do estresse oxidativo devido ao aumento do influxo de cálcio no momento da ativação de canais TRPs, dentre eles o canal TRPV1. Dessa forma, esse mesmo estudo propõe a modulação do estradiol sobre esses canais como um fator protetor no surgimento dessas doenças (YAZĞAN; NAZIROĞLU., 2016).

Corroborando esses achados, outro trabalho mostra que animais *Knockout* para ER- α e ER- β apresentam uma redução da expressão de canais TRPV1 no gânglio da raiz dorsal (CHO; CHABAN., 2012), componente importante da via ascendente da termorregulação.

Com base nessas evidências, o presente estudo avaliou a participação dos canais TRPV1, juntamente com E2 sobre as respostas termorregulatórias de ratas expostas a ambiente aquecido.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do E2 e dos canais TRPV1 sobre a termorregulação em ratas ovariectomizadas (OVX).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do E2 sobre as variações circadianas de T_{interna} e ALE em ratas OVX;

- Avaliar o efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 sobre as variações circadianas de T_{interna} e ALE em ratas OVX tratadas com E2;

- Avaliar o efeito do E2 sobre T_{interna} e T_{cauda} em ratas OVX durante exposição a ambiente aquecido;

- Avaliar o efeito do E2 sobre a taxa metabólica de ratas OVX durante a exposição a ambiente aquecido;

- Avaliar o efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 sobre a T_{interna} e T_{cauda} de ratas OVX tratadas com E2 durante a exposição a ambiente aquecido.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

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 claro/escuro de 12/12 horas à temperatura ambiente de 24°C com livre acesso a água e ração.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), protocolo de número 33/2015.

Em todos os delineamentos experimentais as ratas foram ovariectomizadas (OVX) e, após 7 dias, foi inserido um implante *sillastic* (1,02 x 2,16 x 0,2 mm) de 2,0 cm de comprimento, contendo óleo de milho ou 17- β -estradiol (180 μ g/mL - E2) (DACKS; RANCE, 2010), via subcutânea (s.c). A partir desse momento as ratas foram colocadas em caixas individuais. A eutanásia aconteceu por decapitação para obtenção do plasma e retirada de tecidos. Os experimentos em que os animais foram expostos ao ambiente aquecido foram realizados entre 12:00 e 14:00 horas. Os animais que passaram pelo teste de CCK permaneceram em jejum de 24 horas antes da realização de cada teste.

4.2 Delineamento experimental

4.2.1 Experimento 1 - Efeito do E2 sobre variações circadianas de $T_{interna}$ e ALE em ratas OVX

Ratas foram submetidas ao procedimento cirúrgico de ovariectomia e, após 7 dias, foi iniciado o tratamento com implantes de E2 (grupo tratado) ou de óleo (grupo controle). Neste mesmo dia foi inserido um sensor de telemetria na cavidade abdominal. Após 10 dias de tratamento, esses animais foram colocados na placa receptora de telemetria para início dos registros $T_{interna}$ e ALE. No 14º dia, os registros foram interrompidos e as ratas eutanasiadas (Figura 4).

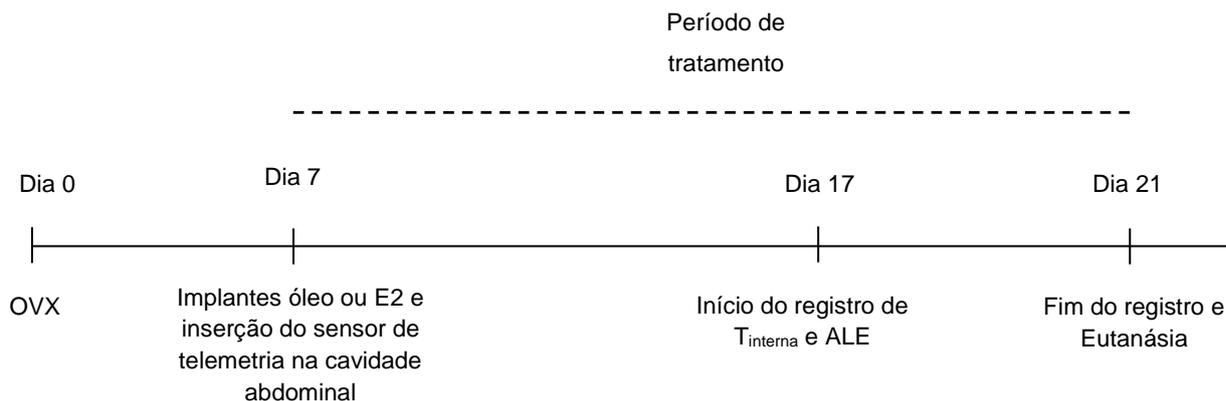


Figura 4 - Representação esquemática para obtenção circadiana de T_{interna} e ALE de ratas OVX contendo implantes de óleo e de E2.

4.2.2 Experimento 2 - Efeito dos canais TRPV1 abdominais sobre as variações circadianas de T_{interna} e ALE em ratas OVX tratadas com E2

Ratas foram submetidas ao procedimento cirúrgico de OVX e, após 7 dias, foi iniciado o tratamento com implantes de E2. Neste mesmo dia foi realizada a dessensibilização dos canais TRPV1 da região abdominal por meio de uma injeção intraperitoneal (i.p.) de RTX no grupo tratado (E2 + RTX), ou veículo (E2 + Veículo). O sensor de telemetria foi inserido na cavidade abdominal de alguns animais. As ratas destinadas exclusivamente para o teste de CCK não tiveram a implantação do sensor, pois não passaram pela etapa de obtenção dos dados na placa. No 10º dia de tratamento iniciaram-se os registros de T_{interna} e ALE. No 14º dia de tratamento os registros foram interrompidos. Nesse mesmo dia foi realizado o primeiro teste de CCK nas ratas destinadas a esse teste. O segundo teste foi repetido após 2 dias. Ao final do teste, todas as ratas foram eutanasiadas (Figura 5).

Para verificar se o tempo de dessensibilização altera os registros circadianos e o teste de CCK, o mesmo protocolo acima foi repetido, mas o início dos registros aconteceu após 6 dias da injeção de RTX e o primeiro teste de CCK ocorreu junto com o término dos registros, no 10º dia de tratamento. O segundo teste foi repetido após 2 dias. Em seguida as ratas foram eutanasiadas (Figura 6).

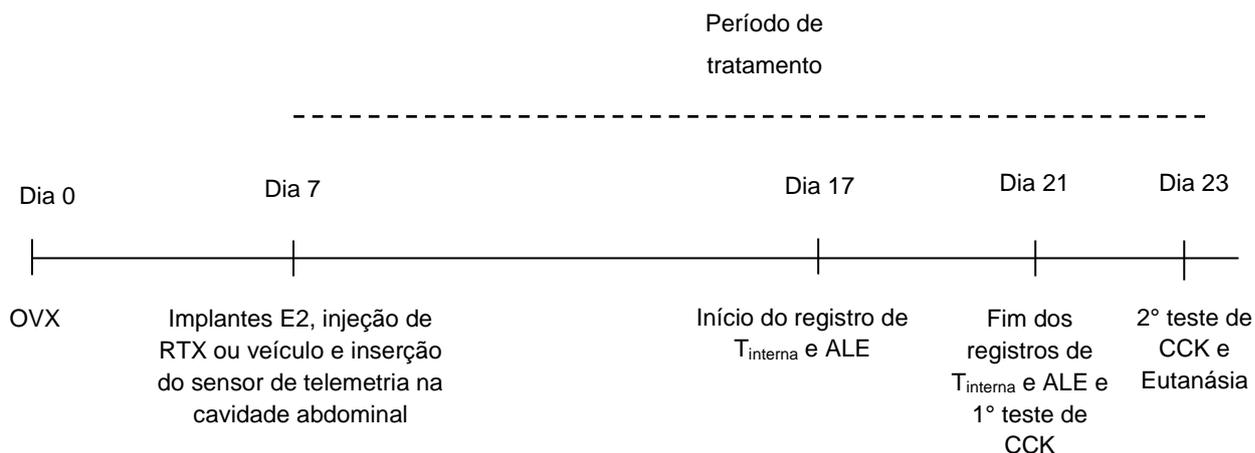


Figura 5 - Representação esquemática da dessensibilização dos canais TRPV1 abdominais para obtenção circadiana de T_{interna} e ALE de ratas OVX contendo implantes E2. O teste de CCK realizado nos dias 14 e 16 após o início do tratamento.

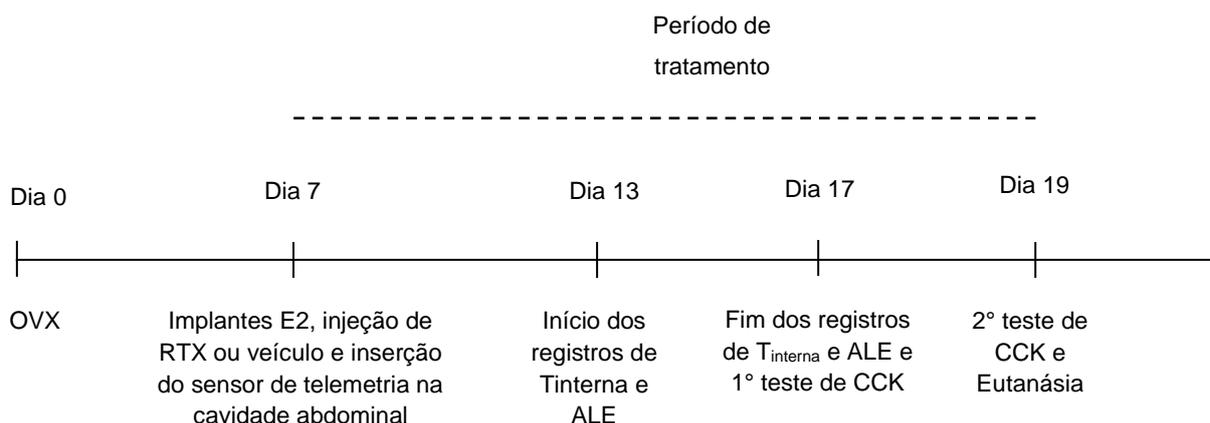


Figura 6 - Representação esquemática da dessensibilização dos canais TRPV1 abdominais para obtenção circadiana de T_{interna} e ALE de ratas OVX contendo implantes E2. O teste de CCK realizado nos dias 10 e 12 após o início do tratamento.

4.2.3 Experimento 3 - Efeito do E2 sobre a T_{interna} e capacidade de dissipação de calor pela pele da cauda (T_{cauda}) em ratas OVX durante exposição a ambiente aquecido.

Ratas foram submetidas ao procedimento cirúrgico de ovariectomia e, após 7 dias, iniciou-se o tratamento crônico com implantes de E2 (grupo tratado) ou de óleo (grupo controle). Foi inserido também um sensor de telemetria na cavidade abdominal. A partir do 9º dia de tratamento as ratas foram habituadas diariamente

ao termômetro da cauda. No 14º dia, esses animais foram expostos a ambiente aquecido de 34°C durante 40 minutos. A T_{interna} e a T_{cauda} foram registradas a cada minuto. Após 1 hora do fim do aquecimento, os animais foram eutanasiados (Figura 7).

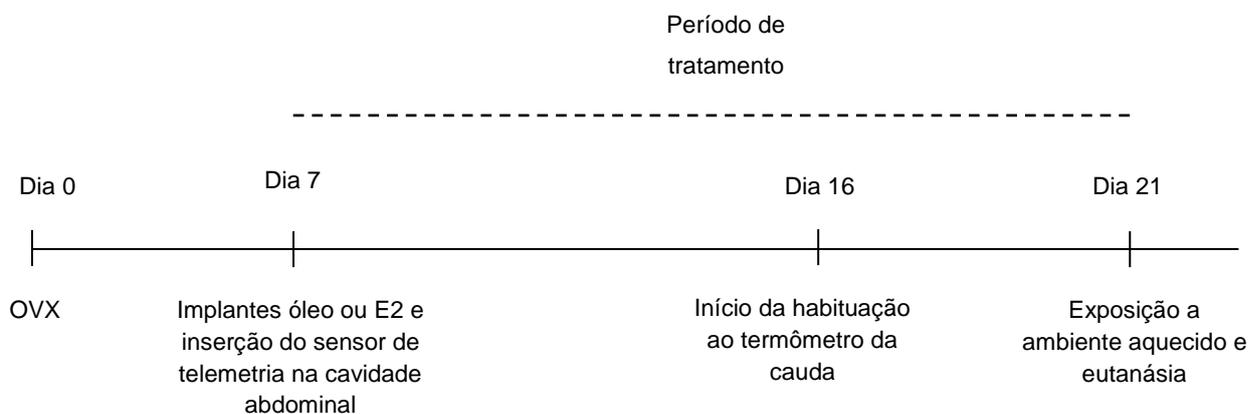


Figura 7 - Representação esquemática para obtenção de T_{interna} e T_{cauda} de ratas OVX contendo implantes de óleo ou de E2 em ambiente aquecido.

