

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

Nayara Abreu Coelho Horta

**Sinalização da variação de temperatura corporal interna para o
relógio biológico via canais TRPV1**

Belo Horizonte
2015

Nayara Abreu Coelho Horta

Sinalização da variação de temperatura corporal interna para o relógio biológico via canais TRPV1

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Área de Concentração: Fisiologia

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

Co-orientadores: Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra e Prof. Dr. Samuel Penna Wanner

Belo Horizonte
2015

Ao Fernando, pelo apoio incondicional.

Aos meus pais, pilares da minha formação.

Aos meus irmãos, pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho e me guiar, colocando a minha volta pessoas maravilhosas.

Aos meus queridos e amados pais, pelo apoio e por me incentivar a ir atrás dos meus sonhos, com ética e respeito ao próximo.

Ao Fernando, pelo companheirismo e cumplicidade, sempre com muito amor e carinho. Se não fosse por ele, hoje eu não estaria concluindo essa etapa.

Aos meus irmãos, pela amizade e carinho.

Ao Mauro e a Flavinha, pelo apoio e bondade que sempre tiveram comigo.

À Prof^a. Maristela, que me recebeu de braços abertos e com tanta benevolência. Não poderia ter escolhido uma orientadora melhor! Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e confiança. A cada dia lhe admiro mais, como pessoa e como profissional. Sua dedicação a ciência, sua alegria e empolgação ao ver cada resultado (não importando de quem seja) nos inspira e incentiva a seguir neste caminho. Sou grata por tudo que aprendi e vivenciei.

Aos meus co-orientadores Prof. Samuel Wanner e ao Prof. Cândido Coimbra, pela atenção e ensinamentos.

A Prof^a. Ana Castrucci, que mesmo tão longe, nos ajudou de todas as formas. Obrigada por disponibilizar o seu laboratório e por me receber com tanto afeto em sua casa.

A Prof^a. Leida Botion pelo acolhimento no laboratório e ensinamentos.

A Thais, amiga de longa data e que se tornou minha “irmã” de laboratório. Agradeço pela cumplicidade, companheirismo em todas as horas. Ao Fred, pelos ensinamentos e pelas “ogrisses”. Ao Mauro, pela presença de espírito, por me ajudar com os pôsteres e pelo apoio. Agradeço profundamente a ajuda

dos três, afinal, foram muitas madrugadas sem dormir, muitos experimentos, troca de conhecimento e bate-papo. Sem vocês, não conseguiria realizar este trabalho. São pessoas que admiro pela inteligência e competência, no qual tive a honra de poder trabalhar junto, obrigada por todo carinho, atenção e disponibilidade que vocês tiveram durante todo este período.

Aos amigos que conquistei ao longo deste mestrado, Lu, Vini, Hyo, vocês alegrem os meus dias, me ensinaram tantas coisas (científicas e “da vida”). Obrigada pelas discussões, disposição, carinho, convívio e risadas sem fim. Estes momentos juntos foram fundamentais para mim. Ao “casal amigo”, Fernanda e Marcelo, pela troca de conhecimento, pelos bate-papos e pelo carinho.

Ao Alexandre, que se prontificou a me ensinar as técnicas de dessensibilização e CCK sempre com muita alegria e solidariedade. Ao Lucas, que me “salvou” com algumas análises estatísticas, e ao Helton, pela disposição em me ajudar em alguns momentos.

Aos colegas de laboratório, Flavinha e Andreza, pela convivência e pela ajuda. A técnica Rose que nos ajudou muito no laboratório.

Ao pessoal do laboratório de Endocrinologia, sempre de portas abertas, disponibilizando os equipamentos e salas para os meus experimentos. Ao pessoal do laboratório de Pigmentação (USP), todos muito solícitos em me ajudar com o qPCR.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas que fizeram e fazem parte da minha formação acadêmica.

Ao pessoal da secretária, Cynthia, Rodner e Nilda, sempre solícitos e amigáveis.

Aos técnicos do biotério, sempre cuidando dos animais com muito profissionalismo e zelo.

Agradeço ao povo brasileiro por custear os meus estudos e permitir a realização de pesquisas. As agências de fomento CAPES, pela bolsa de mestrado, FAPEMIG e FAPESP pelo suporte financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico
- ALE - Atividade locomotora espontânea (ALE)
- AVP - Vasopressina arginina
- BCP - 1-Bromo-3-cloropropano
- Bmal1 - *Brain and muscle Arnt-like protein 1*
- CAMKII - Cinase dependente de cálcio/ calmodulina II
- CCK - Colecistoquinina
- Clock - *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*
- Clk ϵ - Caseína quinase I ϵ
- CRH - Hormônio liberador de corticotrofina
- Cry - *Cryptochrome*
- GRP - Peptídeo liberador de gastrina
- H₂O DEPC - Água tratada com dietil-pirocarbonato
- HSP - Proteína de choque térmico
- HSF - Fator de choque térmico
- NSQ - Núcleo supraquiasmático
- Per - *Period*
- Per1- *Period1*
- PVN - Núcleo paraventricular
- qPCR - PCR quantitativo em tempo real
- RTX - Resiniferatoxina
- s.c. – Subcutâneo
- TAU – unidade de período de uma oscilação
- T_{interna} - Temperatura interna

TRP - Receptores de Potencial Transiente

TRPA - Receptor de Potencial Transiente ANKTM

TRPV1 - Receptor de Potencial Transiente Vanilóide 1

TRPM - Receptor de Potencial Transiente Melastatina

U.A. - Unidades arbitrarias

VIP - Peptídeo intestinal vasoactivo

ZT - *Zeitgeber*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotos representativas da secção de 800 µm da região do NSQ e microdissecção do NSQ.....	35
Figura 2: Efeito do antagonista AMG-517 sobre a T_{interna} e ALE antes e durante 100 minutos após infusão da droga..	44
Figura 3: Efeito do bloqueio dos canais TRPV1 sobre os níveis de RNAm de <i>rPer1</i> e <i>Bmal1</i> do fígado, da adrenal e do núcleo supraquiasmático de ratos eutanasiados 1 hora depois de apresentarem um aumento da T_{interna} ..	45
Figura 4: Registro da T_{interna} e ALE antes, durante e após o aquecimento.....	46
Figura 5: Efeito da exposição à ambiente quente (34°C) no ZT0 sobre os níveis de RNAm de <i>rPer1</i> e <i>rBmal1</i> do fígado, da adrenal e do NSQ de ratos eutanasiados 1 hora depois de apresentarem um aumento de 0,6°C na temperatura interna.....	47
Figura 6: Efeito do bloqueio dos canais TRPV1 e do aquecimento passivo na expressão de RNAm dos canais TRPV1 no fígado, adrenal e no NSQ..	48
Figura 7: Níveis séricos de corticosterona dos animais que foram tratados com o antagonista para os canais TRPV1 e dos animais expostos a ambiente quente.	49
Figura 8: Percentual de alteração na ingestão alimentar induzida pela CCK nos animais dos grupos controle e do grupo tratado com RTX..	50
Figura 9: Actograma com a acrofase da ALE de um animal do grupo veículo e de um animal do grupo tratado com RTX.....	51
Figura 10: Período do ritmo circadiano (TAU) em horas, dos animais do grupo veículo e dos animais do grupo tratado com RTX.....	52

Figura 11: Efeito do tratamento com RTX sobre o horário da início da ALE dos animais do grupo veículo e dos animais do grupo tratado..	52
Figura 12: Efeito do tratamento com RTX sobre a amplitude do ritmo circadiano da $T_{interna}$ e da ALE dos animais do grupo veículo e do grupo RTX..	53
Figura 13: Valores de amplitude da ALE do animal do grupo veículo e do animal tratado com RTX.....	54
Figura 14: Valores de amplitude da $T_{interna}$ do animal do grupo veículo e do animal tratado com RTX.....	55
Figura 15: Variação da $T_{interna}$ nos animais do grupo veículo e do grupo tratado..	56
Figura 16: Variação da $T_{interna}$ nos animais do grupo veículo e do grupo tratado, entre os dias 4 e 10.....	57
Figura 17: Efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 sobre a expressão de RNAm de <i>rPer1</i> e <i>rBmal1</i> do fígado, da adrenal e do NSQ..	59
Figura 18: Efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 sobre a expressão de RNAm dos canais TRPV1do fígado, da adrenal e do NSQ.....	60
Figura 19: Ilustração da participação dos canais TRPV1 na sincronização dos relógios periféricos..	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos primers e sondas utilizados no qPCR.....	40
Tabela 2: Horário de início de atividade (<i>onset</i>).....	87
Tabela 3: Valores da média de $T_{interna}$ dos animais do grupo veículo e do grupo tratado com RTX.	88

RESUMO

As variações circadianas de temperatura interna (T_{interna}) têm sido propostas como um importante agente sincronizador dos relógios periféricos, por um mecanismo ainda não esclarecido. Acredita-se que os canais receptores de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1) participam da percepção térmica periférica. Assim, aventamos a hipótese de que este canal participe dos mecanismos de sinalização das variações circadiana de temperatura para os relógios periféricos. Avaliamos, em ratos adultos, o efeito do bloqueio e da dessensibilização dos TRPV1 sobre a expressão dos genes de relógios em tecidos periféricos e no núcleo supraquiasmático (NSQ, relógio central), a T_{interna} e atividade locomotora (ALE) circadiana. A T_{interna} e ALE foram registradas por telemetria. Os animais foram injetados i.v. com antagonista, AMG-517, ou i.p. com o agonista do canal TRPV1, a resiniferatoxina (RTX), numa dose suficiente para dessensibilizar os canais da cavidade abdominal. Animais injetados com os veículos destas drogas foram utilizados como controle. Após a infusão com AMG-517, observou-se T_{interna} elevada nos tempos 20, 30, 40, 80, 90 e 100 minutos comparada ao grupo veículo. Cada animal foi sacrificado 1 hora depois do primeiro ponto que ocorreu uma elevação de T_{interna} . Os animais tratados com RTX ou veículo foram eutanasiados no *Zeitgeber* (ZT) 0 (luzes são acessas), 6, 12 e 18. Nestes animais, os ritmos circadianos de T_{interna} e da ALE apresentaram uma diminuição na amplitude e uma antecipação do início da atividade. O RNAm dos genes de relógio, *rPer1* e *rBmal1*, e do *rTRPV1* foram analisado por qPCR no fígado, adrenal e em microdissecções do NSQ. No fígado, o AMG-517 aumentou *rBmal1*, enquanto que, na adrenal, aumentou o *rPer1*. Estes

resultados apontam para um papel do TRPV1 no mecanismo de arrastamento do relógio. O RTX bloqueou o ritmo circadiano de *rPer1* e *rBmal1* na adrenal, e no fígado, somente de *rPer1*. A dessensibilização dos canais TRPV1 gerou uma alteração no ritmo circadiano da T_{interna} e da expressão dos genes de relógio, sugerindo que este canal possa ser crítico para a sinalização do ritmo de temperatura para os relógios periféricos. Após o bloqueio dos canais TRPV1, observamos ainda, uma redução nas concentrações séricas de corticosterona, o que pode ser devido ao impacto da disfunção do relógio biológico sistêmico ou mesmo do relógio local da adrenal.

Palavras chaves: ritmos circadianos, adrenal, NSQ, antagonista dos canais TRPV1, dessensibilização.

ABSTRACT

Circadian oscillations in core temperature have been proposed as an important synchronizer of peripheral clocks, but the mechanism is still unclear. It is believed that transient receptor of potential vanilloid channel (TRPV1) participates on peripheral thermal perception. Thus, we hypothesize that this channel is involved in circadian temperature perception. We evaluated, in adult rats, the effects of blockage and of desensitization of TRPV1 on clock gene expression in suprachiasmatic nucleus (SCN, central clock) and peripheral tissues, on core temperature (T_{core}) and on spontaneous locomotor activity (SLA). T_{core} and SLA were registered by telemetry. A group of animals was injected i.v. with AMG-517 antagonist and another group was injected i.p. with TRPV1 agonist, resiniferatoxin (RTX) in a sufficient dose to desensitize these channels in abdominal cavity. Animals were injected with corresponding vehicles as a control. After infusion of AMG-517, T_{core} were elevated at 20, 30, 40, 80, 90 e 100 minutes compared to vehicle group. Each animal was euthanized 1 hour after the first elevated T_{core} . RTX-treated animals or vehicle were euthanized in zeitgeber (ZT) 0 (lights on), 6, 12, 18. Circadian rhythm of core temperature and spontaneous locomotor activity showed a decrease in the amplitude and an advance locomotor activity onset in desensitized animals. Clock genes' RNAm *rPer1*, *rBmal1* and *TRPV1* were analyzed using qPCR in liver, adrenal and in microdissections of SCN. In liver, AMG-517 increased *rBmal1* while in adrenal, it increased *rPer1*. These results point to a role for TRPV1 on the clock entrainment mechanism. RTX blocked circadian rhythm of *rPer1* and *rBmal1* in adrenal where as in liver only of *rPer1*. The lack of TRPV1

channel function generates an alteration on circadian rhythm of core temperature and expression of clock genes, suggesting that this channel may be critical for signaling of temperature rhythm to peripheral clocks. After blockade of TRPV1 channels, it was also observed a reduction in serum concentrations of corticosterone, which could occur as consequence of the disruption of systemic biological clock or adrenal's local clock.

Key words: circadian rhythms, adrenal, SCN, TRPV1 antagonist, desensitization.

SUMÁRIO

1	Justificativa.....	17
2	Introdução.....	18
2.1	Relógio biológico endógeno.....	18
2.2	Maquinaria molecular dos relógios biológicos.....	21
2.3	Temperatura e o relógio biológico.....	22
2.4	Canais TRPV1.....	23
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.....	30
4.2.1	Efeito do bloqueio agudo dos canais TRPV1 e do aquecimento passivo sobre a T_{interna} , ALE, expressão gênica e corticosterona.....	30
4.2.2	Efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 na T_{interna} , ALE e expressão gênica.....	31
4.3	Implante do sensor e Registro da T_{interna} e ALE.....	32
4.4	Canulação da veia jugular.....	32
4.5	Bloqueio de Canais TRPV1.....	33
4.6	Dessensibilização dos canais TRPV1.....	34
4.7	Microdissecção do núcleo supraquiasmático.....	34
4.8	Teste da Colecistoquinina.....	35
4.9	Aquecimento dos animais.....	36
4.10	Extração de RNA, Reação de Transcriptase e PCR quantitativo Tempo-Real.....	36
4.10.1	Extração de RNA.....	36

4.10.2	Transcrição reversa.....	38
4.10.3	PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	38
4.11	Corticosterona sérica.....	40
4.12	Análise estatística.....	41
5	Resultados	43
5.1	Efeito do bloqueio agudo dos canais TRPV1 e do aquecimento passivo sobre a $T_{interna}$, ALE, expressão gênica e corticosterona	43
5.2	Efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 na $T_{interna}$, ALE e expressão gênica.....	49
6	Discussão.....	61
7	Conclusão	73
8	Referências Bibliográficas.....	74
9	Anexos	87

1 JUSTIFICATIVA

A vida moderna impõe aos organismos exposição a ciclos de luz diferentes aos determinados pelo padrão geofísico da terra, com uma exposição excessiva à luz. Esta imposição acarreta em mudanças no ciclo de sono e vigília. Já foi estabelecida uma associação entre as mudanças do ciclo sono e vigília e uma alta incidência de obesidade, hiperglicemia, hipertensão arterial, resistência à insulina, dislipidemia, depressão e síndrome metabólica. Esta associação tem sido atribuída a um desajuste do relógio biológico (VITATERNA; TAKAHASHI; TUREK, 2001; TUREK et al., 2005; BASS e TAKAHASHI, 2010; HUANG et al., 2011). O entendimento dos mecanismos que levam a sincronização do relógio biológico poderia trazer informações importantes para o controle destas patologias.

Em homeotérmicos, a temperatura interna (T_{interna}) parece ser um sinal diário relevante (senão universal) de ajuste dos relógios periféricos endógenos (BUHR; YOO; TAKAHASHI, 2010). Os canais Receptores de Potencial Vanilóide 1 (TRPV1) são sensíveis à temperatura, tendo importante papel na termorregulação dos mamíferos (MILLS et al., 2008; AHERN, 2013). O presente projeto teve como objetivo avaliar a participação dos canais TRPV1 sobre a maquinaria molecular do relógio biológico em tecidos periféricos (fígado e adrenal) e no relógio central (Núcleo Supraquiasmático - NSQ).

2 INTRODUÇÃO

2.1 Relógio biológico endógeno

Ritmos biológicos podem ser entendidos como manifestações claras de organização temporal, o qual permitiria aos organismos ocupar seu nicho temporal no momento adequado (PITTENDRIGH, 1993). A maioria das espécies apresenta variações rítmicas tanto comportamentais quanto autonômicas, sendo que estas alterações não são uma simples resposta às mudanças físicas que ocorrem ao longo de 24 horas no ambiente, mas devido à presença de um relógio circadiano endógeno (VITATERNA; TAKAHASHI; TUREK, 2001).

O relógio biológico endógeno permite que o organismo antecipe as alterações ambientais e se ajuste fisiologicamente para estas mudanças de luz, temperatura, disponibilidade de alimentos, dentre outras. Além disso, este relógio é importante para organização temporal interna, garantindo que as mudanças internas ocorram de forma coordenada (VITATERNA; TAKAHASHI; TUREK, 2001; KALSBECK et al., 2012). Assim, ritmos podem ser entendidos como a manifestação de um relógio biológico endógeno codificado geneticamente, que pode ser sincronizado com as diversas pistas ambientais, as quais se manifestam com periodicidade previsível (HAUS, 2007).

As pistas ambientais capazes de ajustar o relógio endógeno são denominadas de *Zeitgeber*, que significa “doador de tempo”. Dentre estas pistas ambientais, o ciclo claro-escuro aparece como a principal pista ambiental (HASTINGS, 1991). O ajuste diário das oscilações endógenas aos agentes sincronizadores é chamado de arrastamento. Arrastamento de um oscilador ocorre quando este é acoplado e regido por outro, assumindo assim o período

de seu regente, possibilitando a sincronização dos organismos a sua hora local (PITTENDRIGH, 1993). Em resumo, podemos dizer que o relógio biológico de mamíferos funciona segundo um sistema constituído por três partes; 1) o relógio central, localizado no NSQ do hipotálamo, responsável por gerar e sincronizar as oscilações periféricas, e os múltiplos relógios periféricos, localizados nos diversos tecidos; 2) sinais de entrada, que são as informações que chegam ao sistema, ou seja, as pistas ambientais, gerando o arraste dos relógios; 3) sinais de saída, que são as respostas eferentes geradas pelo relógio, de forma a organizar temporalmente o organismo (GOLOMBEK e ROSENSTEIN, 2010; AMARAL et al., 2014).

As evidências de que o NSQ é o responsável por gerar as oscilações endógenas, sendo considerado o relógio central de mamíferos, surgiram através de estudos no qual os animais com lesão neste núcleo apresentavam perda dos ritmos circadianos da atividade locomotora espontânea (ALE), da $T_{interna}$, de secreções hormonais, dentre outros eferentes do sistema circadiano. Quando estes animais eram transplantados com tecido encapsulado de NSQ, voltavam a apresentar ritmicidade de algumas variáveis, como a ALE (LEHMAN et al., 1987; MEYER-BERNSTEIN et al., 1999). O NSQ pode ser dividido em duas partes, dorsomedial e ventrolateral, essa organização topográfica dos neurônios sugere uma divisão funcional para o NSQ. A parte ventrolateral é composta principalmente por neurônios que sintetizam o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e o peptídeo liberador de gastrina (GRP), já a região dorsomedial possui os neurônios secretores de vasopressina (AVP). A região ventrolateral recebe principalmente aferências da retina e de outras regiões do cérebro que recebem sinais fóticos. O dorsomedial, por outro lado,

recebe aferências de outras regiões do hipotálamo e áreas límbicas, assim como, da região ventrolateral do NSQ (GOLOMBEK e ROSENSTEIN, 2010; MOHAWK e TAKAHASHI, 2011).

O relógio central é sincronizado pelo tempo geofísico, principalmente via as mudanças de luz. Os sinais luminosos são captados pelos fotorreceptores da retina e transmitidos por sinais elétricos para os neurônios da região ventrolateral do NSQ, via trato retinohipotalâmico (FOSTER e KREITZMAN, 2014). Surpreendentemente, os cones e bastonetes não são essenciais para o ajuste do NSQ aos ciclos claro-escuros, e sim uma população de células, denominados de células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis, capazes de capturar a irradiação luminosa e enviar essa informação ao NSQ (FOSTER et al., 1991; PROVENCIO; ROLLAG; CASTRUCCI, 2002). A melanopsina parece ser o principal, mas não único fotopigmento responsável pelo ajuste do NSQ aos ciclos de claro/escuro (VAN DIEPEN; FOSTER; MEIJER, 2015).

Além do NSQ, cada célula do organismo possui relógio próprio. A análise da expressão das proteínas de relógio mostra que a acumulação destas proteínas ocorre de maneira circadiana em vários tecidos periféricos, tais como: fígado, músculo, rins e pulmão (ZYLKA et al., 1998; BALSALOBRE; MARCACCI; SCHIBLER, 2000; YAMAZAKI et al., 2000; STOKKAN et al., 2001; STORCH et al., 2002). Além desses tecidos, a expressão das proteínas de relógio já foi observada em cultura de células (BALSALOBRE; DAMIOLA; SCHIBLER, 1998; WHITMORE; FOULKES; SASSONE-CORSI, 2000). O NSQ ao receber a informação dos agentes sincronizadores, não força a ritmicidade em todos os órgãos e células do corpo, mas em vez disso, age como um maestro de uma orquestra, produzindo um sinal rítmico, a partir do qual as

várias partes que compõem a orquestra considerem esta pista de referência e assim, conseguem alinhar a sua atividade rítmica em conformidade (FOSTER e KREITZMAN, 2014). O desafio agora é compreender como cada um desses relógios detecta as pistas ambientais e ajusta sua fase de tal modo a levar à sincronização.

2.2 Maquinaria molecular dos relógios biológicos

A descoberta de que o relógio biológico possuía um caráter genético surgiu através da observação de que mutações genéticas podiam levar a alterações nos ritmos circadianos (HALL e ROSBASH, 1988). As primeiras mutações foram observadas em *Drosophosila melanogaster*, onde mutações de um gene do cromossomo X podiam levar a arritmicidade e a períodos mais longos ou curtos (KONOPKA e BENZER, 1971), depois em hamsters (portador de mutação no gene *tau*), que apresentam períodos mais curtos (RALPH e MENAKER, 1988).

O controle do funcionamento do relógio circadiano acontece por meio de alças auto-reguladas. Nos mamíferos, as proteínas dos genes *Clock* e *Bmal1* (*brain and muscle Arnt-like protein 1*) formam um heterodímero, funcionando como fator de transcrição para a expressão dos genes *Per* (*Period*) 1, 2 e 3, *Cry* (*Cryptochrome*) 1 e 2 (YAMAZAKI et al., 2000). PER e CRY formam oligômeros, que são fosforilados por uma caseína quinase e transportados do citoplasma para o núcleo (YAGITA et al., 2002). Uma vez no núcleo celular, o dímero PER-CRY bloqueia a transcrição de seus respectivos genes ao interagir com CLOCK/BMAL1 inibindo sua ação, resultando no fim da transcrição de *Per* e *Cry* (YOUNG e KAY, 2001; OKAMURA; YAMAGUCHI; YAGITA, 2002). As proteínas REV-ERB α e ROR aumentam com a indução da transcrição de

Clock/Bmal1; uma vez no núcleo, ligam-se ao promotor de *Bmal1*, respectivamente, reprimindo ou estimulando a transcrição deste fator. Quando a proteína REV-ERB está ausente, o gene *Bmal1* (e possivelmente também o gene *Clock*) é liberado, podendo formar novamente o fator de transcrição CLOCK/BMAL1, reiniciando um novo ciclo circadiano. (PREITNER et al., 2002).

Após sofrer hiperfosforilação pela ação da caseína quinase I ϵ (CkI ϵ), a estabilidade de PER diminui. Ocorre, então, a sua degradação no citoplasma, enquanto a proteína CRY liga-se à PER no núcleo, impedindo sua saída. Em algum ponto, quando a concentração de PER no núcleo torna-se muito baixa para manter a retroalimentação negativa, ocorre o início de um novo ciclo. Assim, a periodicidade do relógio circadiano, ao nível celular, resulta da combinação entre retroalimentação transcricional positiva e negativa, o movimento constante de PER entre o núcleo e o citoplasma, e a fosforilação e degradação de PER (ALBRECHT e EICHELE, 2003).

2.3 Temperatura e o relógio biológico

Uma característica proeminente dos ritmos circadianos é a compensação de temperatura, ou seja, embora a temperatura ambiente seja um potente modificador da taxa metabólica de homeotérmicos, isso não afeta o período do relógio circadiano (VAN DER VINNE et al., 2014). Os ciclos de temperatura, mesmo que sejam de baixas amplitudes, arrastam a fase do relógio circadiano de animais não-homeotérmicos tais como: lagartos, *Drosophila* e *Neurospora* (BROWN et al., 2002). Em culturas de neurônios da pineal de pintos ou de neurônios de NSQ de mamíferos, as variações de temperatura do meio conseguem alterar a fase do relógio biológico (BARRETT e TAKAHASHI, 1995; RUBY; BURNS; HELLER, 1999). Em animais

homeotérmicos, a T_{interna} é controlada e mantida dentro de um intervalo estreito apesar das variações de temperatura ambiente, desta forma, a temperatura externa é um agente sincronizador fraco para o relógio biológico (SAINI et al., 2012). No entanto, acredita-se que a T_{interna} atue como um importante agente sincronizador para os relógios periféricos (BUHR; YOO; TAKAHASHI, 2010). Foi observado que osciladores periféricos, incluindo fibroblastos, fígado, rim e intestino são sensíveis às mudanças de temperatura (ABRAHAM et al., 2010; BUHR; YOO; TAKAHASHI, 2010). Estes osciladores podem ser redefinidos por pulsos de temperatura de baixa amplitude, que imitam a gama de variação diária de T_{interna} , além disso, foi visto que o ritmo circadiano de T_{interna} consegue arrastar fortemente os relógios periféricos. No entanto, o NSQ é resistente aos ciclos de temperatura interna e externa (BROWN et al., 2002).

O NSQ é responsável por conduzir o ritmo circadiano da temperatura interna. Acredita-se que o relógio central sincronize os relógios periféricos através do controle circadiano da temperatura interna (MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012). Apesar dos avanços na descoberta da temperatura como um agente sincronizador ainda existe um lacuna em como as variações térmicas são sinalizadas para o relógio periférico.

2.4 Canais TRPV1

A família de canais denominados Receptores de Potencial Transiente (TRP) são canais catiônicos, sendo considerados sensores polimodais, envolvidos em uma variedade de processos celulares, principalmente aqueles, onde, observa-se um aumento de cálcio intracelular e alterações de voltagem da membrana celular. Estes canais fazem parte da membrana plasmática e podem funcionar como um transportador de cálcio.

Hoje, sabe-se que a superfamília dos canais TRP, além de muito ampla, é muito conservada, e está presente em todos os metazoários analisados até o momento (RAMSEY; DELLING; CLAPHAM, 2006). Nos mamíferos, a família dos TRP é constituída por aproximadamente 30 membros que percebem diversos estímulos físicos e químicos (PATAPOUTIAN et al., 2003). Esta família é dividida em nove subfamílias, de acordo com a similaridade na sequência de aminoácidos, sugerindo que repetidas duplicações gênicas e diversificações funcionais subsequentes tenham sido muito importantes durante a evolução desta família.

Os canais TRP têm mudado o conhecimento da fisiologia sensorial, como por exemplo, o da detecção de temperatura. Vários membros podem ser ativados por calor ou frio (TRPM8, TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM4 e TRPM5), conjuntamente, esses canais conseguem perceber variações de temperatura que vão do frio nocivo ao calor nocivo (ROMANOVSKY, 2007). Acredita-se que esses canais atuem, direta ou indiretamente, na termorregulação e na percepção da temperatura (CATERINA, 2007; MINKE, 2010). Além disso, uma série de experimentos realizados em *Drosophila viria* a comprovar que os canais TRP são essenciais para a fototransdução e percepção térmica nestes animais, sendo determinantes para o comportamento de discriminação de temperatura (MONTELL, 2005; MINKE e PETERS, 2011).

Dentre os canais TRP sensíveis ao calor, o canal Receptores de Potencial Transiente Vanilóide (TRPV1) vem recebendo bastante atenção. Estudos *in vitro*, mostram que este canal é sensível a temperaturas nocivas (acima de 43°C), podendo ser ativado também pela redução de pH, ligantes

exógenos conhecidos como vanilóides e ligantes endógenos (anandamida, produtos de lipoxigenase), nomeados como endovanilóides (CATERINA et al., 1997; CATERINA et al., 2000; VAN DER STELT e DI MARZO, 2004; DHAKA et al., 2009). Os canais TRPV1 estão amplamente expressos pelo corpo, incluindo fibras mielinizadas tipo A δ e não mielinizadas tipo C; nos terminais centrais dos gânglios da raiz dorsal e gânglios trigeminais (ROMANOVSKY et al., 2009); em diversas áreas cerebrais como hipocampo, hipotálamo, cerebelo e tálamo (VENNEKENS; OWSIANIK; NILIUS, 2008); e em tecidos não-neuronais como pâncreas, fígado, macrófago e queratinócitos (PEDERSEN; OWSIANIK; NILIUS, 2005; VENNEKENS; OWSIANIK; NILIUS, 2008).