4.2.3.1 - Efeito do E2 sobre a produção de calor metabólico em ratas OVX

Ratas foram submetidas ao procedimento cirúrgico de OVX e, após 7 dias, foi iniciado o tratamento crônico com implantes E2 (grupo tratado) e óleo (grupo controle). No 9º dia de tratamento, iniciou-se a habituação à caixa metabólica. No 14º dia, uma rata óleo e uma E2 foram colocadas (uma por vez) dentro da caixa metabólica fechada a 34°C durante 40 minutos. A taxa metabólica foi medida através do consumo de oxigênio (VO_2) utilizando um calorímetro de fluxo aberto indireto (*Panlab, Harvard Apparatus, Spain*), e continuamente registrado através de um sistema informatizado. Um termômetro colocado dentro da caixa permitiu o controle da temperatura ambiente. Após 1 hora do fim do aquecimento as ratas foram eutanasiadas (Figura 8).

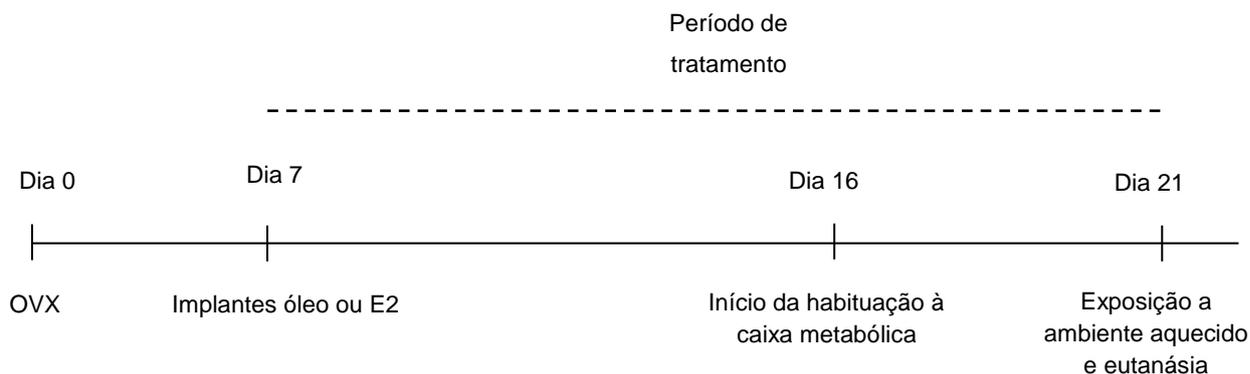


Figura 8 - Representação esquemática para avaliação da taxa metabólica de ratas OVX contendo implantes de óleo e de E2 em ambiente aquecido.

4.2.4 Experimento 4 – Efeito dos canais TRPV1 abdominais sobre a T_{interna} e capacidade de dissipação de calor pela pele da cauda (T_{cauda}) em ratas OVX tratadas com E2 expostas a ambiente aquecido

Ratas foram submetidas ao procedimento cirúrgico de ovariectomia, e após 7 dias, iniciou-se o tratamento com implantes de E2. Neste mesmo dia foi realizada a dessensibilização dos canais TRPV1 abdominais através da injeção intraperitoneal (i.p.) de RTX no grupo tratado (E2 + RTX) ou veículo (E2 + Veículo). O sensor de telemetria foi inserido na cavidade abdominal de alguns animais. As ratas destinadas exclusivamente para o teste de CCK não tiveram a implantação do sensor, pois não passaram pela etapa de obtenção dos dados na placa. No 9º dia de tratamento, iniciou-se a habituação dos animais ao termômetro da cauda. No 14º dia as ratas foram expostas a ambiente aquecido de 34°C durante 40 minutos. A T_{interna} e T_{cauda} foram registradas a cada minuto. Após 1 hora do fim do aquecimento, as ratas foram eutanasiadas. Nesse mesmo dia foi realizado o primeiro teste de CCK. O segundo teste foi feito após 2 dias (16º dia de tratamento). Em seguida as ratas foram eutanasiadas (Figura 9).

Para verificar se o tempo de dessensibilização altera os registros de temperatura e o teste de CCK, o mesmo protocolo acima foi repetido, mas a habituação iniciou após 5 dias de tratamento e a exposição a ambiente aquecido e o primeiro teste de CCK ocorreram no 10º dia de tratamento. O segundo teste de CCK aconteceu após 2 dias. Em seguida as ratas foram eutanasiadas (Figura 10).

analgésico e anti-inflamatório Flunixinina meglumina (Banamine®, 50 mg/ml, Schering-Plough).

O RTX (Sigma-Aldrich) foi administrado na quantidade 20 µg/kg, via intraperitoneal. A preparação da solução estoque 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. O grupo veículo recebeu álcool etílico 20% (i.p.), que foi obtido através da diluição do álcool absoluto em salina estéril.

A solução estoque de CCK foi armazenada no *freezer* - 20 °C. Minutos antes do experimento ela foi diluída em salina estéril. Cada animal recebeu uma injeção de 6 µg/Kg (i.p.). O grupo veículo recebeu apenas salina estéril na quantidade de 1 mL/Kg (i.p.).

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, que foram removidos. Em seguida, o útero e tecidos adiposos foram internalizados no músculo e 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 Implante do sensor e Registro da T_{interna} e ALE

A T_{interna} e ALE foram registradas continuamente pelo sensor de telemetria, utilizando o programa *Vital View Software (VitalView® Data Acquisition System, Software version 4.0)*. Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina e cada animal recebeu um sensor de telemetria (modelo G2 *E-Mitter, Mini-MitterCompany, Sun River, OR, USA*) na cavidade abdominal através de uma pequena abertura feita na pele e no músculo, que foram suturados em seguida. 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, Mini-MitterCompany, Sun River, OR, USA*) conectada a um computador que contém o software de aquisição de dados.

Os registros da T_{interna} e da ALE iniciaram assim que os animais se recuperaram da cirurgia e foram colocados sobre os receptores.

4.6 Dessensibilização dos canais TRPV1

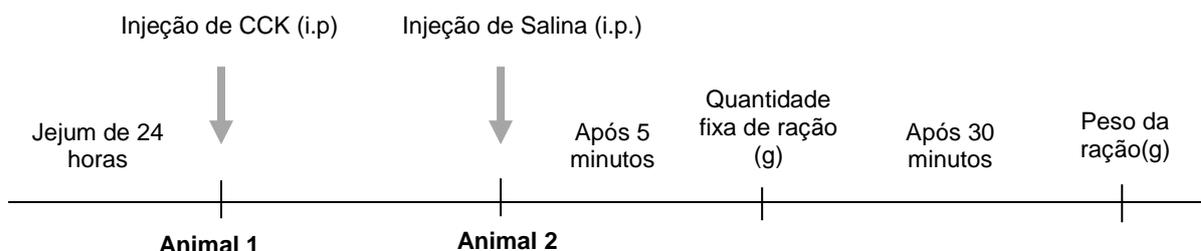
Os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina pelo fato da dessensibilização dos canais TRPV1 causar dor ao animal. Em seguida, o RTX foi preparado e injetado na quantidade de 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (i.p) em um grupo de animais. O grupo veículo recebeu uma injeção de álcool etílico a 20% em salina estéril (i.p.).

Estudos mostraram que a dose administrada é a mínima necessária para causar a dessensibilização dos canais TRPV1 da cavidade abdominal (STEINER et al, 2007; DOGAN et al, 2004).

4.7 Teste de colecistoquinina (CCK)

A dessensibilização dos canais TRPV1 pode ser confirmada pelo teste de CCK. A CCK é um peptídeo liberado por células endócrinas do trato gastrointestinal e por alguns neurônios do sistema nervoso. Quando administrada via intraperitoneal ou intravenosa, é capaz de reduzir a ingestão de alimentos em mamíferos (RITTER; KALIVAS; BERNIER, 1986). Esses estudos mostram que o efeito da saciedade causado pela CCK é mediado por neurônios sensoriais vagais, através dos canais TRPV1 (RITTER, LADENHEIM, 1985). O teste pode ser representado pela figura 11 representada abaixo:

- Primeiro dia de teste:



- Segundo dia de teste:

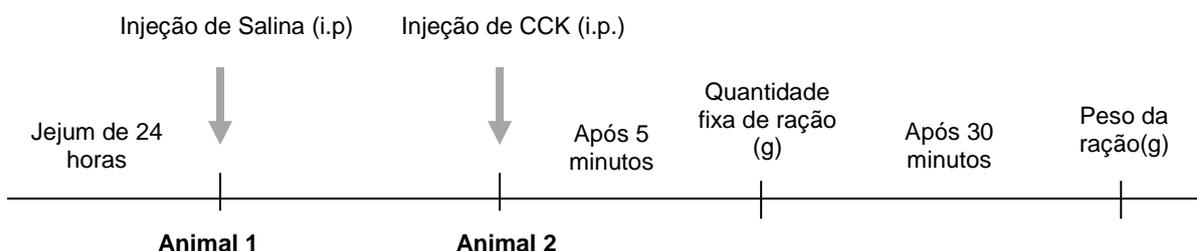


Figura 11 - Esquema representativo do teste de CCK para avaliar a eficácia da dessensibilização.

Os animais foram colocados em jejum de 24 horas antes de cada teste. Cada animal recebeu duas injeções - uma de CCK (6 µg/ kg, i.p.) e uma de salina (1 mL/Kg, i.p.) – em dias diferentes de teste, de forma que o animal que recebeu CCK no primeiro dia, recebeu salina no segundo dia, e vice-versa. Dessa forma, cada animal funciona como controle dele mesmo. A escolha dos animais foi aleatória. Após a aplicação das injeções, aguardou-se 5 minutos e uma quantidade fixa de ração foi colocada para cada um dos animais. Após 30 minutos, a ração foi novamente pesada e a ingesta foi calculada pela diferença do peso inicial e final. A porcentagem da ingestão alimentar pode ser calculada pela fórmula abaixo, onde X representa a quantidade de ração consumida em gramas (g) após as respectivas injeções.

$$\% \text{ ingestão de alimentos} = \frac{(Xg_{(CCK)} - Xg_{(salina)})}{Xg_{(salina)}} \times 100$$

Para avaliar se o tempo após a injeção de RTX interfere na efetividade do teste CCK para provar dessensibilização, esse teste foi realizado em dois protocolos distintos. O primeiro teste de CCK foi realizado após 14 dias de dessensibilização em um protocolo de 10 dias após a dessensibilização em outro. O segundo teste foi feito após 2 dias em relação ao primeiro. Todos aconteceram no mesmo horário, no início do período de atividade dos animais, às 19 horas.

4.8 Habituação e aquecimento dos animais

A habituação é um procedimento importante para familiarizar o animal ao ambiente experimental antes da realização dos protocolos.

A habituação à caixa metabólica consiste em deixar cada animal dentro da caixa acrílica parcialmente fechada por 10 minutos, durante 5 dias.

A habituação ao termômetro da cauda consiste 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 consiste 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} . Essa temperatura foi obtida por dois aquecedores portáteis (*CeramicFanHeater – 1500W – OnixSmartChoice, AUS*) que foram 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_{ambiente} , T_{interna} e T_{cauda} foram anotadas a cada minuto. Foram aquecidos apenas 2 animais por dia, sendo um de cada vez. Os aquecimentos foram realizados sempre no mesmo horário, de 12:00 às 14 horas.

4.9 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_{interna} em que a rata começa a dissipar calor pela pele da cauda. Para estabelecer esse valor, foi necessário calcular a média da T_{interna} e da T_{cauda} para cada grupo. A partir do valor mínimo da T_{cauda} nos 40 minutos, o primeiro valor em que houve diferença estatística foi considerado o momento em que deu início à dissipação de calor. A T_{interna} correspondente a esse fenômeno foi utilizada para o cálculo do limiar (Adaptado DRUMMOND et al, 2016).

• Sensibilidade de dissipação de calor

A sensibilidade de dissipação de calor foi calculada através de uma regressão linear utilizando 5 pontos após o aumento exponencial de T_{cauda} de cada animal. Para construção dessa curva, foram utilizadas T_{interna} e T_{cauda} , de modo que o valor de sensibilidade representa a parte mais íngreme da curva ascendente (DRUMMOND et al., 2016).