Foi constatada a presença dos canais TRPV1 na área pré-ótica, região envolvida na termorregulação, e tem sido proposto que este canal teria um papel importante na termorregulação de mamíferos (CATERINA, 2007). Corroborando essa idéia, observou-se que o bloqueio do canal TRPV1, tanto em humanos quanto em ratos, leva à hipertermia (GAVVA et al., 2008). A infusão do agonista dos canais TRPV1, capsaicina, induz uma hipotermia seguida de um período de hipertermia, fortalecendo a idéia da participação destes canais no controle da temperatura interna (SZIKSZAY; OBAL; OBAL, 1982). Mills e colaboradores (2008) observaram que animais que eram submetidos à dessensibilização dos canais TRPV1 perdiam a sua capacidade de regular a temperatura interna durante o aquecimento. Acredita-se que os canais TRPV1 atuam na regulação da temperatura interna modulando as respostas autonômicas e comportamentais (CATERINA, 2007; ROMANOVSKY et al., 2009).

Duas formas farmacológicas possíveis, para investigar as funções do TRPV1, são por meio do bloqueio destes canais com antagonistas e por meio da dessensibilização dos canais com agonistas. Aplicações repetidas de agonistas como capsaicina, ou apenas uma dose de resiniferatoxina (RTX), acarreta em uma excitação transitória, seguida de dessensibilização dos canais TRPV1, ou seja, um estado refratário duradouro, no qual as respostas do canal aos estímulos são perdidas, além de poder ocorrer morte dos neurônios que expressam o canal. O processo de inativação parece ser dependente de cálcio, quando esse íon é retirado do meio extracelular, o efeito de dessensibilização é perdido, pois impede a ativação da calcineurina, importante para inativar o canal. (WINTER; BEVAN; CAMPBELL, 1995; CATERINA et al., 1997; ABBOTT; ATTARIAN; ZEE, 2014).

Considerando que a temperatura interna em homeotérmicos pode funcionar como um potente agente sincronizador da expressão dos genes de relógio em tecidos periféricos (BUHR; YOO; TAKAHASHI, 2010), postulado como um sinal universal (todos os relógios poderia responder a este ZT) e unidirecional, dado que o NSQ é resistente às oscilações da temperatura interna (BROWN et al., 2002; BUHR; YOO; TAKAHASHI, 2010; MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012). Neste trabalho propomos que o TRPV1 atue no mecanismo de sinalização da temperatura aos relógios periféricos, não só por estar envolvido nos mecanismos termo-sensorial em mamíferos, mas também porque em invertebrados os canais TRP respondem ao calor por uma via que envolve a ativação dos fotopigmentos rodopsina e melanopsina (MINKE e PETERS, 2011; SHEN et al., 2011).

Assim, o presente estudo avaliou a influência desses canais TRPV1 na maquinaria molecular do relógio biológico em tecidos periféricos e no relógio central de ratos adultos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo investigar a participação dos canais TRPV1 nos mecanismos de sincronização dos relógios biológicos periféricos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o efeito agudo do bloqueio dos canais TRPV1 sobre a T_{interna} , ALE e expressão dos genes de relógio e do *TRPV1*.

- Determinar o efeito do aquecimento passivo sobre a expressão dos genes de relógio e do *TRPV1*.

- Avaliar o efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 sobre a variação diária de temperatura e ALE.

- Determinar o efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 sobre a expressão dos genes de relógio e do gene *TRPV1* em tecidos periféricos e no NSQ.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar com peso médio de 250g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos por 7 dias em caixas coletivas (4 animais/caixa), antes da realização dos protocolos descritos a seguir, em um ciclo claro/escuro de 12/12 horas, à temperatura ambiente de 24°C e com regime de água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais realizados estavam de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), protocolo de número 324 / 2014.

A separação dos animais por grupo foi aleatória. Em todos os delineamentos os animais foram sacrificados por decapitação para coleta de sangue e dos tecidos (cérebro, fígado e adrenal). O soro foi obtido após centrifugação a -4 °C durante 20 minutos em rotação de 1946 G, armazenados em alíquotas em microtubos de 2 mL e mantidos à -20 °C. O cérebro foi imediatamente congelado em gelo seco para posterior obtenção do NSQ utilizando-se de agulhas de microdissecção. Os tecidos periféricos coletados foram imediatamente congelados em gelo seco e armazenados à -80 °C, esses foram processados para dosagem de RNAm. Os procedimentos realizados na fase escura do fotoperíodo foram realizados sob luz vermelha de intensidade de menos de 1 lux.

4.2 Delineamento experimental

4.2.1 Efeito do bloqueio agudo dos canais TRPV1 e do aquecimento passivo sobre a $T_{interna}$, ALE, expressão gênica e corticosterona

4.2.1.1 Experimento 1: Efeito agudo do bloqueio dos canais TRPV1 sobre a $T_{interna}$, ALE e expressão dos genes *rPer1*, *rBmal1* e do TRPV1.

Após o implante do sensor, na cavidade intraperitoneal, para captação da $T_{interna}$ e ALE e um cateter na veia jugular direita, os animais foram mantidos em caixas individuais por 4 dias e tiveram a $T_{interna}$ e ALE registrados a partir do primeiro dia, pós cirurgia. No ZT0 (momento em que as luzes são acessas) do quarto dia, foi infundido nos animais (i.v.) o antagonista para TRPV1(AMG – 517) ou o seu veículo. Os animais foram sacrificados uma hora após atingir o pico da $T_{interna}$, induzido pelo tratamento, tiveram o sangue e os tecidos coletados para análise da expressão de RNAm para o *rPer1*, *rBmal1* e do TRPV1.

4.2.1.2 Experimento 2: Efeito do aquecimento passivo sobre a expressão dos genes *rPer1*, *rBmal1* e do TRPV1.

Uma vez que o bloqueio dos canais TRPV1 pelo AMG -517 acarreta em um aumento da $T_{interna}$, este experimento foi proposto para avaliar se as mudanças que ocorreram na expressão gênica não seriam causadas pelo aumento da $T_{interna}$, mas devido a perda da função dos canais TRPV1. Foi inserido o sensor para captação da $T_{interna}$ e ALE, os animais foram colocados em gaiolas individuais e, a $T_{interna}$ e ALE foram registrados a partir do primeiro dia. No ZT 0 do quarto dia, um grupo de animais foi exposto a um ambiente de 34 °C por 40 minutos ou até atingir aproximadamente o mesmo valor de $T_{interna}$

induzida pelo antagonista. Após atingirem o pico de T_{interna} , os animais foram sacrificados e o sangue e os tecidos foram coletados para análise da expressão de RNAm para *rPer1*, *rBmal1* e do *TRPV1*.

4.2.2 Efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 na T_{interna} , ALE e expressão gênica

4.2.2.1 Experimento 3: Efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 sobre a T_{interna} e da ALE.

Após o implante de sensor para captação da T_{interna} e ALE, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, o registro de T_{interna} e ALE foram feitos a partir do primeiro dia e continuaram até o décimo terceiro dia. No quarto dia, os animais foram anestesiados e injetados (i.p.) com RTX. No nono dia, os animais foram submetidos a um jejum de 24 horas e, no décimo dia, foi testado a eficiência da dessensibilização com uma injeção (i.p.) de colecistoquinina (CCK), no décimo segundo dia, este teste foi repetido. Neste experimento não foi coletado nenhum tecido, uma vez que estes animais passaram pelo teste da CCK.

4.2.2.2 Experimento 4: Efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 sobre a expressão gênica

Os animais foram anestesiados e injetados (i.p.) com RTX. Os animais foram mantidos em caixas coletivas (4 animais/ caixa). No quinto dia, os animais foram sacrificados no ZT0, ZT6, ZT12 e ZT18. A expressão de RNAm para *rPer1*, *rBmal1* e *TRPV1* foi analisada nos tecidos coletados.

4.3 Implante do sensor e Registro da $T_{interna}$ e ALE

A $T_{interna}$ e a ALE dos animais foram monitoradas e registradas continuamente após a implantação do sensor de telemetria, utilizando o programa de processamento e armazenamento de dados, Vital View Software (VitalView® Data Acquisition System, Software version 4.0). Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (cloridrato de Cetamina, Cetamin 80 mg/Kg, i.p.) e xilazina (cloridrato de xilazina, Anasedan 10mg/Kg i.p.) e cada animal recebeu um sensor de telemetria (modelo G2 E-Mitter, Mini-MitterCompany, Sun River, OR, USA) na cavidade peritoneal, por meio de uma incisão feita na região ventral, de aproximadamente 2 cm, posteriormente foi feita uma incisão na linha Alba do músculo reto abdominal, o sensor foi introduzido e fixado junto a parede interna do músculo. Ao término da cirurgia, foi aplicada uma injeção de 0,2 mL por animal de antibiótico i.m. nas patas traseiras (Pentabiótico Veterinário®, FortDodge Saúde Animal Ltda; 240 000 UI das penicilinas, 100 mg de estreptomicina e diidroestreptomicina) e um injeção s.c. na dose de 2,5 mg/ Kg de peso corporal do analgésico antiinflamatório (Banamine®, 50 mg/ml, Schering-Plough). Cada caixa com um animal foi posicionada sobre uma placa receptora (ER-4000 Energizer/Receiver, Mini-MitterCompany, Sun River, OR, USA) conectada em série a um computador pessoal contendo o software de aquisição de dados. Os registros da $T_{interna}$ e da ALE iniciaram assim que os animais foram colocados sobre os receptores.

4.4 Canulação da veia jugular

Foi utilizado um cateter de poliuretano (Micro – Renathane; Braintree Scientific, Braintree, MA), de 10 cm de comprimento, dividido em 3 e 7 cm por

um ponto de ancoragem. Sob a mesma anestesia descrita no item acima, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, fixou-se as patas dianteiras, de modo a expor a região torácica. Após tricotomia e esterilização da região clavicular direita, foi feita uma incisão longitudinal na pele, na região clavicular, local onde a veia jugular externa direita localiza-se. O tecido adiposo foi divulsionado até a exposição completa da veia. O cateter foi implantado conforme técnica descrita anteriormente (HARMS e OJEDA, 1974; POLETINI et al., 2003). Uma seringa foi acoplada à cânula, e a confirmação do posicionamento correto do cateter foi feito através do aparecimento de sangue ao longo da cânula. Foi feito o preenchimento do cateter com uma solução estéril de salina heparinizada (30 U/ mL), todos os dias era feito a limpeza da cânula com esta solução.

4.5 Bloqueio de Canais TRPV1

Para realização do bloqueio dos canais TRPV1, foi administrado, via veia jugular, o antagonista, AMG-517 (doado pelo Dr. Andrej A. Romanovisky, Saint Joseph Hospital and Medical Center, Arizona, Phonix), na dose de 0,3 mg/ kg de peso corporal. Esta droga é um potente e seletivo antagonista dos canais TRPV1, que bloqueia a ativação deste canal pela capsaicina, por prótons e por calor (GAVVA et al., 2007a; WANNER et al., 2012), nesta concentração, induz uma hipertermia de aproximadamente 0,7 °C (GAVVA et al., 2008).

A solução etanólica de AMG-517 (3 mg/ mL) foi aliquotada e armazenada a -80 °C. Esta solução foi diluída 10 vezes em álcool etílico absoluto, obtendo uma concentração de 0,3 mg/ mL. A diluição deste estoque em salina estéril foi feita no dia do experimento, com o propósito de se obter a

concentração desejada, foi injetado 1 mL/ kg de peso corporal nos animais do grupo tratado. O grupo controle recebeu o veículo da droga (solução aquosa de etanol a 20 %), diluído em salina estéril, o volume injetado em cada animal foi de 1 mL/ kg de peso corporal. Durante cinco dias antes do experimento, os animais foram manipulados da mesma maneira que para a infusão via veia jugular, a fim de adaptá-los ao procedimento.

4.6 Dessensibilização dos canais TRPV1

Os animais foram anestesiados com mistura de ketamina (80 mg/ kg i.p.) e xilazina (10 mg/ kg i.p.), pois a dessensibilização dos canais TRPV1 causa dor e desconforto ao animal e, a seguir, foram injetados com 20 µg/ kg i. p de RTX (Sigma-Aldrich) em um grupo de animais. Para preparação da solução de estoque (100 µg/ mL), foi diluído 1mg do RTX em 10 mL de álcool etílico absoluto, esta solução foi armazenada a -80 °C. No dia do experimento, a solução de estoque foi diluída em salina estéril, a fim de obter a concentração desejada, sendo mantida em gelo e ao abrigo de luz durante todo o procedimento. O grupo que recebeu o veículo da droga, que corresponde a 20 % de álcool etílico dissolvido em salina estéril, foi considerado como controle. O volume injetado em cada animal foi de 1 mL/ kg.

Dogan e colaboradores (2004) demonstraram que o RTX, extraído da *Euphorbia poissonii*, nesta concentração dessensibilizam os nervos intra-abdominais.

4.7 Microdissecção do núcleo supraquiasmático

Cérebros coletados, foram utilizados para avaliar a expressão de *rPer1*, *rBmal* e *rTRPV1* no NSQ e o efeito dos tratamentos nesta região. Secções de

800 µm foram obtidas em criostato da região hipotalâmica, onde se encontra o NSQ (Bregma - 0,92 mm a - 1,40 mm), segundo as coordenadas do atlas de Paxinos & Watson (The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2007). Foi utilizado uma agulha de 1 mm de diâmetro para selecionar a região do NSQ, utilizando a técnica de Palkovits (1983).

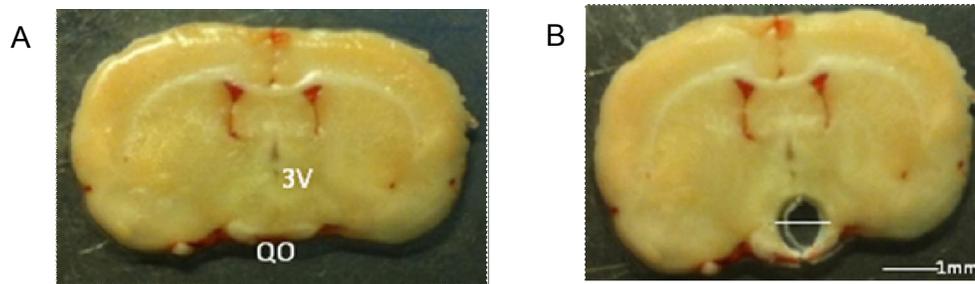


Figura 1: Fotos representativas da secção de 800 µm da região do NSQ e microdissecção do NSQ. Em A antes da microdissecção e, em B, após. 3V, terceiro ventrículo, QO, quiasma óptico.

4.8 Teste da Colecistoquinina

Para confirmação da dessensibilização dos canais TRPV1, os animais foram submetidos ao teste de saciedade induzido pela CCK. O teste se baseia na habilidade da CCK, através da sua ação nas fibras sensoriais vagais, via TRPV1, em causar saciedade (RITTER e LADENHEIM, 1985; SOUTH, 1992; SCHWARTZ et al., 1999). Cada animal foi testado em dois dias separados, após 24h de privação alimentar. Foi injetado CCK (6 µg/ kg, i.p.) em um dia e salina (1 mL/ kg, i.p.) em outro, assim todos os ratos receberam ambas as injeções, sendo que a ordem das mesmas foi feita de forma aleatória. Cinco minutos após a injeção, uma quantidade fixa de ração era apresentada e a quantidade ingerida, em 30 minutos, registrada. A diferença entre o consumo alimentar (teste com CCK menos teste com salina) foi expressa como

porcentagem da quantidade da ingestão alimentar no teste com salina. O valor negativo demonstra que a CCK diminuiu o consumo alimentar (Dogan, 2004).

4.9 Aquecimento dos animais

Os animais foram mantidos dentro de uma caixa acrílica individual (com livre movimentação). Os ratos foram mantidos em temperatura ambiente (24 °C, controle) ou foram submetidos ao aquecimento passivo, 34 °C, por 40 minutos ou até atingirem o mesmo valor de T_{interna} induzida pelo antagonista. Neste protocolo de exposição ao calor, os ratos foram submetidos a uma temperatura ambiente de 34°C, alcançada por uma corrente de ar constante, gerada por dois aquecedores portáteis (CeramicFanHeater – 1500W – OnixSmartChoice, AUS), que foram posicionados nas extremidades opostas da caixa. A temperatura da caixa era monitorada por duas sondas de temperatura (modelo 409 – Reusable Temperature Probe skin, Yellow Springs Instruments, OH, EUA) fixadas na parede da caixa, as sondas foram conectadas a dois termômetros de precisão (modelo 4,600 Precision Thermometer, Yellow Spring Instruments, OH, EUA). A T_{interna} foi registrada continuamente em intervalos de 10 segundos até o final do experimento. Tanto o animal controle quanto o animal aquecido tiveram a temperatura da caixa e interna monitoradas.

4.10 Extração de RNA, Reação de Transcriptase e PCR quantitativo Tempo-Real

4.10.1 Extração de RNA

O RNA total dos tecidos isolados foi extraído com *TRizol Reagent* (Invitrogen, E.U.A.). Os tecidos foram homogeneizados em microtubos de 2 mL, previamente autoclavados, com 1 mL de *TRizol* em cada amostra. Após 5

minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 200 μ L de 1-Bromo-3-cloropropano (BCP), esta solução foi agitada e mantida por 10 minutos em temperatura ambiente. Realizou-se uma centrifugação por 15 minutos a 12.000 G à 4 °C, e o sobrenadante contendo o RNA, foi transferido cuidadosamente para um microtubo autoclavado de 1,5 mL, no qual adicionou-se 650 μ L de isopropanol. As amostras ficaram 10 minutos em temperatura ambiente e seguiu-se outra centrifugação por 35 minutos a 12.000 G à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 1,3 mL de etanol 75% ao precipitado seguido de vortexização e centrifugação por 15 minutos a 12.000 G à 4 °C, esta lavagem do RNA foi feita 2 vezes. Colocou-se as amostras *overnight* a - 20 °C seguindo de centrifugação a 12.000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi descartado e, para secar o *pellet*, os microtubos foram deixados por 10 minutos abertos e invertidos. O RNA do fígado e da adrenal foram ressuspensos em 50 a 80 μ L de água tratada com dietil-pirocarbonato (H₂O DEPC, LifeTechnologies), já o RNA do NSQ foi ressuspensado em 20 μ L de H₂O DEPC. Um volume de 20 μ L numa concentração média de 0,5 μ g de RNA foi tratado com DNase (Kit turbo-DNA-freeTM, Life Technologies), em cada amostra foi adicionado 10% do volume de tampão para DNase I e 1 μ L de DNase I (Ambion). A seguir, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Foi acrescentado 10% do volume de reagente de inativação, com incubação de 2 minutos, em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000 G à 4 °C por 2 minutos, o sobrenadante foi retirado e armazenado à -80 °C.

4.10.2 Transcrição reversa

A reação de transcriptase reversa foi realizada em microtubos de 500 µL previamente autoclavados a partir de 1 µg de RNA. Utilizou-se 1 µL de random primers (100 ng/µL, Life Technologies), 1 µL de dNTP (10 mM, Life Technologies) e H₂O DEPC para um volume final de 13 µL. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65 °C por 5 minutos e à 4 °C por 1 minuto. Após incubação foi adicionada, à solução anterior, 4 µL de tampão de PCR 5X, 1 µL de DTT (0,1M), 1 µL de inibidor de ribonuclease (40 U/µL, Life Technologies) e 1 µL da enzima Superscript III RT (200 U/ µL, SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Life Technologies), finalizando um volume de 20 µL por reação. Posteriormente as amostras foram incubadas à 25 °C por 5 minutos; 50 °C por 50 minutos e 70 °C por 15 minutos. O cDNA resultante do processo foi armazenado à -20 °C.

4.10.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

O qPCR foi realizado em placas de 96 poços, utilizando um par de primers e sonda específicos para espécie, esses foram feitos com base nas sequências obtidas a partir do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>), desenhados e sintetizados pela empresa IDT (Coralville, IA, EUA) (Tabela 1). O RNA ribossômico 18S foi usado como normalizador dos ensaios, com primers desenhados em região altamente conservada. O composto fluorescente escolhido foi o TaqMan® (Life Technologies), o que permite analisar vários genes simultaneamente, nas nossas análises conjugamos os genes *rPer 1*, e *18S* e depois os genes *rBma1* e *rTRPV1* foram feitas separadamente. As soluções para cada gene continham: os primers antisense e senso (300nM para os genes de interesse e 50nM para o 18S); a sonda (200nM para os

genes de interesse e 50nM para o normalizador); e Platinum® Supermix(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Os ensaios foram realizados em um termociclador I5 thermal-Cycler (Bio-rad Laboratories Hercules – Califórnia - E.U.A.), para selecionar o ciclo de temperatura, seguiu-se as instruções do fabricante do Supermix: 1 ciclo a 95 °C por 7 minutos seguido por 45 ciclos de 30 segundos a 95 °C e, 30 segundos a 55 °C.

O número de ciclos equivale à interseção da curva com o limiar, sendo denominado de ciclos de temperatura (CT) foi utilizado para a análise do RNAm relativo. O Δ CT foi encontrado pela diferença do valor médio das triplicatas do gene de interesse e do normalizador. O menor valor de Δ CT do grupo controle foi usado como calibrador e subtraído de cada valor de Δ CT do grupo tratado com AGM-517 ou do grupo de animais aquecido, assim foi obtido um $\Delta\Delta$ CT. Este valor foi utilizado como uma exponencial negativa na base 2 ($2^{-\Delta\Delta$ CT). Para o experimento de dessensibilização, o menor valor médio do Δ CT do grupo controle foi utilizado como calibrador. Os dados foram obtidos a partir de, pelo menos, 2 animais, a partir de duas experiências diferentes. No final, o log dos valores foi calculado e representado graficamente em relação ao valor de menor expressão, do grupo calibrador.

Tabela 1: Sequência dos primers e sondas utilizados no qPCR.

18S RNA	<p>Forward: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'</p> <p>Backward: 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'</p> <p>Probe: 5'-HEX-TGC TGG CAC CAG ACT TGC CCT C-BHQ_1-3'</p>
RattusBmal1	<p>Forward: 5'-AGGCCTTCACTGGAATGGTGCTAT-3'</p> <p>Backward:5'- TGA CTGGCCTGGA ACTTGCTACAT-3'</p> <p>Probe: 5'-FAM -TTT GGG AAG AGA GGC AGA AGG AAT BHQ_1-3'</p>
RattusPer1	<p>Forward: 5'-ATGCAGAAACAACAGCCACGGTTC-3'</p> <p>Backward:5'-TGGCCAGGATCTTGAACACTGCTA-3'</p> <p>Probe: 5'-FAM- TCG ATG TAA CGG CTT GTG TGG ACT BHQ_1-3'</p>
Rattus TRPV1	<p>Forward: 5'-GTGGACAGCTACAGTGAGATAC-3'</p> <p>Backward:5'- CACCATGGAAGCCACATACT -3'</p> <p>Probe: 5'-FAM- AGT CGC TGT TCA TGC TGG TGT CT BHQ_1-3'</p>

4.11 Corticosterona sérica

Os níveis de corticosterona sérica foram determinados através da técnica de imunoenensaio - ELISA, utilizando kit específico (Enzo LifeSciences, Science Pro, São Caetano do Sul, SP, Brasil). A leitura das amostras foi feita em 405 nm.

4.12 Análise estatística

Os diferentes grupos foram codificados por uma pessoa diferente do experimentador, e este código foi utilizado para realização das análises estatísticas. O intervalo de confiança foi de 0,05. O teste de normalidade utilizado foi Shapiro-Wilk. O programa GraphPadPrism versão 5.0 (San Diego, CA, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas e confecção dos gráficos. O Sigma Plot versão 11.0 (San Jose, CA, EUA) foi utilizado para análises estatísticas dos dados de T_{interna} e ALE.

Para a comparação dos dados T_{interna} e ALE obtidos dos animais tratados com RTX ou tratados com AMG-517, e seus respectivos veículos foi utilizado *two-way* ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

As concentrações relativas de RNAm dos animais tratados com RTX e veículo foram comparadas por *two-way* ANOVA, seguida por *Bonferoni*. Foi utilizada *one-way* ANOVA, seguida por *Bonferoni*, para verificar diferenças temporais dentro de um mesmo grupo. As concentrações relativas de RNAm dos animais tratados com antagonista dos canais TRPV1 e com veículo foram comparadas pelo teste *t-student*.

As diferenças de ingestão alimentar (teste de CCK) entre os grupos tratados com RTX e veículo foi analisada por teste *t-student*. A concentração média de corticosterona sérica, do grupo tratado com o antagonista dos canais TRPV1 e veículo, e do grupo aquecido e controle, foram comparadas por teste *t-student*.

Para as análises dos actogramas, período (TAU), amplitude e do início de atividade (*onset*) utilizou-se o programa ClockLab (Actimetrics, IL, USA). Os registros foram agrupados em blocos de 2, e plotados numa resolução de 30

pontos por hora. Os actogramas foram construídos para que os padrões rítmicos de ALE fossem analisados, cada linha do gráfico representa um dia. O programa utiliza o teste estatístico Períodograma Qui-quadrado descrito por Sokolove e Bushell (1978) para poder calcular o período do ritmo. O período onde concentra-se a maior amplitude é considerado o TAU. Os valores de amplitude de ALE e T_{interna} foram calculados como a diferença entre os valores máximos e mínimos encontrados no períodograma. Foi utilizado o valor de confiança de 0,01. A comparação entre as médias de TAU e de amplitude máxima (acrofase) de cada grupo foi feita utilizando-se o teste *t-student*.

Para calcular o *onset*, o programa determinou o limiar de registro considerado atividade ou repouso, estes valores foram convertidos, em unidade de tempo e expressos em horas do dia. Este limiar foi traçado de acordo com o nível de registro do percentil 20 (registros que excederam exatamente em 20 % do total). Para a comparação entre as médias de onset de cada grupo utilizou o teste *t-student*.

O cálculo amostral foi realizado segundo a equação abaixo (SAMPAIO, 2002), utilizando o grupo experimental onde a variável foi considerada instável fornecendo número amostral suficiente para garantir a execução dos demais experimentos, possibilitando a detecção dos efeitos biológicos de acordo com o teste estatístico, o intervalo de confiança ($p < 0,05$) e o poder estatístico escolhidos (0,8).

$$X \pm t s / \sqrt{n}$$

Sendo, X, o valor médio de temperatura corporal interna de oito animais, t é um valor calculado baseado em uma probabilidade do erro tipo I de 0,05 e 8 graus de liberdade e s é o desvio padrão. N é o número de animais por grupo.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do bloqueio agudo dos canais TRPV1 sobre a T_{interna} , ALE, expressão gênica e corticosterona

Após 20 minutos da infusão do antagonista do canal TRPV1 (AMG-517), como esperado (GAVVA et al., 2007a), observou-se valores de T_{interna} maiores em relação ao grupo controle nos tempos 20, 30, 40, 80, 90 e 100 minutos (Figura 2 A). O tratamento não alterou a atividade locomotora (Figura 2 B). Ambos os grupos apresentaram um aumento da ALE no momento da manipulação ($p < 0,05$, Figura 2 B).

A análise da expressão dos genes de relógio demonstrou que o tratamento com AMG-517 ocasionou um aumento nos níveis de RNAm de *rBmal1*, no fígado ($n = 5$, $p = 0,02$, Figura 3 B) e de *rPer1*, na adrenal ($n = 5$, $p = 0,009$, Figura 3 C). Já no NSQ, o tratamento reduziu os níveis de *rPer1* ($n = 4$, $p = 0,002$, Figura 3 E).

Quando os animais foram expostos à 34 °C, o pico de temperatura interna ocorreu após 30 minutos. Estes valores foram próximos aos registrados após o tratamento com o antagonista ($0,6 \text{ °C} \pm 0,15$) e não persistiram ($n = 8$, $p < 0,05$, Figura 4 A). A atividade locomotora dos animais tanto em ambiente quente quanto em ambiente temperado manteve-se mais elevada durante a manipulação ($p < 0,05$). Entretanto, nos animais do grupo aquecido, este aumento permaneceu por 20 minutos após a manipulação ($p < 0,05$, Figura 4 B). Interessante notar que a exposição ao ambiente quente não alterou a expressão dos genes *rPer1* e *rBmal1* em nenhum dos tecidos analisados (Figura 5).