4.10 Análise estatística

Os dados de T_{interna} , T_{cauda} , variação do peso corporal e consumo de ração foram analisados pelo teste de análise de variância de duas vias seguido pelo teste de Tukey ou *Bonferroni*, conforme a situação experimental. O peso do útero foi analisado pelo teste de variância de uma via seguido pelo teste *Bonferroni*. A amplitude da T_{interna} e ALE, alteração da ingestão de alimentos induzida pela CCK, o limiar e sensibilidade de dissipação de calor foram analisados pelo teste de *t-student*. O nível de significância foi de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa estatístico Graph Pad Prism 5.0 ou Sigma Plot versão 11.0 (San Jose, CA, EUA), conforme a situação experimental. Para obtenção dos actogramas e valores de amplitude utilizou-se o programa ClockLab (*Actimetrics*, IL, USA). Os registros foram agrupados em blocos de 2, plotados numa resolução de 30 pontos por hora. O programa utiliza o teste estatístico Periodograma Qui-quadrado descrito por Sokolove e Bushell (1978) para calcular o período do ritmo.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito dos tratamentos com E2 e RTX em ratas OVX

A efetividade do tratamento com implantes de E2 pode ser confirmada através do aumento do peso uterino no grupo tratado em relação ao grupo controle ($p < 0,001$; Figura 12, Painel A). Os animais foram eutanasiados após 12, 14 e 16 dias do início tratamento. Essa variação ocorreu em virtude do teste de CCK ser realizado em dias diferentes para comprovar a dessensibilização. Assim, o grupo E2 + RTX/Veículo teve o útero pesado nos dias 12 e 16 após o início do tratamento e os demais grupos após 14 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos contendo implante de E2. A alteração do peso uterino pode ser explicada pelo fato de o estradiol aumentar a proliferação de células e glândulas do endométrio, além de promover a vascularização. Estes efeitos culminam no aumento de peso deste órgão (GRAVES et al., 2011).

O teste de CCK mostrou a eficiência da dessensibilização dos canais TRPV1 da região abdominal, uma vez que animais dessensibilizados apresentaram maior consumo de ração em relação ao grupo veículo após a injeção de CCK ($p < 0,01$; Figura 12, Painel B). A realização dos testes em diferentes dias após a injeção de RTX não alterou a resposta do teste de CCK. Estudos prévios da literatura mostram que esse teste já foi realizado 15 e 19 dias após dessensibilização com capsaicina e que os efeitos máximos são observados nas duas primeiras semanas (DOGAN et al, 2004).

A variação do peso corporal após a inserção do implante nas ratas óleo e E2 (Figura 12, Painel C) e E2 + Veículo e E2 + RTX (Figura 12, Painel D) bem como consumo de ração nas ratas com implante óleo e E2 (Figura 12, Painel E) e E2 + Veículo e E2 + RTX (Figura 12, Painel F) fornecem informações complementares dos animais ao longo do tratamento.

A tabela 1 mostra o peso inicial e final dos animais nos 4 grupos experimentais.

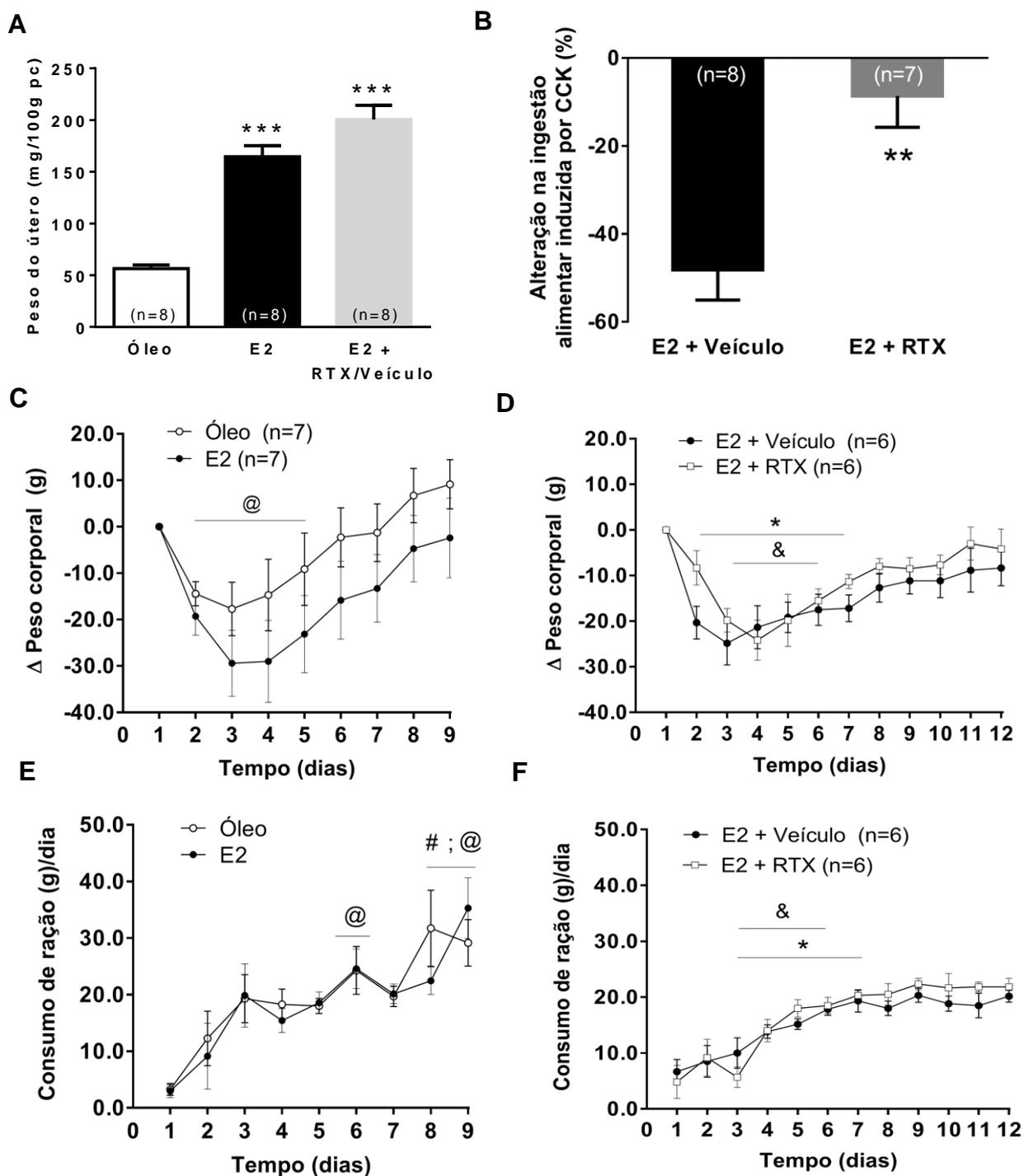


Tabela 1 – Informações complementares sobre peso corporal no início e fim do tratamento.

	Óleo	E2	E2 + Veículo	E2+ RTX
Peso corporal (g)				
Dia 1: Implante óleo ou E2	250,6 \pm 4,20	243,0 \pm 5,39	264,3 \pm 9,39	264,3 \pm 10,71
Dia 9 ou 12: Eutanásia	259,7 \pm 8,50	240,6 \pm 7,37	256,0 \pm 7,26	260,2 \pm 7,58

Figura 12 - Efeito dos tratamentos com E2 e RTX em ratas OVX e variação do peso corporal e ingesta alimentar durante o período de tratamento. **Painel A:** Peso uterino relativizado pelo peso corporal após 12,14 ou 16 dias do implante E2 diluído em óleo de milho ou apenas óleo de milho. **Painel B:** Alteração no consumo de alimentos induzido pela CCK nos animais do grupo controle (E2 + Veículo) e tratados com resiniferatoxina (E2 + RTX). **Painel C:** Variação do peso corporal de ratas com implante óleo e E2 durante 9 dias de tratamento. **Painel D:** Variação do peso corporal de ratas E2 + Veículo e E2 + RTX durante 12 dias de tratamento. **Painel E:** Consumo de ração de ratas com implante óleo e E2 durante 9 dias de tratamento. **Painel F:** Consumo de ração de ratas E2 + Veículo e E2 + RTX durante 12 dias de tratamento. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. ***, $p < 0,001$; em relação do grupo óleo pelo teste variância de uma via, seguido pelo teste de *Bonferroni*. **, $p < 0,01$ pelo teste *t-student*, ambos em relação ao grupo veículo. @, $p < 0,05$ demonstra alteração do peso corporal e consumo de alimento nas ratas com implante E2 em relação ao primeiro dia de tratamento. #, $p < 0,05$ demonstra a alteração do consumo de alimento nas ratas com implante óleo em relação ao primeiro dia de tratamento. *, $p < 0,05$ demonstra a alteração do peso corporal e consumo de alimentos nas ratas E2 + Veículo em relação ao primeiro dia de tratamento. &, $p < 0,05$ demonstra a alteração do peso corporal de consumo de alimentos nas ratas E2 + RTX em relação ao primeiro dia de tratamento. As análises foram feitas pelo teste de variância de duas vias, seguido pelo teste de *Bonferroni*. A tabela 1 mostra o peso inicial e final dos 4 grupos experimentais durante o tratamento, 7 e 21 dias após a ovariectomia, respectivamente.

5.2 Efeito do E2 e dos canais TRPV1 abdominais sobre variações circadianas de T_{interna} e ALE em ratas OVX

Avaliou-se primeiramente o efeito do E2 sobre a T_{interna} e ALE em ratas OVX e, em seguida, o papel dos canais TRPV1 em associação com esse hormônio sobre esses mesmos parâmetros circadianos, uma vez que ambos são descritos como envolvidos no controle termorregulatório.

O perfil do registro da T_{interna} foi o mesmo ao longo dos 4 dias que antecederam o aquecimento. No entanto, houve diferenças em alguns pontos durante a fase escura ($p < 0,005$; Figura 13, Painel A).

A amplitude da T_{interna} não foi alterada em função do tratamento com o hormônio (Figura 13, Painel B), visto que não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Em relação à ALE, também não foram encontradas grandes diferenças nos actogramas representativos de ratas com implante de óleo (Figura 14, Painel A) e de E2 (Figura 14, Painel B).

A amplitude da ALE, assim como da temperatura, não variou entre os grupos estudados (Figura 14, Painel C).

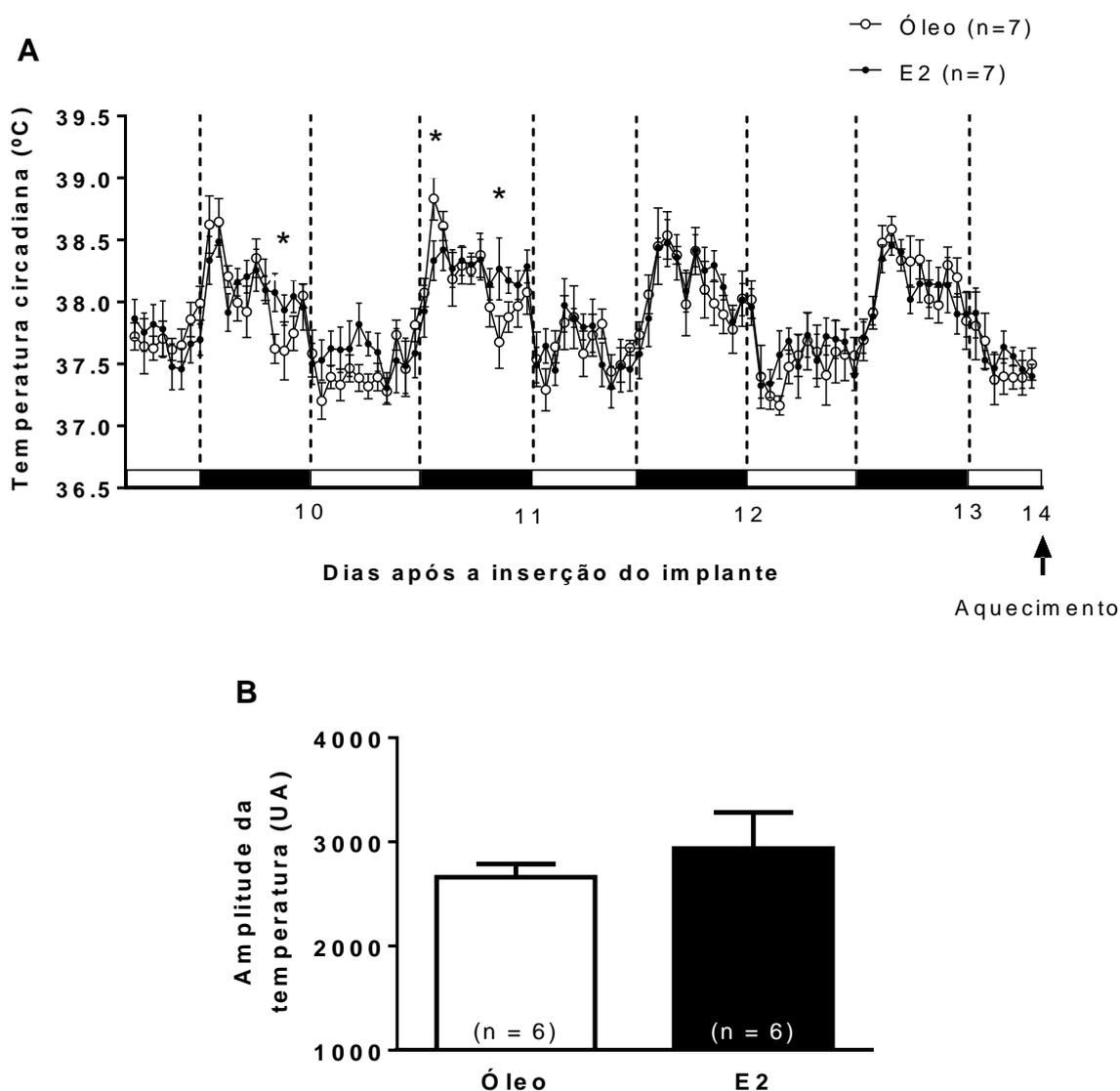


Figura 13 - Análise circadiana de T_{interna} de ratas OVX com implante de óleo e de E2. **Painel A:** Registro da T_{interna} durante os 4 dias que antecederam o aquecimento. O início e término dos registros foi às 12:00 horas do 1º e 4º dia, respectivamente. As barras brancas representam a fase clara do dia, com acendimento da luz às 7:00 horas. As barras pretas representam a fase escura, que se inicia às 19:00 horas, quando as luzes se apagam. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. *, $p < 0,05$ pelo teste de variância de duas vias seguido pelo teste de *Tukey*. **Painel B:** Amplitude do ritmo circadiano de T_{interna} . Os dados estão apresentados pela média \pm EPM.