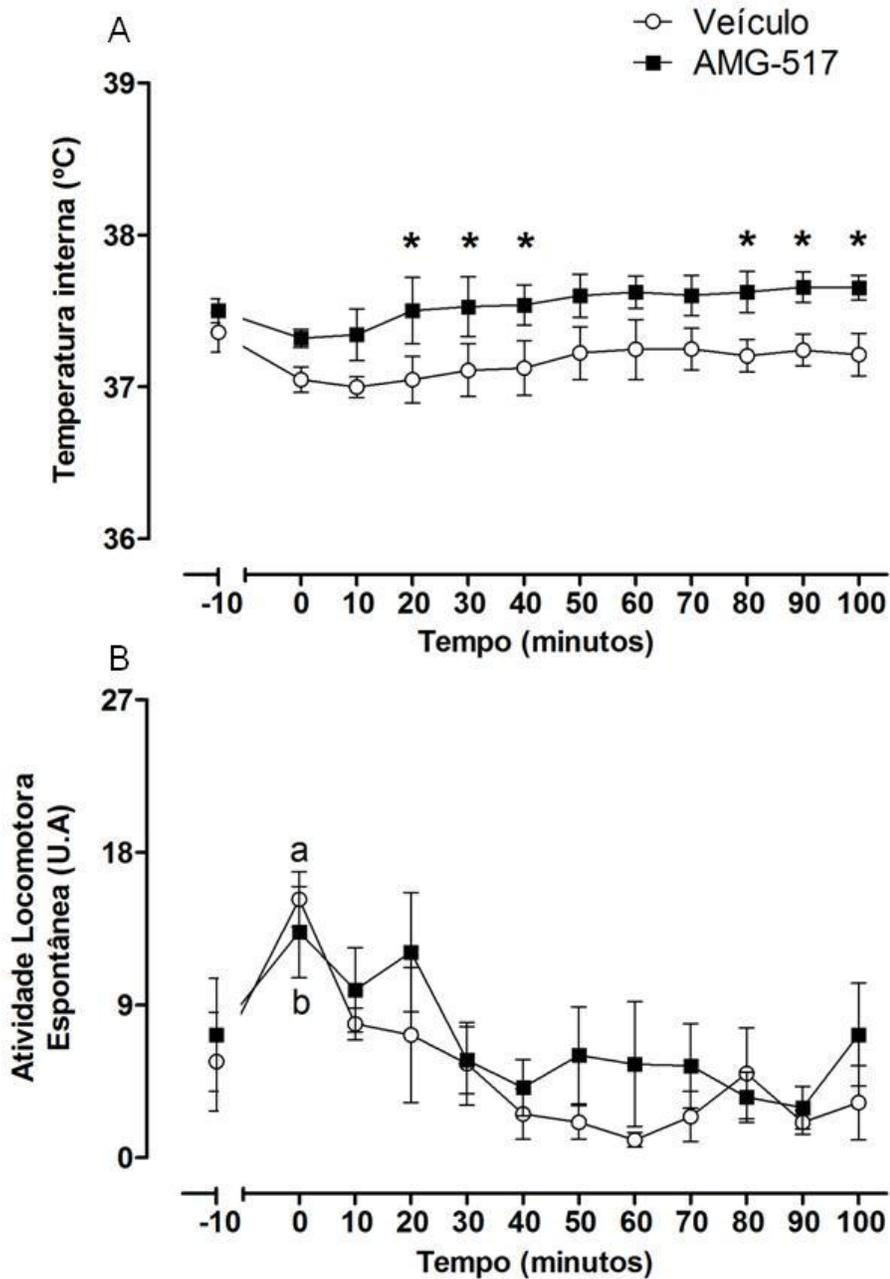
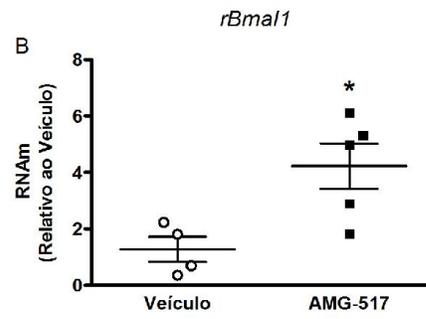
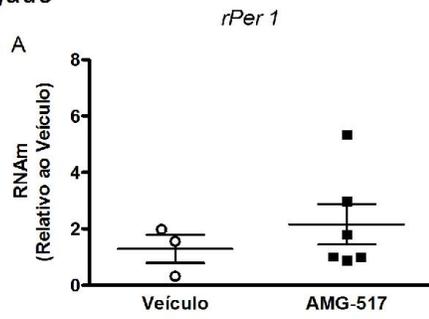
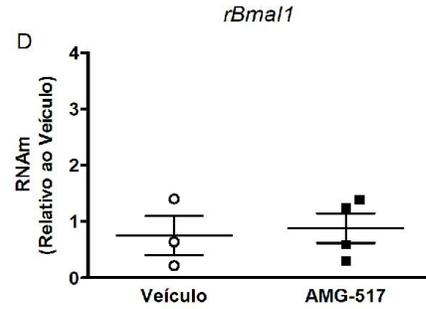
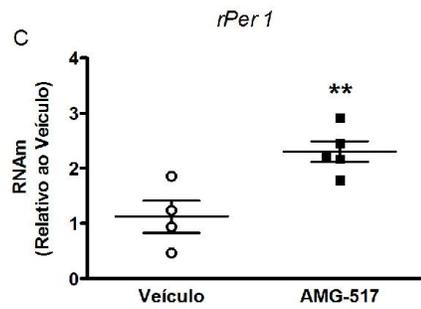


Figura 2: Efeito do antagonista AMG-517 sobre a temperatura interna (painel A) e atividade locomotora (painel B) antes e durante 100 minutos após infusão da droga. Os dados são apresentados pela média \pm EPM. *, $p < 0,05$ versus o veículo; no grupo veículo **a**, $p < 0,05$ versus 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100; no grupo tratado, **b**, $p < 0,05$ versus 80 e 90; pelo teste *two-way* Anova seguido de Tukey. Número de animais estudados (n) = 6, nos grupos veículo e tratado.

Fígado



Adrenal



NSQ

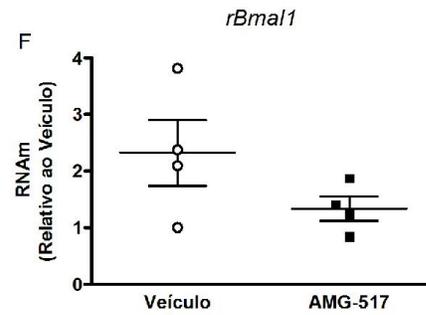
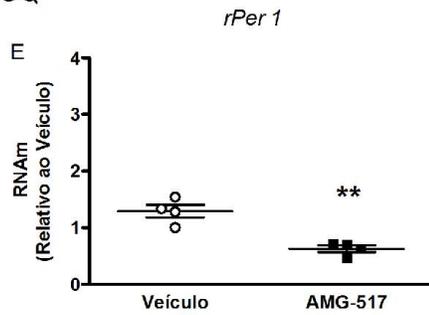


Figura 3: Efeito do bloqueio dos canais TRPV1 sobre os níveis de RNAm de *rPer1* e *Bmal1* do fígado (painel A e B), da adrenal (painel C e D) e do núcleo supraquiasmático (NSQ, painel E e F) de ratos eutanasiados 1 hora depois de apresentarem um aumento da temperatura interna. Os dados são apresentados pela média \pm EPM. *, $p < 0,05$ pelo teste *t-student*. **, $p < 0,001$ pelo teste *t-student*.

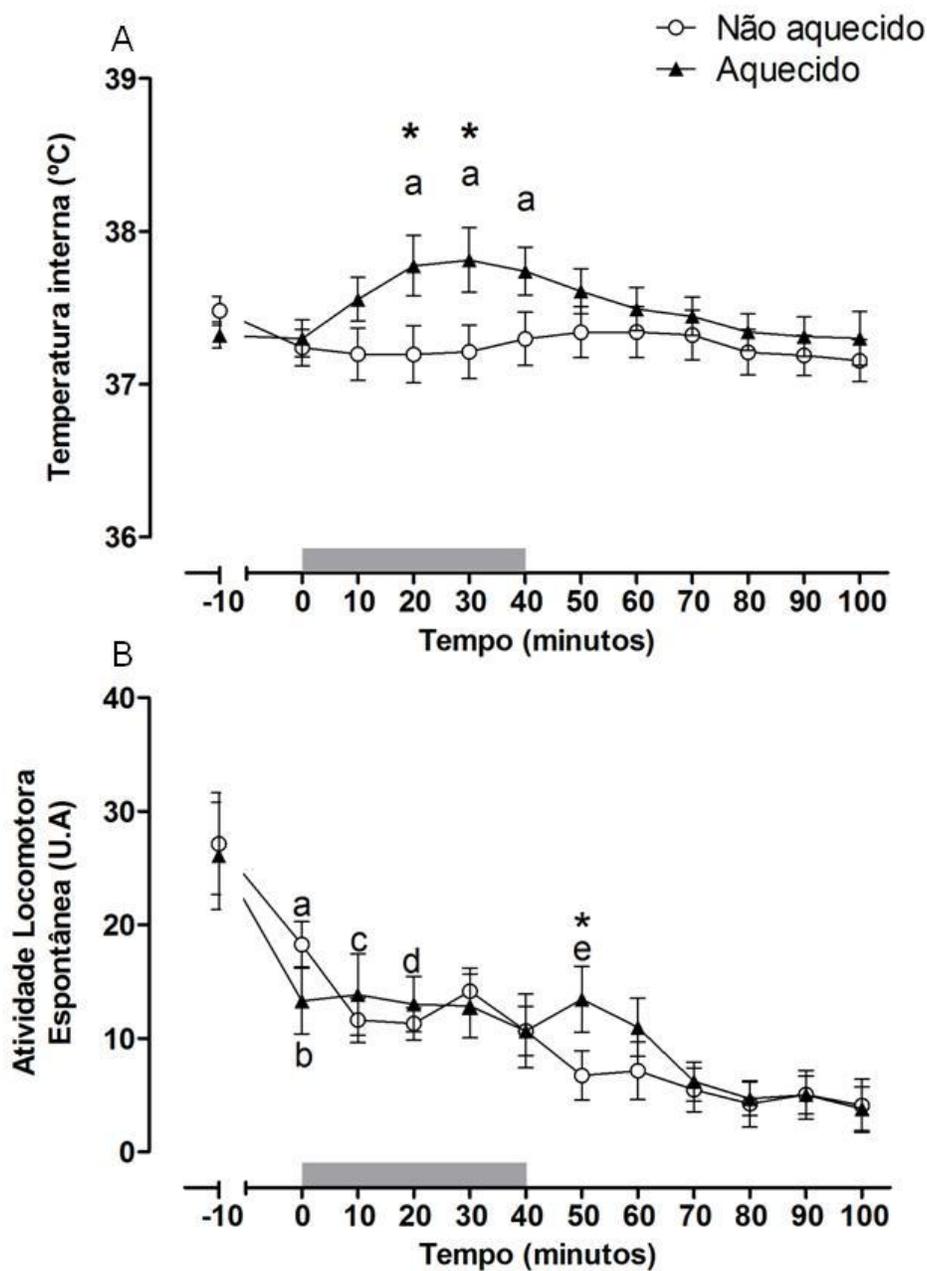
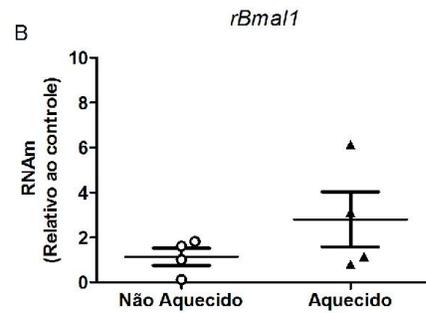
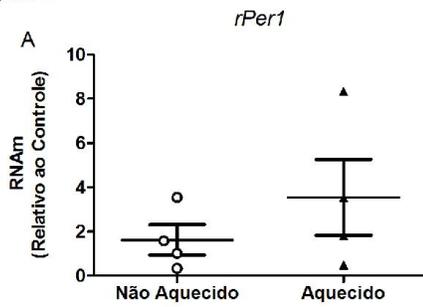
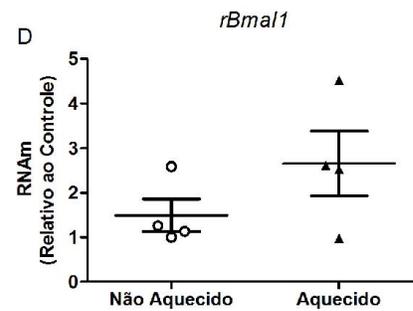
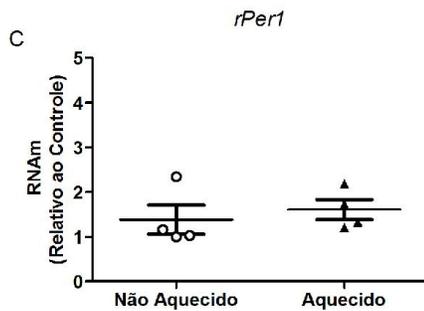


Figura 4: Registro da temperatura interna (painel A) e atividade locomotora (painel B) antes, durante e após o aquecimento. Os dados são apresentados pela média \pm EPM. *, $p < 0,05$ versus o não aquecido; no painel A, no grupo aquecido, **a**, $p < 0,05$ versus 60, 70, 80, 90, 100; no painel B, no grupo não aquecido **a**, $p < 0,05$ versus 50, 60, 70, 80, 90 e 100; no grupo aquecido, **b**, **d**, **e**, $p < 0,05$ versus 100, **c**, $p < 0,05$ versus 80 e 100; pelo teste *two-way* Anova seguido de Tukey. Retângulo cinza: duração do aquecimento. Número de animais estudados (n) = 6, nos grupos não aquecido e aquecido.

Fígado



Adrenal



NSQ

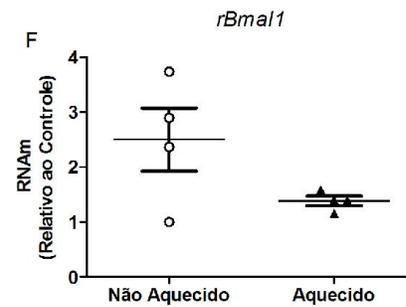
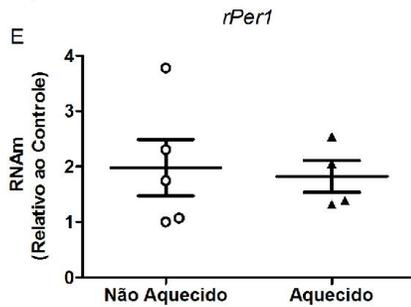
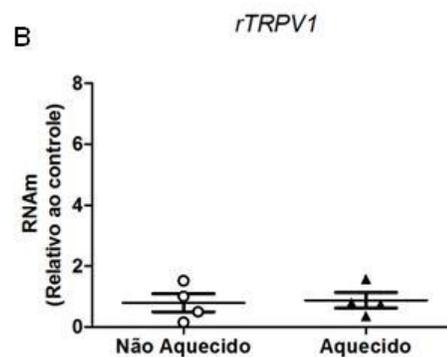
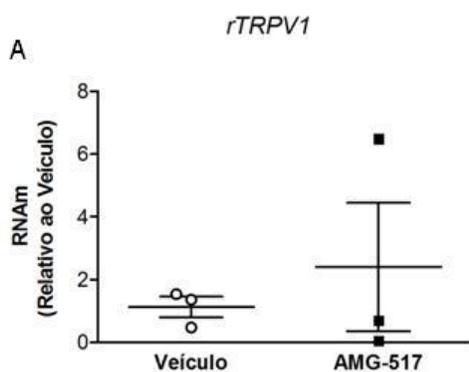
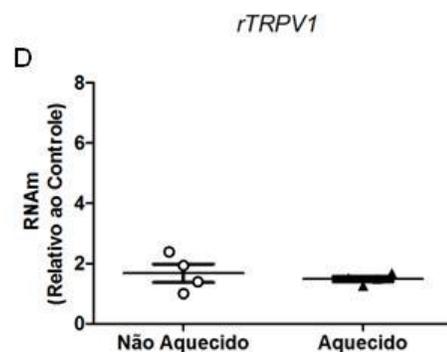
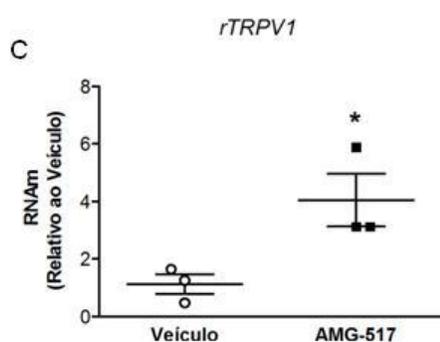


Figura 5: Efeito da exposição à ambiente quente (34°C) no ZT0 sobre os níveis de RNAm de *rPer1* e *rBmal1* do fígado (painel A e B), da adrenal (painel C e D) e do NSQ (painel E e F) de ratos eutanasiados 1 hora depois de apresentarem um aumento de 0,6°C na temperatura interna. Os dados são apresentados pela média \pm EPM.