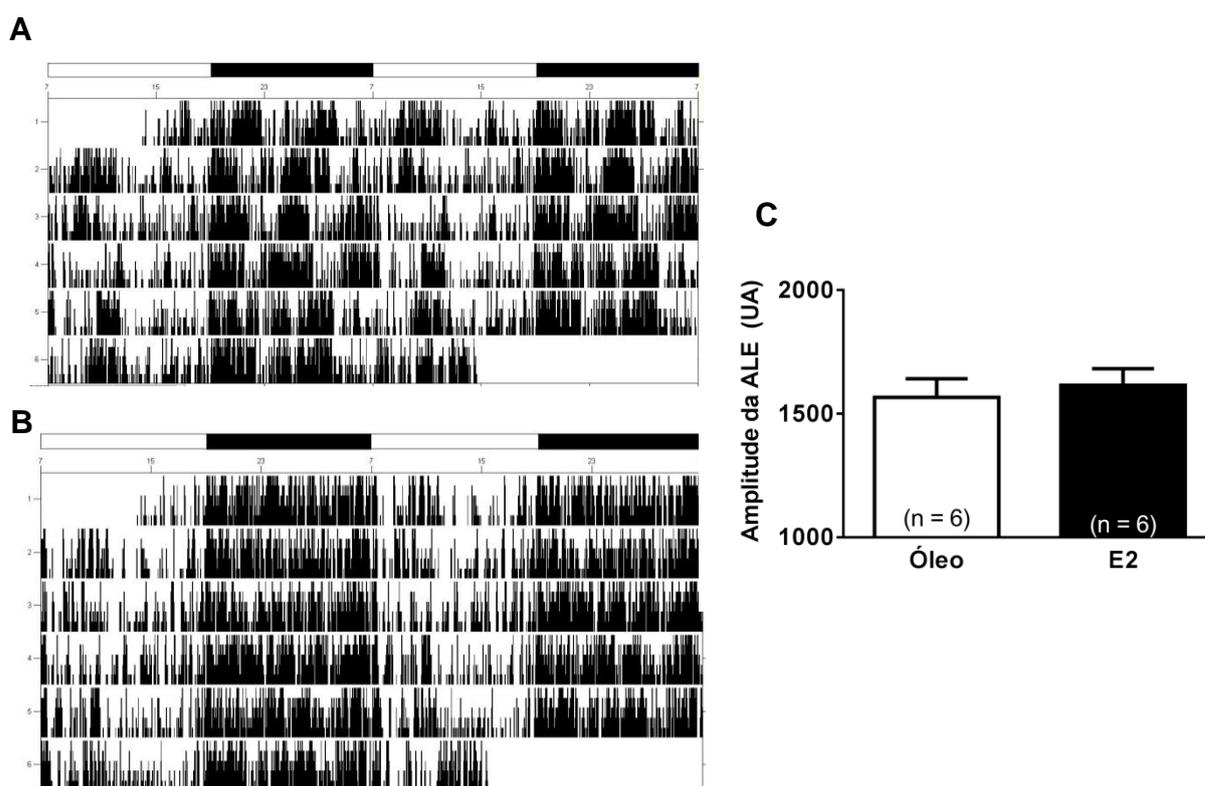


Figura 14 - Actograma representativo de ratas OVX com implante de óleo (**Painel A**) e de E2 (**Painel B**). As barras brancas representam a fase clara do dia, com acendimento da luz às 7:00 horas. As barras pretas representam a fase escura, em que as luzes se apagam às 19:00 horas. Os números na horizontal indicam as horas do dia e os números na vertical se referem ao número de dias registrados. **Painel C**: Amplitude do ritmo circadiano de ALE. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM.

A T_{interna} de ratas E2 + Veículo e E2 + RTX se diferencia em mais pontos durante os 4 dias de registro que antecederam o aquecimento, de forma que grupo dessensibilizado atingiu maiores valores de temperatura na fase escura em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; Figura 15, Painel A).

A amplitude da T_{interna} também foi maior nos animais dessensibilizados pelo RTX em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$; Figura 15, Painel B).

A ALE representada pelos actogramas das ratas E2 + Veículo (Figura 16, Painel A) e E2 + RTX (Figura 16, Painel B) não mostrou alteração em função do tratamento com RTX. Também não houve alteração amplitude desse ritmo (Figura 16, Painel C).

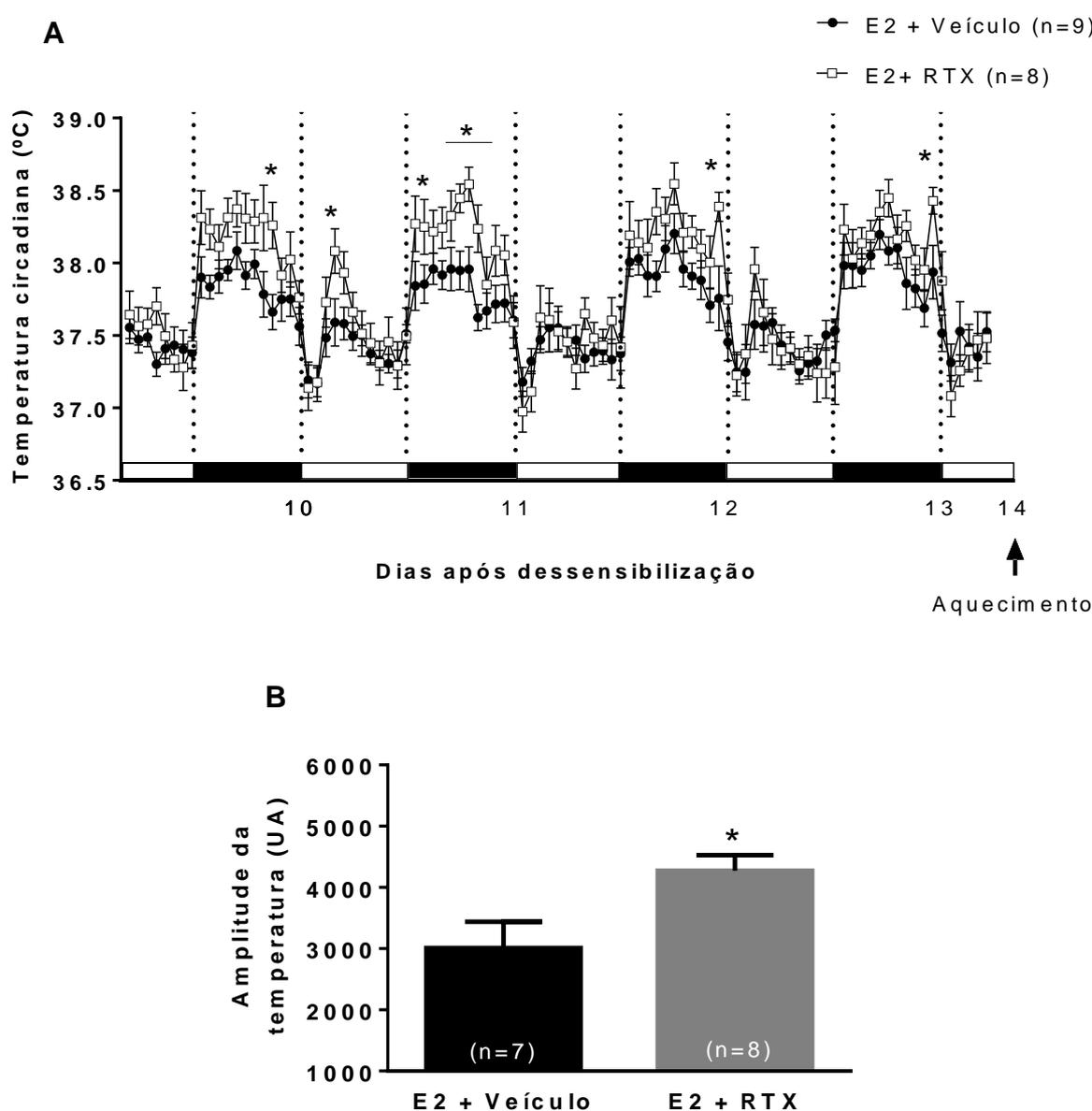


Figura 15 - Análise circadiana de T_{interna} de ratas OVX com implante de E2 tratadas ou não com RTX. **Painel A:** Registro da T_{interna} durante os 4 dias de dessensibilização que antecederam o aquecimento. O início e término dos registros foi às 12:00 horas dos dias 10 e 14, respectivamente. As barras brancas representam a fase clara do dia, com acendimento da luz às 7:00 horas. As barras pretas representam a fase escura, que se inicia às 19:00 horas, quando as luzes se apagam. Os dados estão expressos pela média \pm EPM. *, $p < 0,05$ pelo teste de variância de duas vias seguido pelo teste de Tukey. **Painel B:** Amplitude do ritmo circadiano de T_{interna} . Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, pelo teste *t-student*.

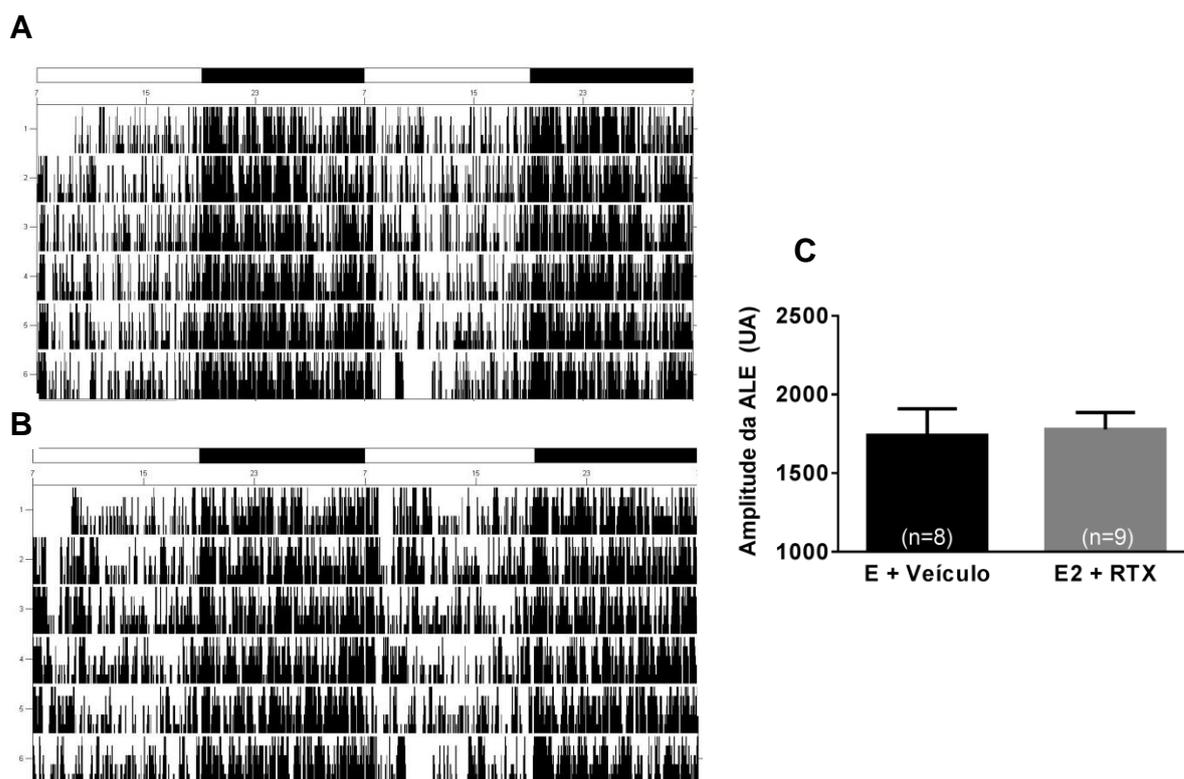


Figura 16 - Actograma representativo de uma rata E2 + Veículo (**Painel A**) e E2 + RTX (**Painel B**). As barras brancas representam a fase clara do dia, com acendimento da luz às 7:00 horas. As barras pretas representam a fase escura, em que as luzes se apagam às 19:00 horas. Os números na horizontal indicam as horas do dia e os números na vertical se referem ao número de dias de registro. **Painel C:** Amplitude do ritmo circadiano de ALE. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM.