Fígado



Adrenal



NSQ

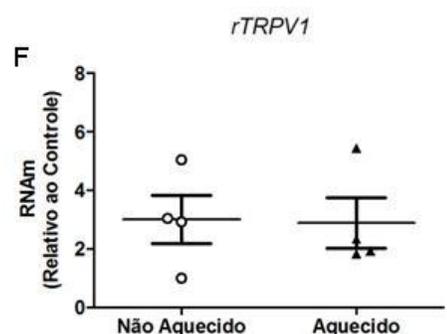
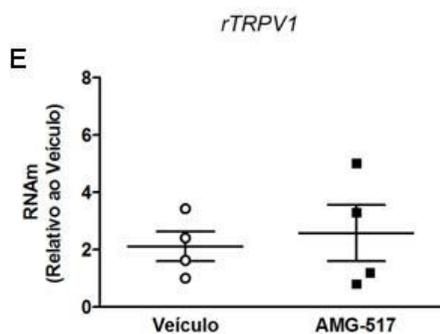


Figura 6: Efeito do bloqueio dos canais TRPV1 e do aquecimento passivo na expressão de RNAm dos canais TRPV1 no fígado (painel A e B), adrenal (painel C e D) e no NSQ (painel E e F). Os dados são apresentados pela média \pm EPM. *, $p < 0,05$ versus veículo, pelo teste *t-student*.

A expressão de TRPV1 e os níveis de corticosterona foram analisados nos dois delineamentos experimentais, tratamento com antagonista e exposição à ambiente quente. O antagonista aumentou a expressão dos canais TRPV1 somente na adrenal ($n = 3$, $p = 0,041$, Figura 6 C), sendo que no fígado e no NSQ não houve diferença entre os grupos. Além disso, este tratamento diminuiu as concentrações séricas de corticosterona ($n = 6$, $p = 0,032$, Figura 7 A). Estes resultados podem ser atribuídos a um efeito do bloqueio dos canais TRPV1, uma vez que, não foram observados nos animais expostos ao aquecimento (Figura 6 D e Figura 7 B).

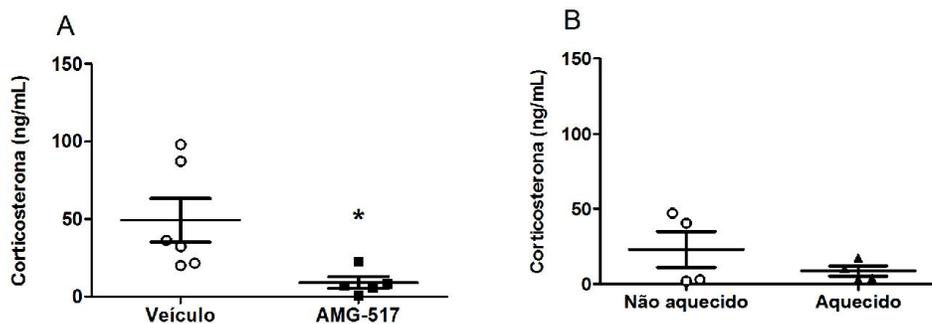


Figura 7: Níveis séricos de corticosterona dos animais que foram tratados com o antagonista para os canais TRPV1 (painel A) e dos animais expostos a ambiente quente (painel B). Os dados são apresentados pela média \pm EPM. *, $p < 0,05$ versus veículo, pelo teste *t-student*.

5.2 Efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 na $T_{interna}$, ALE e expressão gênica

O teste de CCK comprovou a eficácia da dessensibilização, como mostrado na figura 8, os animais dessensibilizados ($n = 15$) apresentaram maior consumo de ração ($p = 0,048$) que os animais do grupo veículo ($n = 11$) após o tratamento com CCK. Além disso, outro parâmetro medido que corrobora o efeito do RTX foi o peso corporal. Os animais tratados com o

veículo, o peso médio foi de $285,7 \pm 2,2$ g, sendo que nos animais dessensibilizados foi de $269,9 \pm 4,19$ g, apresentando perda de peso ($p < 0,05$).

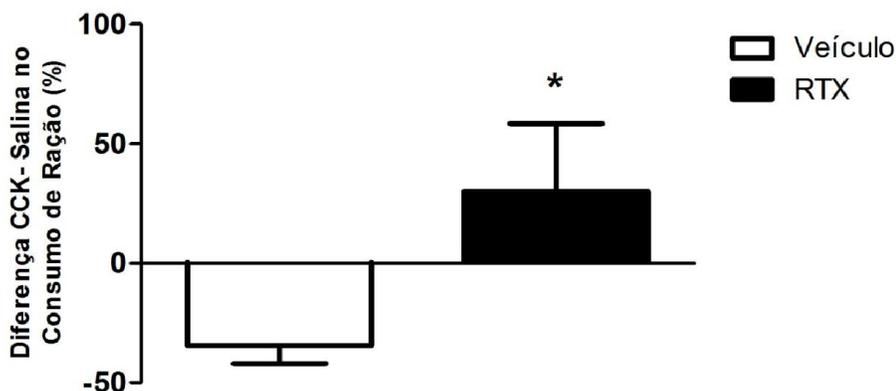


Figura 8: Percentual de alteração na ingestão alimentar induzida pela CCK nos animais dos grupos controle e do grupo tratado com resinoferatoxina (RTX). Os dados estão expressos como média \pm EPM. *, $p < 0,05$ versus veículo, pelo teste *t-student*. Número de animais estudados (n) = 11 e 15, respectivamente, nos grupos veículo e RTX.

A Figura 9 mostra um actograma representativo de um animal controle (painel A) e de um animal submetido a dessensibilização com RTX (painel B). Ambos os grupos apresentaram ritmo circadiano com valores de TAU similares ($n = 9$ veículo, $n = 11$ RTX, Figura 10). No entanto, os animais dessensibilizados mostraram uma dispersão maior na atividade locomotora ao longo das 24 horas, indicada pelos pontos de acrofase no actograma (figura 9). Além disso, após a dessensibilização dos canais TRPV1, os animais apresentaram alterações no horário de início da atividade locomotora, conhecido como *onset*. O tratamento com RTX acarretou em uma antecipação do *onset*, em 90 minutos ($n = 11$, $p = 0,002$, Figura 11 e Tabela 2 - ANEXO).

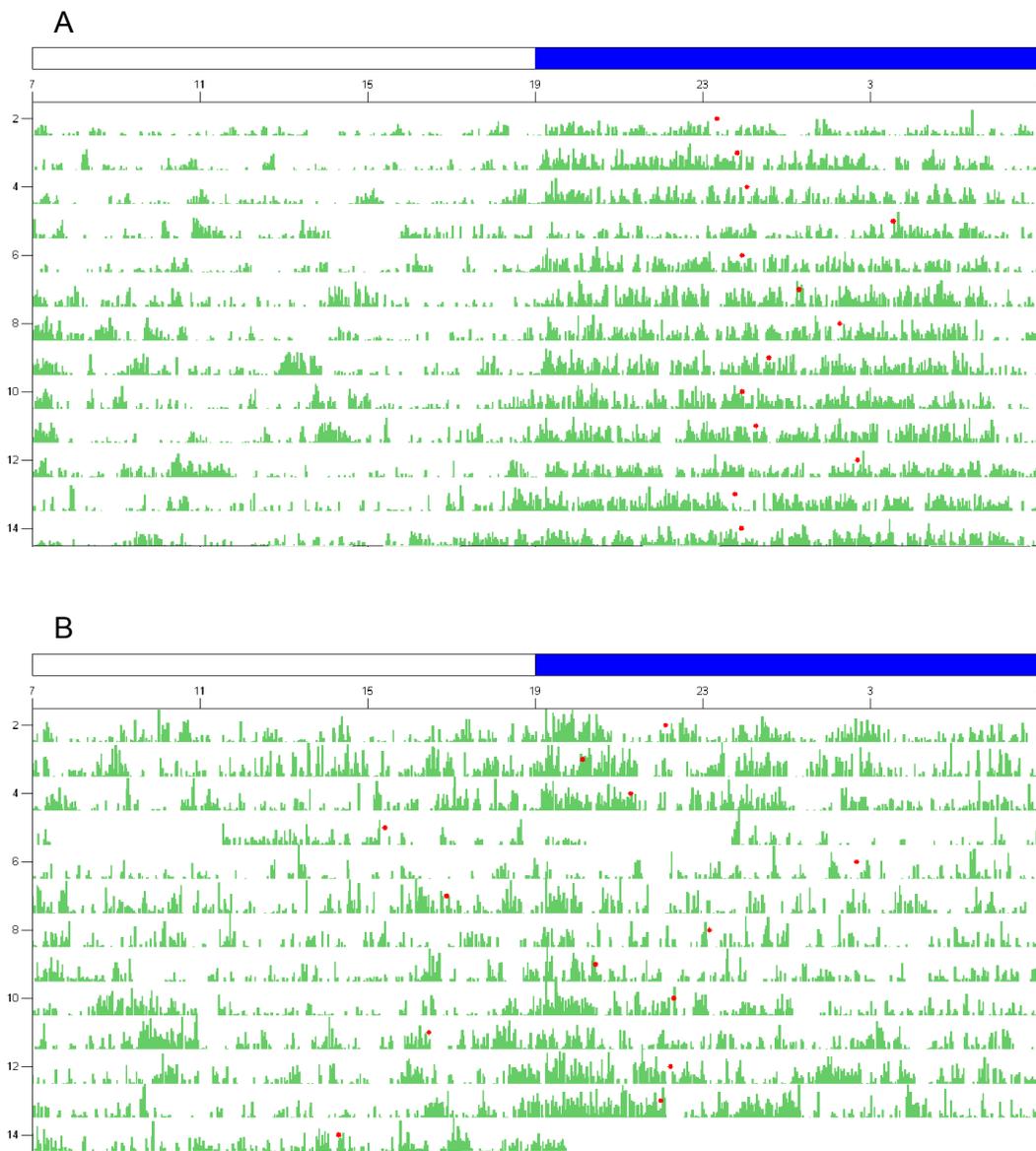


Figura 9: Actograma com a acrofase (pontos vermelho) da ALE de um animal do grupo veículo (painel A) e de um animal do grupo tratado com RTX (painel B). Faixa branca representa a fase em que as luzes estão acesas e faixa azul representa a fase em que as luzes estão apagadas. Números na lateral são referentes aos dias e os números na horizontal são referentes às horas do dia.

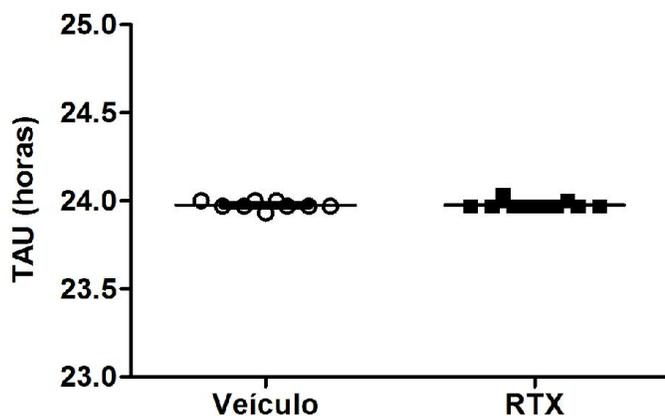


Figura 10: Período do ritmo circadiano (TAU) em horas, dos animais do grupo veículo e dos animais do grupo tratado com RTX. Os dados estão apresentados pela média \pm EPM. Número de animais estudados (n) = 9 e 11, respectivamente, nos grupos veículo e RTX.

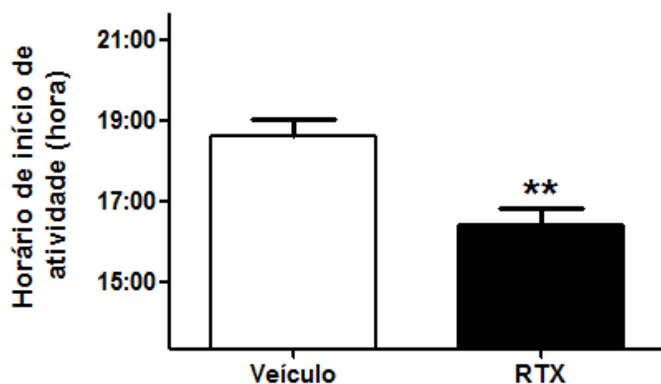


Figura 11: Efeito do tratamento com RTX sobre o horário da início da atividade locomotora dos animais do grupo veículo e, dos animais do grupo tratado. Os dados são apresentados pela média \pm EPM. **, $p < 0,01$ versus veículo pelo teste *t-student*. Número de animais estudados (n) = 10 e 12, respectivamente, nos grupos veículo e RTX.

Outra variável analisada foi a amplitude do ritmo de ALE e T_{interna} . Observou-se uma redução da amplitude da T_{interna} ($n = 11$, $p = 0,0082$, Figura 12 A) e da ALE ($n = 11$, $p = 0,0092$, Figura 12 B) nos animais dessensibilizados. Os periodogramas representativos de ALE e de T_{interna} , respectivamente, de um animal controle (painel A) e de um animal dessensibilizado (painel B), podem ser visualizados nas figuras 13 e 14, respectivamente.