5.3 Efeito do E2 no controle termorregulatório de ratas OVX durante exposição a ambiente aquecido

Ratas com implantes de óleo e de E2 foram expostas a ambiente aquecido de 34°C durante 40 minutos.

Houve um aumento na T_{interna} em ambos os grupos em relação aos 5 minutos iniciais de aquecimento ($p < 0,05$), que variou de 37,3°C a 39°C, aproximadamente, resultando em um $\Delta T_{\text{interna}}$ máximo de 1,23°C \pm 0,11 no grupo óleo e 1,45°C \pm 0,11 nas ratas tratadas com E2 (Figura 17, Painéis A e B).

Quando se avalia a capacidade de dissipação de calor pela pele da cauda, ratas tratadas com E2 apresentaram mecanismos de perda de calor mais efetivos

em relação ao grupo controle, visto que a dissipação foi simultânea ao aquecimento desde os primeiros minutos ($p < 0,05$). A T_{cauda} no grupo óleo foi de $31,75^{\circ}\text{C} \pm 0,16$ e no grupo E2 foi de $33,08^{\circ}\text{C} \pm 0,16$. O ΔT_{cauda} foi de $1,48^{\circ}\text{C} \pm 1,72$ nas ratas contendo implante óleo e $2,58^{\circ}\text{C} \pm 0,63$ nas tratadas com E2 (Figura 17, Painéis C e D).

A relação $T_{\text{interna}} \times T_{\text{cauda}}$ fornece informações importantes sobre os mecanismos envolvidos na termorregulação através dos diferentes perfis das curvas encontradas em cada grupo (Figura 18, Painel A).

O primeiro parâmetro calculado a partir dessa curva foi o limiar de dissipação de calor, que representa o valor de T_{interna} a partir da qual a rata inicia o aumento exponencial da dissipação de calor através da pele da cauda. Observou-se uma diferença em função do tratamento nesses animais, de forma que no grupo óleo a dissipação teve início à $38,42^{\circ}\text{C} \pm 0,19$ e no grupo E2 à $37,75^{\circ}\text{C} \pm 0,08$ ($p < 0,05$; Figura 18, Painel B), demonstrando o envolvimento desse hormônio na homeostase termorregulatória.

Outro parâmetro que pode ser calculado foi a sensibilidade de dissipação de calor através da inclinação das curvas, que também apresentou diferenças entre as ratas tratadas com óleo e E2, de forma que o valor no primeiro grupo foi $3,78 \pm 1,12$ e no segundo grupo $13,33 \pm 3,31$ ($p < 0,05$; Figura 18, Painel C).

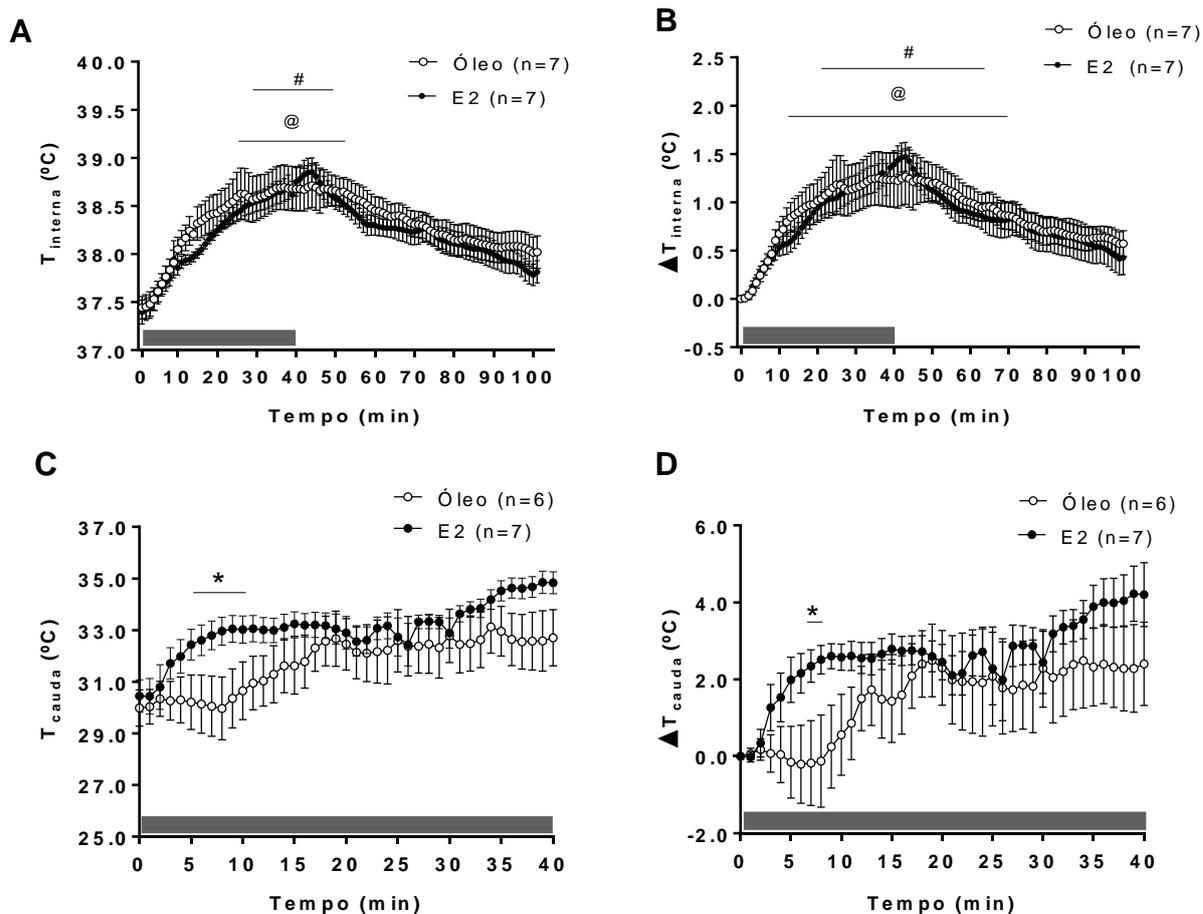


Figura 17 - Análise das respostas termorregulatórias de ratas OVX com implantes de óleo e de E2 em ambiente aquecido. A T_{interna} e sua variação ($\Delta T_{\text{interna}}$) durante os 40 minutos de aquecimento e os 60 minutos seguintes estão representadas nos painéis **A** e **B**, respectivamente. A T_{cauda} e sua variação (ΔT_{cauda}) durante o aquecimento estão representadas nos painéis **C** e **D**, respectivamente. As barras de cor cinza representam o tempo de aquecimento. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. #, $p < 0,05$ demonstra elevação da T_{interna} de ratas contendo implante E2 em relação aos 5 minutos iniciais de aquecimento; @ $p < 0,05$ demonstra elevação da T_{interna} de ratas contendo implante óleo em relação aos 5 minutos iniciais de aquecimento. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo óleo; todos obtidos pelo teste de variância de duas vias seguido pelo teste de Tukey.

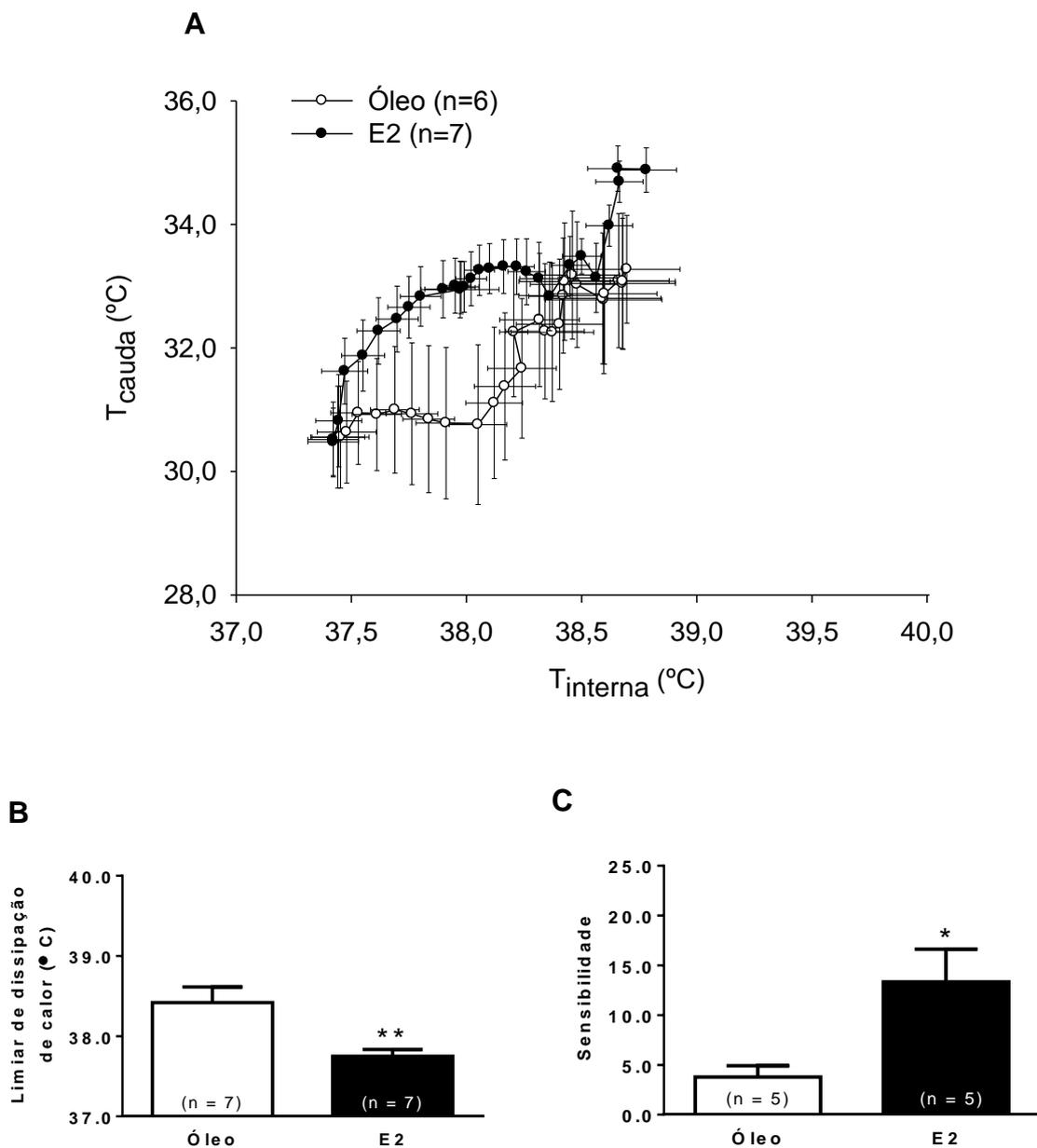


Figura 18 - Análise de parâmetros termorregulatórios de ratas OVX com implantes de óleo e de E2. **Painel A:** Relação entre $T_{interna}$ e T_{cauda} de ratas expostas a ambiente aquecido. **Painel B:** Efeito do estradiol sobre o limiar de dissipação de calor. **Painel C:** Efeito do estradiol sobre a sensibilidade de dissipação de calor. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, pelo teste *t-student*.

5.4 Efeito do E2 na produção de calor metabólico em ratas OVX durante exposição a ambiente aquecido

A taxa metabólica foi utilizada para verificar se o aumento da temperatura da cauda observado nas ratas ocorreu em função de um aumento simultâneo dos mecanismos de produção de calor. Para isso, ratas contendo implantes de óleo ou de E2 tiveram o consumo de oxigênio (VO_2) registrado durante 40 minutos a 34°C. Não foram encontradas diferenças em função do tratamento em nenhum ponto (Figura 19), indicando que a produção de calor não é alterada pelo tratamento com E2.