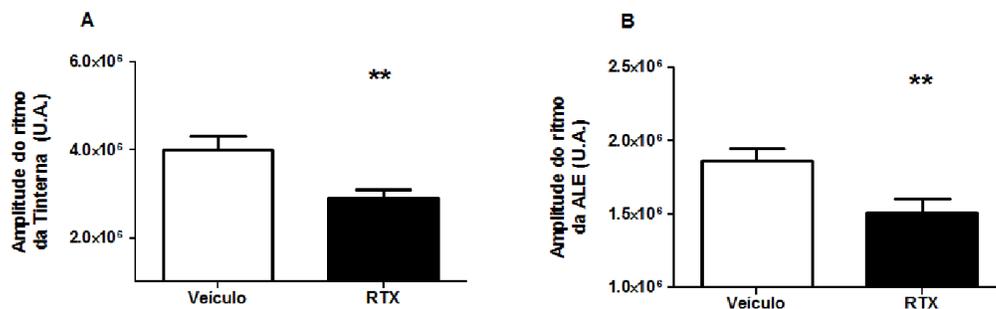


Figura 12: Efeito do tratamento com RTX sobre a amplitude do ritmo circadiano da Tinterna (painel A) e da ALE (painel B) dos animais do grupo veículo e do grupo RTX. Dados apresentados por média \pm EPM. **, $p < 0,01$ versus veículo pelo teste *t-student*. Número de animais estudados (n) = 10 e 12, respectivamente, nos grupos veículo e RTX.

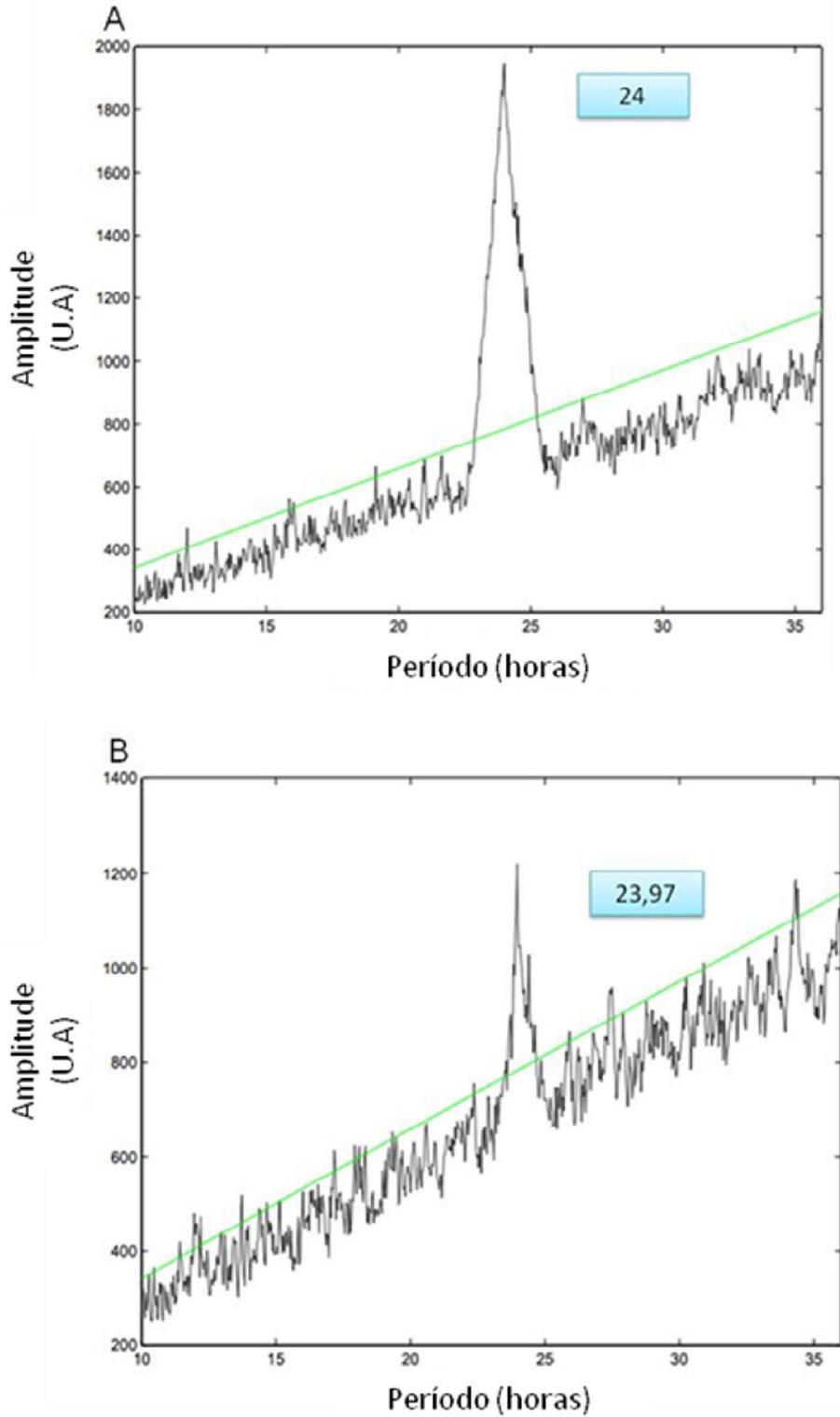


Figura 13: Valores de amplitude da atividade locomotora considerando períodos de 10 a 36 horas do animal do grupo veículo (painel A) e do animal tratado com RTX (painel B). Retângulo azul indica o valor de TAU.

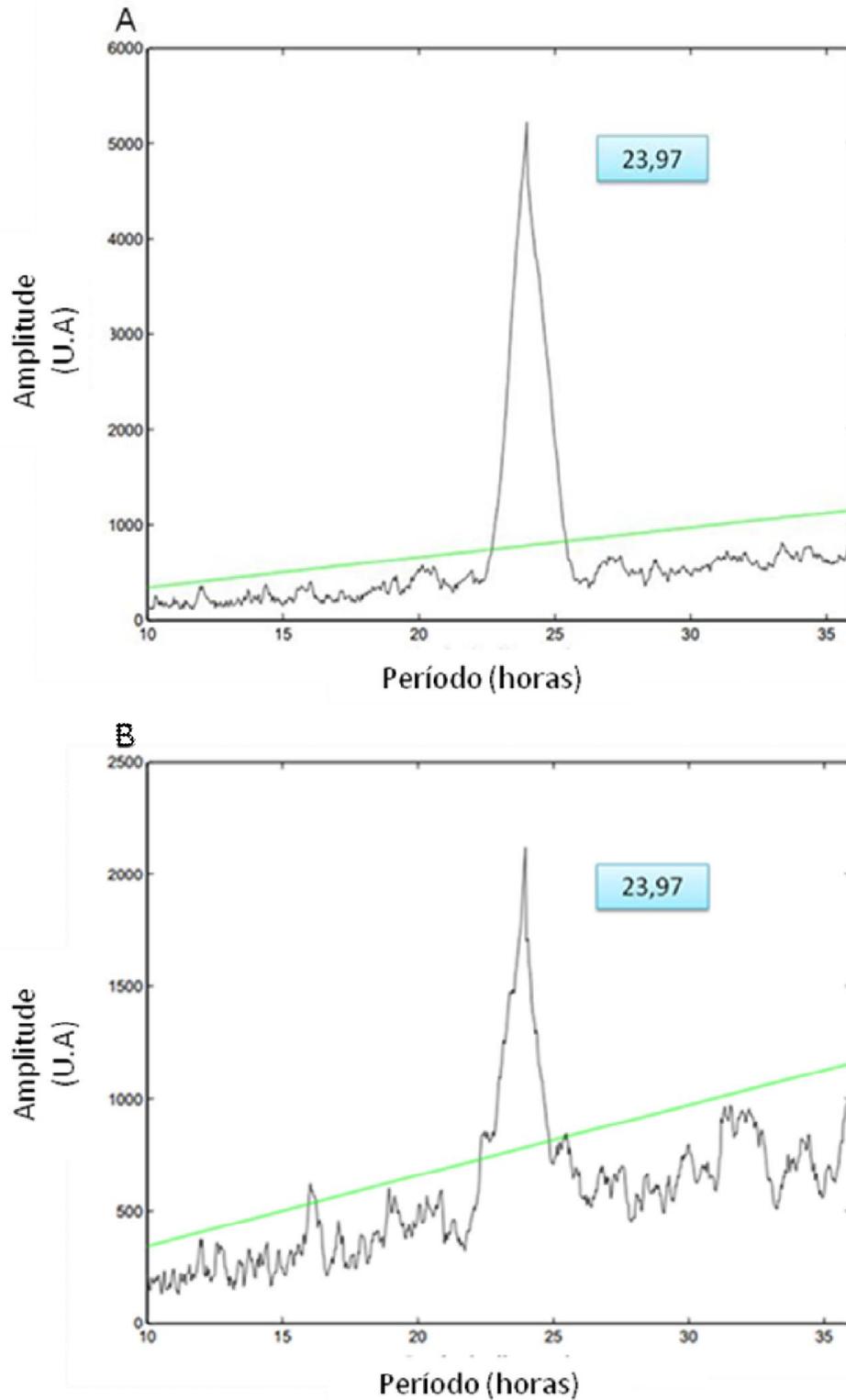


Figura 14: Valores de amplitude da temperatura interna considerando períodos de 10 a 36 horas do animal do grupo veículo (painel A) e do animal tratado com RTX (painel B). Retângulo azul indica o valor de TAU.

Os registros de T_{interna} mostraram um perfil circadiano em ambos os grupos, embora, após 1, 2, 3 e 4 dias da dessensibilização, valores maiores foram encontrados tanto na fase clara quanto na fase escura ($p < 0,001$, Figura 15 e 16). Após este período, os animais dessensibilizados voltaram a ter valores de T_{interna} próximos dos animais do grupo veículo (figura 15). Como já esperado, logo após a dessensibilização, os animais exibiram uma hipotermia. A tabela 3 – ANEXO, expõe os valores de p para os horários e dias que houveram diferenças observadas entre os dois grupos.

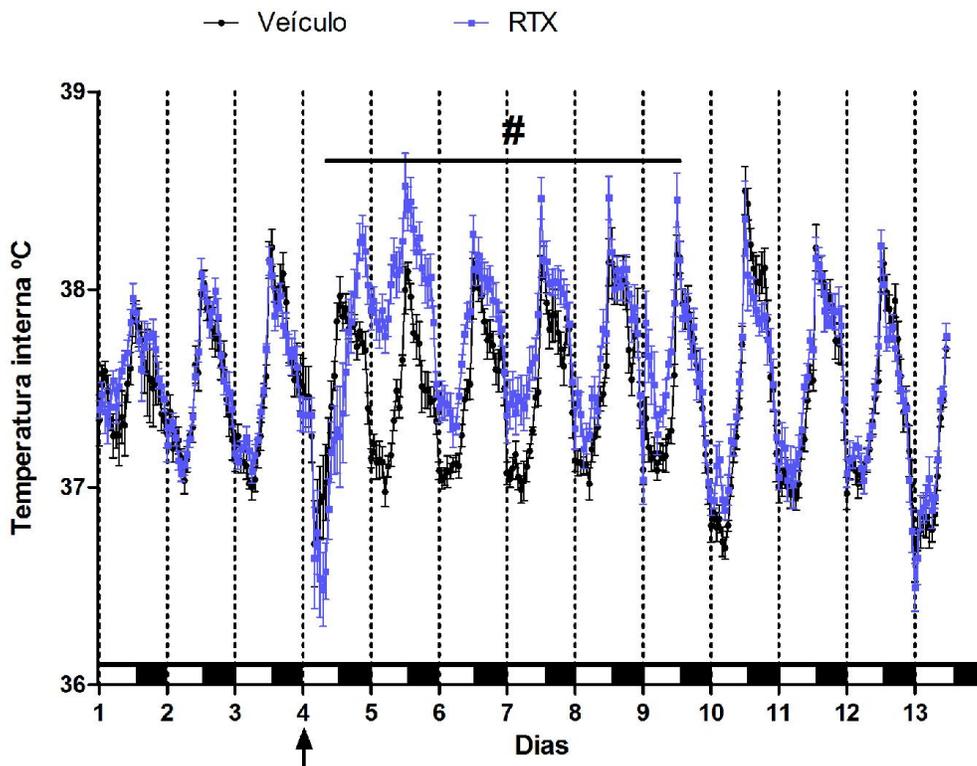


Figura 15: Variação da T_{interna} nos animais do grupo veículo (linha preta) e do grupo tratado (RTX, linha azul). Dia 1, os animais são colocados na placa para registro de T_{interna} e ALE. Dia 4, os animais são infundidos com veículo ou RTX. Retângulos brancos representam a fase em que as luzes estão acesas e, os pretos representam a fase em que as luzes estão apagadas. Dados expressos por média \pm EPM. A barra com sustenido representa o período em que observou diferenças significativas de pelo menos $p < 0,05$, pelo teste *two-way* Anova, seguido de *Tukey*, entre os animais tratados versus veículo. Os valores de p estão apresentados na tabela 3 - ANEXO. Número de animais estudados (n) = 10 e 12, respectivamente, nos grupos veículo e RTX.

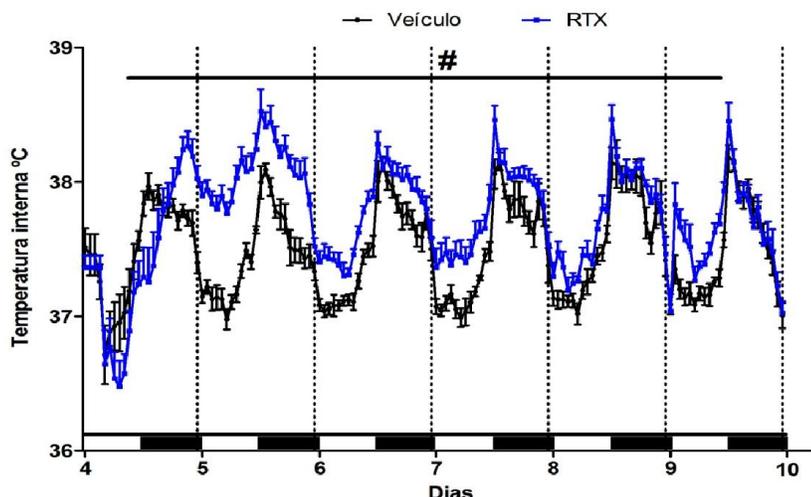


Figura 16: Variação da T_{interna} nos animais do grupo veículo e do grupo tratado (RTX), entre os dias 4 e 10. A barra com sustenido representa o período em que observou diferenças significativas de pelo menos $p < 0,05$, pelo teste *two-way* Anova, seguido de *Tukey*, entre os animais tratados versus veículo. Número de animais estudados ($n = 10$ e 12 , respectivamente, nos grupos veículo e RTX).