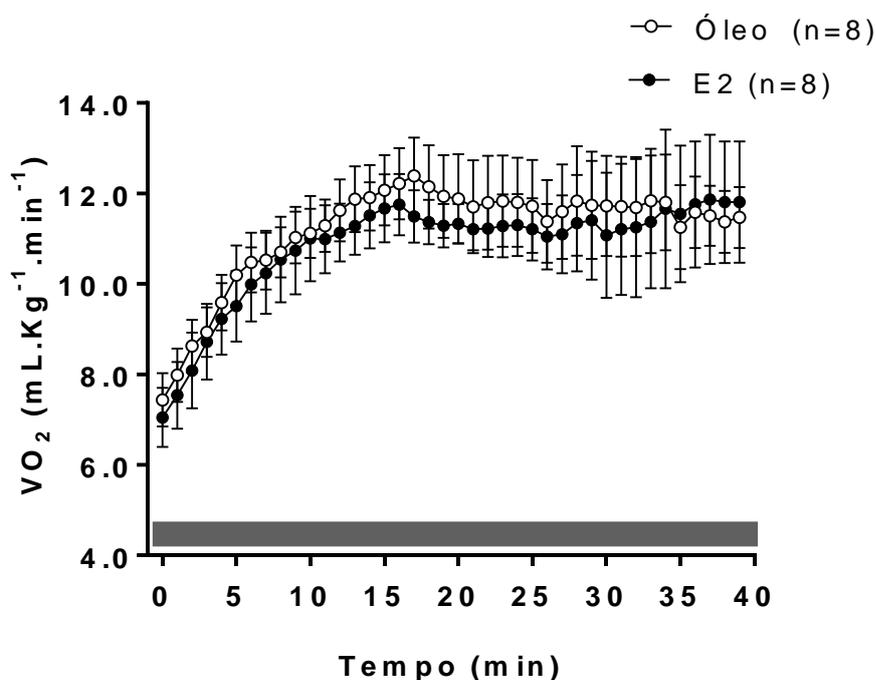


Figura 19 - Consumo de oxigênio (VO_2) de ratas OVX com implantes de óleo e de E2 expostas a ambiente aquecido. A barra de cor cinza indica o tempo de aquecimento. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM.

5.5 Efeito dos canais TRPV1 no controle termorregulatório de ratas OVX tratadas com E2 durante exposição a ambiente aquecido

Ratas com implantes de E2 tratadas ou não com RTX foram expostas a ambiente aquecido de 34°C durante 40 minutos.

Houve um aumento da T_{interna} em ambos os grupos, de forma que ratas E2 + RTX alcançaram maiores valores de temperatura em relação ao grupo E2 + Veículo ($p < 0,05$). Quando se observa o $\Delta T_{\text{interna}}$ dos grupos, a rata dessensibilizada também teve maior aumento em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; Figura 20, Painéis A e B). Quando se avalia a capacidade de dissipação de calor pela pele da cauda, ratas E2 + Veículo apresentaram mecanismos mais efetivos em relação às ratas dessensibilizadas ($p < 0,05$). Conseqüentemente, foi observado um maior ΔT_{cauda} no grupo controle em relação às tratadas com RTX ($p < 0,05$; Figura 20, Painéis C e D).

A relação $T_{\text{interna}} \times T_{\text{cauda}}$ de ratas dessensibilizadas e veículo fornecem informações importantes sobre o papel dos canais TRPV1 na termorregulação quando já se tem o efeito do E2 nesses animais (Figura 21, Painel A).

O cálculo do limiar de dissipação de calor mostrou que ratas E2 + Veículo iniciam o processo de perda de calor em temperaturas mais baixas que as E2 + RTX ($p < 0,0001$; Figura 21, Painel B).

A dessensibilização também alterou a sensibilidade de dissipação de calor dos grupos, visto que ratas E2 + RTX apresentaram menor valor em relação ao controle ($p < 0,001$; Figura 21, Painel C).

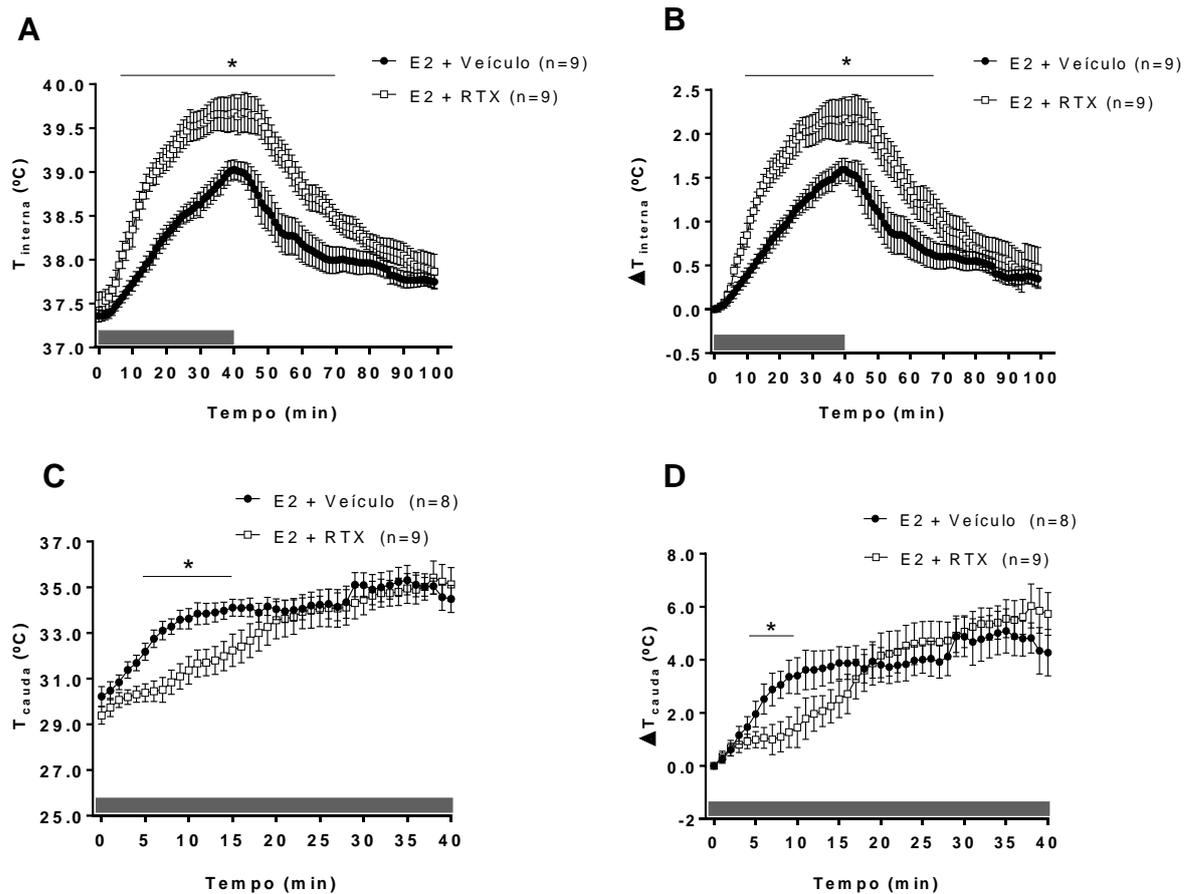


Figura 20 - Análise das respostas termorregulatórias de ratas OVX com implante de E2, tratadas ou não com RTX expostas a ambiente aquecido. A T_{interna} e sua variação ($\Delta T_{\text{interna}}$) durante os 40 minutos de aquecimento e os 60 minutos seguintes estão representadas nos painéis **A** e **B**, respectivamente. A T_{cauda} e sua variação (ΔT_{cauda}) durante o aquecimento estão representadas nos painéis **C** e **D**, respectivamente. As barras de cor cinza representam o tempo de aquecimento. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (E2 + Veículo); pelo teste de variância de duas vias seguido pelo teste de Tukey.

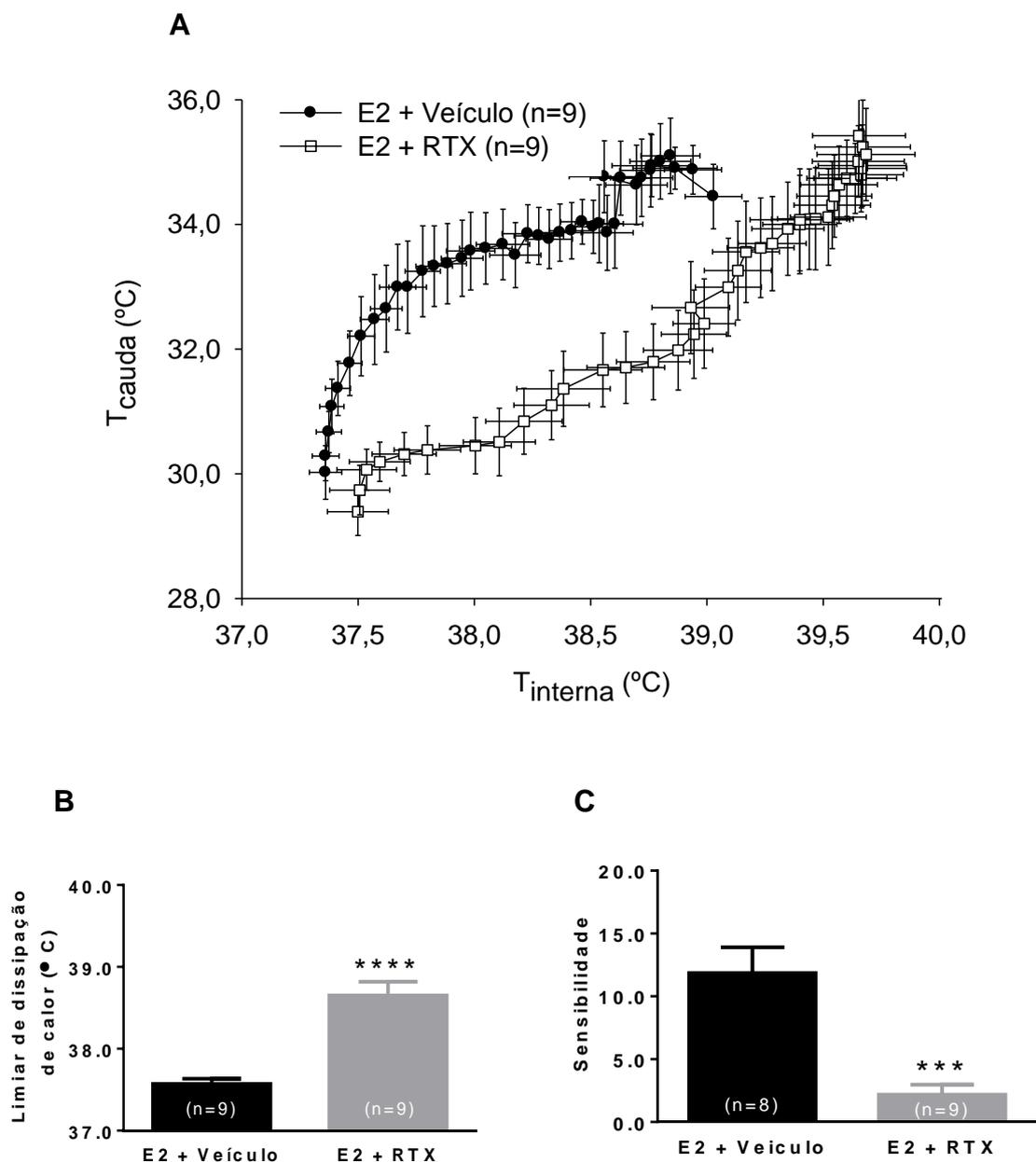


Figura 21 - Análise de parâmetros termorregulatórios de ratas OVX com implante de E2, tratadas ou não com RTX. **Painel A:** Relação entre T_{interna} e T_{cauda} de ratas durante exposição a ambiente aquecido. **Painel B:** Efeito do estradiol sobre o limiar de dissipação de calor. **Painel C:** Efeito do estradiol sobre a sensibilidade de dissipação de calor. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. ****, $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ambos em relação ao grupo controle ao grupo controle (E2 + Veículo), pelo teste *t-student*.

A tabela 2 mostra os valores comparativos de limiar e sensibilidade de dissipação de calor em ratas óleo, E2, E2+Veículo e E2+RTX durante a exposição a ambiente aquecido.

Tabela 2: Limiar e sensibilidade de dissipação de calor observados durante aquecimento a 34°C por 40 minutos nos animais com implantes de óleo e de E2; e nos animais com implantes de E2 tratados com RTX e veículo.

Grupo experimental	Limiar	Sensibilidade
Óleo	38,42 ± 0,19 °C	3,78 ± 1,12
E2	37,75 ± 0,08 °C *	13,33 ± 3,31 *
E2 + veículo	37,57 ± 0,06 °C	11,86 ± 2,04
E2+ RTX	38,65 ± 0,16 °C *	2,17 ± 0,81 *

6 DISCUSSÃO

6.1 Efeito do E2 e dos canais TRPV1 sobre controle circadiano de T_{interna} e ALE

Alguns parâmetros fisiológicos estão sob controle do relógio central, o núcleo supraquiasmático do hipotálamo - NSQ. Como exemplo, pode-se destacar a T_{interna} , ALE e o comportamento alimentar (TAKAHASHI et al., 2008). Além disso, estudos propõem que o E2 age diretamente sobre esse núcleo e controla ritmos circadianos (SIMONNEAUX; BAHOUGNE, 2015). Dessa forma, avaliamos o efeito desse hormônio sobre as oscilações circadianas de T_{interna} e ALE, dois importantes *outputs* do relógio que foram obtidos simultaneamente em nossos experimentos.

Neste trabalho foram encontradas algumas diferenças pontuais de T_{interna} nos grupos óleo e E2 durante a fase escura, mas esse hormônio não foi capaz de alterar a amplitude desse ritmo. No entanto, quando o tratamento foi realizado através de injeções com cipionato de estradiol (10 $\mu\text{g}/0,2\text{mL}$) durante 3 dias consecutivos (dados anteriores do nosso laboratório mostram isso), as ratas OVX apresentaram menores valores de T_{interna} na fase clara e escura em relação ao grupo tratado. Além disso, ratas intactas apresentam maiores valores de T_{interna} apenas durante a fase clara quando comparadas às ratas OVX. Apesar do tipo de tratamento aparentemente interferir no efeito desse hormônio sobre a temperatura, os dados encontrados no presente estudo estão de acordo com outros obtidos da literatura que demonstram que o tratamento com implantes E2 não é capaz de alterar a T_{interna} de ratas mantidas sob determinadas temperaturas ambientes (DACKS, RANCE; 2010). Nossos resultados corroboram com estes e estudos anteriores realizados em nosso laboratório com implantes de E2 também mostraram resultados semelhantes. Concluímos, portanto, que os esteroides ovarianos (E2 e progesterona) são responsáveis pela manutenção da T_{interna} durante a fase clara, e que o tratamento com E2 é responsável pela manutenção da T_{interna} apenas na fase escura. Além disso, somente o tratamento com cipionato de estradiol é capaz de alterar a manifestação rítmica de temperatura, mostrando a importância desse hormônio nesse processo. Já o tratamento com implantes com 17- β -estradiol não interfere na T_{interna} circadiana.

Além do E2, estudamos o papel dos canais TRPV1 sobre a T_{interna} circadiana, uma vez que estes canais desempenham funções importantes na termorregulação (ROMANOVSKY et al., 2009). Dessa forma, avaliamos o efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 sobre o ritmo circadiano de T_{interna} de ratas tratadas com E2. A dessensibilização dos canais TRPV1 da região abdominal provocou um aumento da T_{interna} no grupo E2 + RTX. Com exceção do horário das 11:00 horas do dia 11 da dessensibilização, valores aumentados de T_{interna} foram observados durante a fase escura. Quando analisamos o efeito do E2 sobre T_{interna} circadiana em trabalhos anteriores no nosso laboratório, observamos que o tratamento com injeção de ciproionato de E2 promove o mesmo efeito sobre a T_{interna} também na fase escura. Estes resultados em conjunto, sugerem um efeito do E2 e do TRPV1 em manter os valores de T_{interna} durante a fase escura. Corroborando esses resultados, Diogenes e colaboradores (2006) mostraram que a corrente induzida por capsaicina (portanto de TRPV1) de neurônios do gânglio trigêmio é potencializada por prolactina somente em ratas intactas ou ratas OVX tratadas com E2, reforçando a importância desse hormônio nos mecanismos que envolvem a ativação dos canais TRPV1.

Interessantemente, a ovariectomia leva a uma diminuição dos valores de T_{interna} durante a fase clara quando comparado aos das ratas ciclando regularmente, mostrando um efeito dos esteróides ovarianos (estradiol e/ou progesterona) em manter os valores de T_{interna} durante esta fase. A reposição do E2 por meio de implantes contendo este hormônio não foi capaz de alterar os valores de T_{interna} durante a fase clara, sugerindo que ambos os hormônios estão envolvidos com a manutenção da T_{interna} durante as 24 horas, sendo que provavelmente a progesterona participe desse processo durante a fase clara, enquanto que o E2 participe durante a fase escura. Reforçando esta possibilidade, por outro lado, quando analisamos o efeito do tratamento com RTX sobre a T_{interna} de machos, os valores permanecem aumentados durante ambas as fases, clara e escura. Conseqüentemente, a amplitude do ritmo circadiano de T_{interna} diminuiu. Já nas fêmeas, devido ao papel dos esteroides ovarianos (dados anteriores do nosso laboratório mostram este efeito) sobre o nadir da T_{interna} e um efeito do E2 somente na fase escura, durante o pico de T_{interna} , a consequência foi um aumento da amplitude do ritmo circadiano de T_{interna} , resultado oposto do encontrado nos machos.

Considerando os resultados do presente estudo, acredita-se que a T_{interna} não manteve aumentada durante todo o período após a dessensibilização pelo fato de mecanismos compensatórios à falta dos canais TRPV1 terem sido acionados, trazendo a temperatura para valores mais próximos da normalidade (GAVVA, 2008). Alguns pontos isolados de T_{interna} que se mantiveram elevados durante a fase escura pode estar relacionado ao maior período de atividade desses animais nessa fase (GORDON, 1990), que por não terem os canais TRPV1 funcionais, apresentaram prejuízo nesse controle.

Outro fator relevante que pode ter contribuído para as diferenças de T_{interna} nas fêmeas E2 + RTX quando comparado aos machos dessensibilizados é o perfil hormonal decorrente do modelo utilizado neste estudo. Ratas OVX + E2 apresentam valores aumentados de estradiol plasmático (inferência feita pelos valores aumentados de peso uterino nas ratas OVX + E2). Além disso, em função das ações deste hormônio sobre os lactotrofos hipofisários (BURNS; SARKAR, 1993), os níveis de prolactina (PRL) devem estar elevados neste modelo. Interessantemente, Patil e colaboradores (2013) demonstraram que a prolactina (PRL) - hormônio produzido pela hipófise e regiões extra-hipofisárias – é capaz de regular a expressão de canais TRP de maneira sexo-dependente em processos inflamatórios. Além disso, canais TRPV1, TRPA1 e TRPM8 foram sensibilizados pela prolactina em neurônios sensoriais de ratas OVX tratadas com E2, mas essa resposta não ocorreu no grupo de ratas OVX sem tratamento com E2 (PATIL et al., 2013). Outro estudo mostrou que o pré-tratamento com PRL reduziu o limiar de ativação dos canais TRPV1 de 41,9°C para 36,8°C em cultura de neurônios do gânglio trigêmeo de ratas intactas, mas esse efeito não foi observado nas ratas OVX (DIOGENES et al., 2006). Acreditamos, portanto, que além do efeito direto do E2 sobre parâmetros termorregulatórios, existe a possibilidade de que essa ação possa ser mediada pela PRL sob um efeito modulador do E2 e que esse hormônio, juntamente com os canais TRPV1, são dois importantes fatores que promovem a eficiência do controle de T_{interna} em ratas. Além disso, acreditamos que a falta desse canal não provocou grandes aumentos de temperatura nas fêmeas quando comparado aos machos devido ao possível efeito protetor do E2, que pode ser direto ou indireto, através da modulação de outros hormônios e canais, como a PRL e o TRPV1, respectivamente.

Em relação à ALE, os actogramas das ratas óleo e E2 mostraram um perfil de atividade semelhante, com período de vigília na fase escura e período de repouso

na fase clara. Assim como na temperatura, o implante de E2 não foi capaz de interferir na manifestação desse ritmo, uma vez que a amplitude não foi alterada entre os grupos. Mosquera e colaboradores (2015) demonstraram em seus experimentos que ratas tratadas com implantes de E2 e placebo também não apresentaram diferenças na atividade locomotora após 28 dias de ovariectomia. Por outro lado, trabalhos mostraram que fêmeas neonatas *Knockout* para aromatase – enzima responsável pela conversão da testosterona em estrogênios – apresentam menor atividade na roda de atividade em relação ao grupo selvagem, demonstrando o envolvimento do hormônio em determinar o nível de atividade locomotora (ROYSTON; BUNICK; MAHONEY, 2016).

Ratas E2 + RTX e E2 + Veículo também apresentaram um perfil de atividade locomotora semelhante e a amplitude desse ritmo também não foi alterada. Jeong e Seong (2014) mostraram em seus experimentos que animais neonatos machos tratados com capsaicina em doses suficientes para promover dessensibilização também não apresentaram diferenças na atividade locomotora em relação ao grupo controle. Diferentemente desses achados, os experimentos com machos em nosso laboratório mostraram que a dessensibilização dos canais TRPV1 provocou uma redução da amplitude desse ritmo e alterou o horário de maior atividade desses animais. Aparentemente o papel dos canais TRPV1 na ALE ainda é controverso e as respostas podem ser alteradas de acordo com determinadas variáveis fisiológicas, como o envelhecimento (HUDSON et al., 2016).

6.2 Efeito do E2 e dos canais TRPV1 sobre a T_{interna} durante a exposição a ambiente aquecido

Durante o aquecimento, houve um aumento da T_{interna} nas ratas óleo e E2. Os valores máximos de temperatura alcançados por ambos os grupos foram muito semelhantes durante todo o aquecimento e nos 60 minutos seguintes. Esses dados diferem-se dos apresentados por Dacks e Rance (2010), uma vez que eles demonstraram em seus experimentos que a T_{interna} de ratas óleo e E2 apresentaram valores semelhantes até 32,5°C e, a partir dessa temperatura, as ratas óleo tiveram um aumento mais acentuado em relação às ratas tratadas com E2.

A capacidade de dissipação de calor de cada grupo durante o aquecimento foi avaliada através da medida da T_{cauda} . Interessantemente, as ratas tratadas com E2

tiveram um aumento da T_{cauda} logo no início da exposição a ambiente aquecido (primeiros 5 minutos de aquecimento). Em contrapartida, nas ratas tratadas com óleo, este aumento na T_{cauda} teve início aos 15 minutos da exposição a ambiente aquecido. Este resultado indica um prejuízo dos mecanismos de perda de calor, provavelmente devido à ausência do hormônio. O cálculo do limiar e sensibilidade de dissipação de calor apontam para esta direção. De fato, ratas OVX + óleo apresentaram maior limiar de dissipação de calor e menor sensibilidade. Dessa forma, podemos inferir que os ajustes termorregulatórios nas ratas E2 foram mais eficientes pelo fato do aumento da T_{interna} ter sido acompanhado prontamente pela dissipação de calor. Diferentemente do nosso estudo, Dacks e Rance (2010) utilizaram o Índice de Dissipação de Calor (IDC) para avaliar a vasomotricidade da cauda. Nesse contexto, eles encontraram que as ratas OVX tratadas com óleo apresentaram maior dissipação de calor que as ratas E2 em temperatura ambiente considerada a zona termoneutra do animal.

Assim, podemos atribuir às condições experimentais diferentes e a forma em que a dissipação de calor foi avaliada como determinantes para estes resultados discrepantes. No nosso estudo, a dissipação de calor foi obtida durante a exposição ao calor e utilizamos para avaliar esse mecanismo os valores absolutos da T_{cauda} e o ΔT_{cauda} . No trabalho citado anteriormente, a perda de calor foi obtida através do cálculo do IDC, e as diferenças que foram encontradas entre os grupos estavam dentro da zona termoneutra, ou seja, em temperaturas inferiores à utilizada nesse trabalho.

As alterações no limiar de dissipação de calor sugerem que a ausência do E2 afeta mecanismos centrais envolvidos na dissipação de calor, que estão relacionadas a alterações na atividade de neurônios sensíveis à temperatura na APO ou às eferências que controlam a dissipação de calor (NADEL et al., 1971).

A sensibilidade de dissipação de calor também foi alterada pelo tratamento com E2, evidenciando que esse hormônio está envolvido na modulação periférica de dissipação de calor. A pele possui distribuição distinta de nervos e glândulas que varia de densidade dependendo da região, o que justifica maior sudorese em determinadas partes do corpo que em outras (STOLWIJK et al., 1971). Outro importante indício de uma modulação periférica seria uma resposta diferenciada à sudorese para um mesmo “drive” central em determinadas regiões da pele. Dessa forma, acreditamos que o tratamento com E2 possa interferir de alguma maneira

com a vasomotricidade da cauda, garantindo que a vasodilatação ocorra a valores de T_{interna} menores do que nas ratas OVX (tabela 2).

Para avaliar se paralelo às ações do E2 sobre a dissipação de calor pela pele da cauda este hormônio também atue na produção de calor, analisamos a taxa metabólica de ratas óleo e E2 através do consumo de oxigênio (VO_2). Não foram observadas diferenças no VO_2 entre os grupos OVX + óleo e OVX + E2 durante os 40 minutos de exposição ao ambiente quente. Estudos prévios da literatura mostraram resultados semelhantes em temperaturas ambientes que variaram de 15 a 25°C (HOSONO et al.; 2001). Interessantemente, outro trabalho mostrou que a administração subcutânea (s.c.) e intracerebroventricular (ICV) de E2 aumenta a expressão de *UCP-1* no tecido adiposo marrom, indicando maior termogênese (MORENTIN et al., 2014). Apesar da controvérsia desses resultados, podemos dizer que no nosso estudo o tratamento com E2 não interferiu na produção de calor, mas esse hormônio foi importante para a eficiência da dissipação pela pele da cauda.

Uma possível resposta conjunta dos canais TRPV1 com o E2 também foi avaliada durante a exposição a ambiente aquecido.

Nas ratas do grupo E2 + RTX, o aumento de T_{interna} foi significativamente maior do que os nas ratas do grupo E2 + Veículo desde o início do aquecimento, e esta elevação manteve até aproximadamente 30 minutos após o fim da exposição ao calor. Interessantemente, esse aumento da temperatura não foi acompanhado da maior dissipação de calor pela pele da cauda. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos, de forma que para um mesmo valor de T_{interna} , animais dessensibilizados por capsaicina expostos ao calor apresentam menor T_{cauda} em relação ao grupo controle, sugerindo que a dessensibilização aumenta o limiar de vasodilatação pela pele da cauda (ROMANOVSKY et al., 2009). Assim, nossos resultados mostram que os canais TRPV1 são importantes para a eficiência do processo termorregulatório de ratas durante a exposição ao ambiente quente. Acreditamos também que o E2 atue amplificando as respostas desse canal, mas novos estudos são necessários para melhor compreensão do hormônio nesse processo.

O limiar e a sensibilidade de dissipação de calor também foram alterados na ausência dos canais TRPV1, evidenciando uma alteração central e periférica dos mecanismos de dissipação de calor. Levando-se em consideração que esses canais presentes na região abdominal são importantes componentes da termorregulação, a

destruição das fibras que expressam os canais TRPV1 pode ter comprometido as vias ascendentes que chegam às regiões envolvidas no controle de temperatura, sendo um dos fatores que pode ter desencadeado o aumento do limiar de dissipação de calor. Interessantemente, o limiar da rata E2 ($37,75^{\circ}\text{C} \pm 0,08$) é muito semelhante ao da rata E2 + Veículo ($37,57^{\circ}\text{C} \pm 0,06$). No entanto, quando os canais TRPV1 das ratas tratadas com E2 são destruídos (grupo E2 + RTX), observa-se uma grande elevação do limiar ($38,65^{\circ}\text{C} \pm 0,16$), assemelhando-se ao grupo óleo ($38,42^{\circ}\text{C} \pm 0,19$). Assim, podemos dizer que os canais TRPV1 desempenham uma ação importante juntamente com o E2 na homeostase térmica em fêmeas.

7 CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos nesse estudo, concluímos que a eficiência do processo termorregulatório de ratas é dependente da ação do E2 e dos canais TRPV1, e que a ausência de um desses componentes provoca prejuízo dos mecanismos de controle de temperatura em ambiente aquecido.

8 REFERÊNCIAS

ALBRECHT, U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. **Neuron**, vol. 74, p. 246-260, 2012.

BALEY, M., SILVER, R. Sex differences in circadian timing systems: implications for disease. **Neuroendocrinology**, vol. 35(1), p. 111-139, 2014.

BAYLIE, R. L., BRAYDEN, J. E. TRPV channels and vascular function. **Acta Physiol**, vol. 203, p. 99 - 116, 2011.

BOULANT, J. A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clin Infect Dis**, vol. 31, S157–S161, 2000.

BUIJS, R. M. et al. The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. **J Endocrinol**, vol. 177, p. 17–26, 2003.

BURNS, G. SARKAR, D. K. Transforming growth factor-b1-like immunoreactivity in the pituitary gland of the rat: effect of estrogen. **Endocrinology**, vol. 133, p. 1444-1449, 1993.

CANNON, B.; NEDERGAARD. J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological Reviews**, vol. 84, p. 277-359, 2004.

CARDOSO, T. S. R. Participação do relógio biológico no efeito do estradiol sobre o ganho de peso induzido pela ovariectomia. Dissertação de mestrado apresentado na Universidade Federal de Minas Gerais.

CATERINA, M. J. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, vol. 292 (1), R64-76, 2007.

CATERINA, M. J. On the thermoregulatory perils of TRPV1 antagonism. **Pain**, vol. 136, p. 3-4, 2008.

CHAPPUIS, S. et al. Role of the circadian clock gene *Per2* in adaptation to cold temperature. **Molecular Metabolism**, vol. 2(3), p. 184 -193, 2013.

CHO, T. CHABAN, V. V. Expression of P2X3 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons from estrogen receptors- α and estrogen receptor- β knock-out mice. **Neuroreport**, vol. 20; 23(9), p. 530–534, 2012.

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

DELANOË, D. et al. Class, gender and culture in the experience of menopause. A comparative survey in Tunisia and France. **Social Science & Medicine**, vol. 75, p. 401- 409, 2012.

DIOGENES, A. et al. Prolactin modulates TRPV1 in female rat trigeminal sensory neurons. **The Journal of Neuroscience**, vol. 26(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. **Br J Pharmacol**, vol. 143 (8), p. 1023-1032, 2004.

DRUMMOND, L. R. et al. Brain temperature in spontaneously hypertensive rats during physical exercise in temperate and warm environments. **PLOS ONE**, vol. 11 (5), p. 1-19, 2016.

DUARTE, G. V., TRIGO, A. C., PAIM, F. Skin disorders during menopause. **Cutis**, vol. 97(2), p. 16-23, 2016.

FATEHI, M., FATEHI-HASSANABAD, Z. Effects of 17 β -estradiol on neuronal cell excitability and neurotransmission in the suprachiasmatic nucleus of rat. **Neuropsychopharmacology**, vol. 33, p. 1354–1364, 2008.

FEBRASGO – Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia. Climatério: Manual de orientação, 1995.

FREEDMAN, R. R. Hot flashes: behavioral treatments, mechanisms, and relation to sleep. **The American Journal of Medicine**, vol. 118, 124S–130S, 2005.

GARAMI, A. et al. Contributions of different modes of TRPV1 activation to TRPV1 antagonist-induced hyperthermia. *J Neurosci*, vol. 27; 30(4), p. 1435–1440, 2010.

GAVVA, N. R. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. **Trends Pharmacol Sci**, vol. 29, n. 11, p. 550-7, 2008.

GAVVA, N. R., et al. Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. **Pain**, vol. 136, n. 1-2, p. 202-210, 2008.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiol Behav**, vol. 47, p. 963–991, 1990.

GRAVES, N. S., HAYES, H. FAN, L., CURTIS, K. S. Time course of behavioral, physiological, and morphological changes after estradiol treatment of ovariectomized rats. **Physiology e Behavior**, vol. 103, p. 261-267, 2011.

HOSONO, T. et al. Effects of estrogen on thermoregulatory tail vasomotion and heat-escape behavior in freely moving female rats. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, vol. 280, R1341–R1347, 2001.

HUDSON, A. S. R. et al. Involvement of the TRPV1 channel in the modulation of spontaneous locomotor activity, physical performance and physical exercise-induced physiological responses. **Braz J Med Biol Res**, vol. 49(6), 2016.

JEONG, K. Y.; SEONG, J. Neonatal capsaicin treatment in rats affects TRPV1-related noxious heat sensation and circadian body temperature rhythm. **J Neurol Sci**, vol. 341, n. 1-2, p. 58-63, 2014.

LEHMAN, M. N., et al. Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. **J Neurosci**, vol. 7, n. 6, p. 1626-1638, 1987.

LOWREY, P. L., TAKAHASHI, J. S. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. **Nature Rev**, vol. 9, p. 764-775, 2011.

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

MOHAWK, J. A.; GREEN, C. B.; TAKAHASHI, J. S. Central and peripheral circadian clocks in mammals. **Annu Rev Neurosci**, vol. 35, n., p. 445-462, 2012.

MONTELL C, RUBIN G. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for photo transduction. **Neuron**, vol. 2, p. 1313-23; 1989.

MONTELL C. The venerable inveterate invertebrate TRP channels. **Cell calcium**, vol. 33, p. 409–417, 2003.

MORETIN, P. B. M. Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. **Cell Metabolism** , vol. 20, p. 41–53, 2014.

MORRISON, S. F., MADDEN, C. J., TUPONE, D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. **Cell Metabolism**, vol. 19, p. 741-756, 2014

MORROW, P. K. H., MATTAIR, D. N., HORTOBAGYI, G. N. Hot flushes: A review of pathophysiology and treatment modalities. **The Oncologist**, vol. 16, p. 1658–1664, 2011.

MOSQUERA, L. et al. Comparison of two methods of estradiol replacement: their physiological and behavioral outcomes. **J Vet Sci Technol**, vol. 30; 6(6): 276, 2015.

MURPHY, P. J., CAMPBELL, S. S. Sex hormones, sleep, and core body temperature in older postmenopausal women. **Sleep**, vol. 30(12), p. 1788-1794, 2007.

NADEL, E. R. et al. Periferal modifications to the central drive for sweating. **J. Appl Physiol**, vol. 31, n.6, p. 828-833, 1971.

NAGASHIMA, K. et al. Neuronal circuitries involved in thermoregulation . **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, vol. 85, p.18-25, 2000.

NAKAMURA et al. Effect of estrogen on the expression of *Cry1* and *Cry2* mRNAs in the suprachiasmatic nucleus of female rats. **Neuroscience Research**, vol. 41, p. 251–255, 2001.

NAKAMURA, K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, vol. 301, R1207–R1228, 2011.

OPAS, E. E. et al. Estrogenic control of thermoregulation in ER α KO and ER β KO mice. **Maturitas**, vol. 53, p. 210-216, 2006.

PATIL, M. J. et al. Prolactin regulates TRPV1, TRPA1, and TRPM8 in sensory neurons in a sex-dependent manner: Contribution of prolactin receptor to inflammatory pain. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, vol. 305, E1154–E1164, 2013.

PEDERSEN, S. F.; OWSIANIK, G., NILIUS, B. TRP channels: An overview. **Cell Calcium**, vol. 38, p. 233-252, 2005.

POHÓCZKY, K. et al. Estrogen-dependent up-regulation of TRPA1 and TRPV1 receptor proteins in the rat endometrium. **Journal of Molecular Endocrinology**, vol. 56, p. 135–149, 2016.

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

RAMSEY, S., DELLING, M., CLAPHAM, D. E. An introduction to TRP channels. **Annu. Rev. Physiol**, vol. 68, p. 619-647, 2005.

RITTER, R. C., KALIVAS, P., BERNIER, S. Cholecystokinin-induced suppression of locomotion is attenuated in capsaicin pretreated rats. **Peptides**, vol. 7, p. 587-590, 1986.

RITTER, R. C.; LADENHEIM, E. E. Capsaicin pretreatment attenuates suppression of food-intake by cholecystokinin. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative physiology**, vol. 248, n. 4, R501-R504, 1985.

ROMANOVSKY, A. A. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, vol. 292, R37-46, 2007.

ROMANOVSKY, A. et al. The Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channel in thermoregulation: A thermosensor it is not. **Pharmacol Rev**, vol. 61, p.228–261, 2009.

ROYSTON, S. E., BUNICK, D., MAHONEY, M. M. Oestradiol exposure early in life programs daily and circadian activity rhythms in adult mice. **Journal of Neuroendocrinology**, vol. 28, p. 1-12, 2016.

SHINOHARA, K. et al. Menstrual changes in sleep, rectal temperature and melatonin rhythms in a subject with premenstrual syndrome. **Neurosci Lett**, vol. 281, n. 2-3, p. 159-62, Mar 10 2000.

SILVA, N.L., BOULANT, J.A. Effects of testosterone, estradiol, and temperature on neurons in preoptic tissue slices. **Am J Physiol Regul Intergr Comp Physiol**, vol. 250, R625–R632, 1986.

SIMERLY, R. B., CHANG, C., MURAMATSU, M., SWANSON, L. W. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an *in situ* hybridization study. **J Comp Neurol**, vol. 294, p. 76–95, 1990.

SIMONNEAUX, V., BAHOUGNE, T. A multi-oscillatory circadian system times female reproduction. **Front Endocrinol (Lausanne)**, vol 6, p. 1-15, 2015.

SMITH, R. L. et al. Risk factors for extended duration and timing of peak severity of hot flashes. **PLOS ONE**, vol. 11(5), p. 1-13, 2016.

SOKOLOVE, P. G.; BUSHELL, W. N. The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. **J Theor Biol**, vol. 72, n. 1, p. 131-160, 1978.

STEINER, A. A. et al. Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. **The Journal of Neuroscience**, vol. 27(28), p.7459 –7468, 2007.

STOLWIJK, J. A. J. et al. Modification of central sweating drive at the periphery. **Int. J. Biometeor**, vol. 15, n. 2-4, p. 268-272, 1971.

SZELÉNYI et al. Daily body temperature rhythm and heat tolerance in TRPV1 knockout and capsaicin pretreated mice. **Eur J Neurosci**, vol. 19(5), p.1421-1424, 2004.

TAKAHASHI, J., et al. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. **Nature**, vol. 9, p. 764-775, 2008.

ZUCKER, I., FITZGERALD, K. M., MORIN, L.P. Sex differentiation of t-e circadian system in the golden hamster. **Am J Physiol**, vol. 238, R97–R101, 1980.

YAZĞAN, Y., NAZIROĞLU, M. Ovariectomy-I nduced 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. **Mol Neurobiol**, 2016.

WANG, H., SIEMENS J. TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. **Temperature**, vol. 2, p. 178–187, 2015.

WEND, K., WEND, P., KRUM, S. A. Tissue-specific effects of loss of estrogen during menopause and aging. **Frontiers in Endocrinology**, vol. 3 (19), p. 1-14, 2012.