No fígado, nos animais do grupo veículo, os níveis de RNAm de *rPer1* e *rBmal1* variaram de forma circadiana com acrofase, respectivamente, no ZT 12 ($n = 5$, $p < 0,01$) e ZT0 ($n = 4$, $p < 0,01$). A dessensibilização aboliu este perfil para o gene *rPer1* ($n = 5$, $p < 0,01$). Por outro lado, o mesmo não ocorreu para o gene *rBmal1*, no qual o valor de pico de expressão foi maior ($n = 4$, $p < 0,001$) nos animais tratados com RTX (Figura 17 A e B).

Na adrenal do grupo veículo, a expressão dos genes *rPer1* e *rBmal1* apresentou variações circadianas, com acrofase, respectivamente, na fase clara do ciclo circadiano ($n = 5$, $p < 0,05$) e no ZT 0 ($n = 4$, $p < 0,05$; Figura 17 C e D). O tratamento com RTX reduziu os valores de pico de expressão de *rPer1* ($p < 0,001$) e *rBmal1* ($p < 0,05$), abolindo a expressão rítmica de ambos (Figura 17 C e D).

No NSQ, os animais do grupo veículo, os níveis de RNAm de *rPer1* ($n = 4$) e *rBmal1* ($n = 4$), dos animais do grupo veículo, mostraram em anti-fase com

variações sutis ao longo do tempo (Figura 17 E e F). A dessensibilização aumentou os níveis de RNAm de *rBmal1* somente no ZT0 (n = 4, p <0,001) , sem alterar os níveis de *rPer1* (n = 4).

A dessensibilização também afetou os níveis de RNAm de *rTRPV1*. No fígado, o perfil de expressão do gene *rTRPV1* apresentou variações temporais com valores maiores no ZT12 quando comparado com o ZT18 dos animais do grupo veículo (n = 4, p = 0,014). Entretanto, ao contrário do grupo controle, nos animais tratados, valores maiores foram observados no ZT0, quando comparados com o ZT12 e 18 (n = 4, p = 0,007). Apesar do tratamento com RTX afetar a expressão de *rTRPV1* ($F_{(3,20)} = 6,02$, p = 0,0043), não houve diferença entre os grupos quando analisados a cada tempo (Figura 18 A).

Diferente do que ocorreu no fígado, na adrenal, a expressão de *rTRPV1* não variou nos diferentes horários analisados em ambos os grupos. Porém, a dessensibilização aumentou os níveis de RNAm de *rTRPV1* no ZT 6 (n = 4, p < 0,05, Figura 18 B).

No NSQ, a expressão de *rTRPV1* não variou temporalmente no grupo veículo (n = 4) e nos animais dessensibilizados foram observados valores aumentados no ZT0 quando comparados aos ZT12 e 18 (n = 4, p <0,05, Figura 18 C). Há um efeito do tratamento sobre este gene ($F_{(3,20)} = 4,14$, p = 0,019).

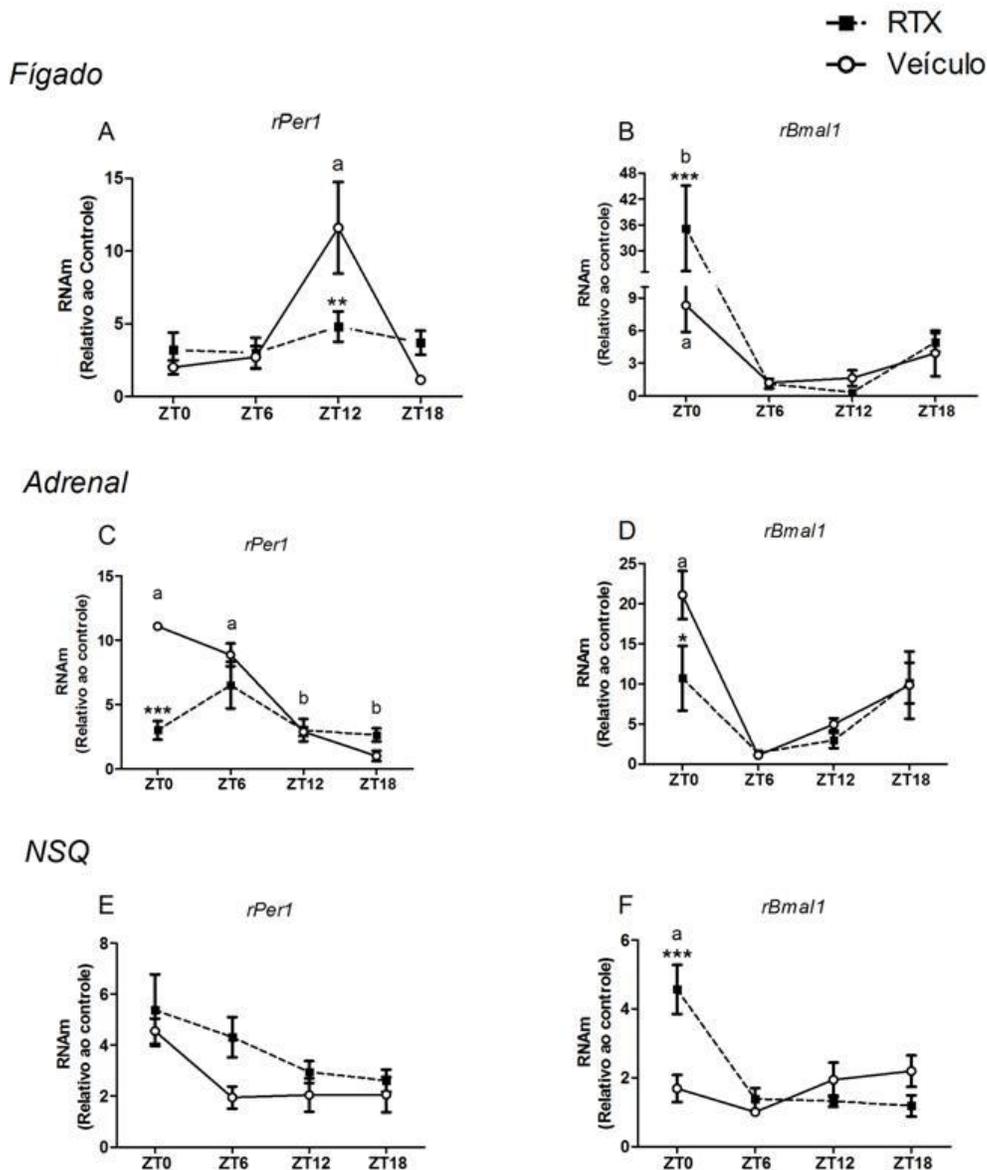
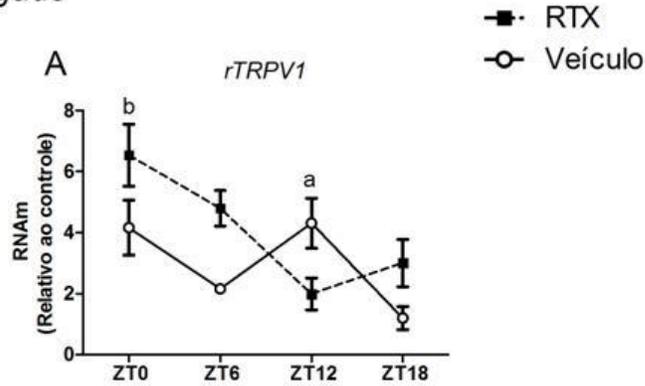
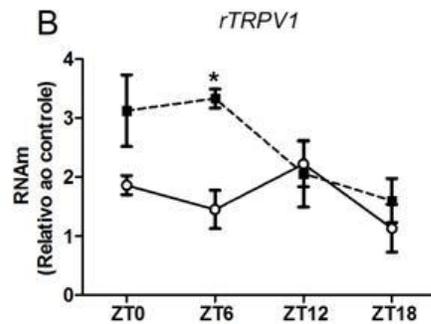


Figura 17: Efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 sobre a expressão de RNAm de *rPer1* e *rBmal1* do fígado (painel A e B), da adrenal (painel C e D) e do NSQ (painel E e F). Os dados estão expressos como média \pm EPM. *, $p < 0,05$ versus veículo; **, $p < 0,01$ versus veículo; ***, $p < 0,001$ versus veículo pelo teste *two-way* Anova, seguido de *Bonferroni*. No painel A, no grupo veículo, **a**, $p < 0,01$ versus demais ZT analisados. No painel B, no grupo veículo, **a**, $p < 0,05$ e no grupo RTX, **b**, $p < 0,01$ versus demais ZT analisados. No painel C, no grupo veículo, **a**, $p < 0,001$ versus ZT12 e ZT18. No painel D, no grupo controle, **a**, $p < 0,05$ versus demais ZT analisados. No painel F, no grupo tratado, **a**, $p < 0,01$ versus demais ZT analisados. Analisados pelo teste *one-way* Anova, seguido do teste de *Bonferroni*. Foram analisados pelo menos 3 animais por ZT em cada grupo.

Fígado



Adrenal



NSQ

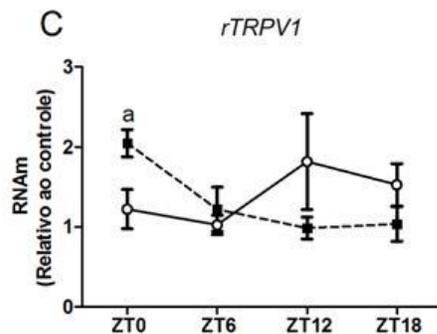


Figura 18: Efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 sobre a expressão de RNAm dos canais TRPV1 do fígado (painel A), da adrenal (painel B) e do NSQ (painel C). Os dados estão expressos como média \pm EPM. *, $p < 0,05$ versus veículo, pelo teste *two-way* Anova, seguido do teste de Bonferroni. No painel A, no grupo veículo, **a**, $p < 0,05$ versus ZT18; no grupo RTX, **b**, $p < 0,05$ versus ZT12 e ZT18. No painel C, no grupo RTX, **a**, $p < 0,05$ versus ZT 12 e ZT18. Analisados pelo teste *one-way* Anova, seguido do teste de *Bonferroni*. Foram analisados pelo menos 3 animais por ZT em cada grupo.

6 DISCUSSÃO

A coerência de fase na expressão dos genes de relógio é essencial para a sincronização do relógio biológico (OKAMURA, 2007). O presente trabalho estabelece, pela primeira vez, que os canais TRPV1 são fundamentais para esta sincronização, em ratos adultos. Esta afirmação está baseada no fato que bloqueio ou a dessensibilização dos canais TRPV1 alteram a expressão de RNAm de dois fatores importantes da maquinaria molecular do relógio, o *rBmal1*, componente da alça positiva, e o *rPer1*, componente da alça negativa (ALBRECHT, 2012), tanto em tecidos periféricos e quanto no NSQ.

Na adrenal, a dessensibilização aboliu o perfil rítmico de expressão de *rPer1* e *rBmal1*, e o bloqueio do canal aumentou a expressão de *rPer1* neste tecido. Procuramos analisar o papel desta perturbação sobre a liberação de corticosterona, este hormônio foi mensurado após o bloqueio dos canais TRPV1. Levando em consideração que o relógio central controla a liberação dos glicocorticóides via modulação da liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelos neurônios do núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN), e, por uma via multi-sináptica do NSQ para a glândula adrenal. Essa rota parece ser fundamental para garantir a sensibilidade da adrenal ao ACTH, por um mecanismo ainda não totalmente elucidado (JASPER e ENGELAND, 1997; KALSBECK et al., 2012). Além dessa regulação neural, propõe-se que um relógio local circadiano possa regular a síntese e/ou liberação de glicocorticóide. Evidências para isto vêm de estudos que demonstraram que a liberação circadiana de corticosterona é abolida em camundongos duplo nocautes para *Per2/Cry1*, mas a liberação de ACTH é mantida. Além disso, transplantes de adrenal de camundongos selvagem para estes nocautes

restauram a liberação circadiana de corticosterona, no entanto, a recíproca não é verdadeira (OSTER et al., 2006). Os resultados mostraram que o bloqueio dos canais TRPV1 afetou de forma aguda a liberação deste hormônio, corroborando a importância do relógio local sobre a secreção de corticosterona.

No fígado, o perfil rítmico da expressão de *rPer1* foi abolido após a dessensibilização dos canais TRPV1 induzida pela infusão de RTX e o perfil de *rBmal1* manteve-se, embora com um valor de pico (acrofase) aumentado. Já o bloqueio dos canais com o antagonista (AMG-517) não alterou a expressão de *rPer1* e aumentou os níveis de *rBmal1*. Futuros experimentos são necessários para averiguar se houve um comprometimento da função hepática, uma vez que o funcionamento da maquinaria molecular do relógio hepático tem sido proposto como fundamental para o metabolismo de carboidratos. Processos hepáticos que regulam a disponibilidade de glicose, tais como a gliconeogênese e a glicogenólise apresentam ritmos diários (KIDA et al., 1980; ROESLER et al., 1985; ROESLER e KHANDELWAL, 1985). Além disso, dois importantes hormônios para o metabolismo da glicose, a insulina e o glucagon, também apresentam oscilações rítmicas e afetam o metabolismo hepático (YAMAMOTO; NAGAI; NAKAGAWA, 1987; RUITER et al., 2003).

A ativação do canal TRPV1 gera um influxo de cálcio em neurônios sensoriais nociceptivos, resultando em uma despolarização da membrana, a ativação prolongada ou repetida, no entanto, resulta na dessensibilização do canal. O RTX é derivado da planta do gênero *Euphorbia*, sendo um análogo ultrapotente da capsaïcina (CALIXTO et al., 2005; CATERINA, 2007). A infusão deste agonista causa a dessensibilização do canal, termo utilizado para

descrever um estado de insensibilidade neuronal a estímulos exógenos e endógenos (ROMANOVSKY et al., 2009).

Os efeitos do RTX sobre o ritmo de expressão dos genes do relógio podem ser explicados pela falta de um sensor térmico no órgão. Neste trabalho observamos que ambos os tecidos analisados, fígado e adrenal, expressam o canal TRPV1. Sendo assim, nossos dados foram de acordo com a literatura, que mostra que este canal está expresso no fígado de diversas espécies (VENNEKENS; OWSIANIK; NILIUS, 2008), no entanto não encontramos dados sobre a expressão deste canal na adrenal. Uma das formas de ativação deste canal é o calor (NILIUS et al., 2007), assim ele poderia sinalizar as variações circadianas de temperatura, as quais, por sua vez, seriam determinantes para a manutenção do ritmo circadiano de expressão gênica. Por outro lado, foi demonstrado que a ativação dos canais TRPV1, *in vitro*, ocorre a temperaturas acima de 43 °C. Entretanto, na presença de fatores endógenos tais como prostaglandinas e anandamida, esse canal pode ser ativado por temperaturas bem inferiores a 43 °C, podendo apresentar-se tonicamente ativo (CATERINA, 2007; GAVVA et al., 2007b).

Evidências recentes sugerem que o efeito da temperatura na maquinaria molecular do relógio é regulado pela via de sinalização das proteínas do choque térmico. O bloqueio do fator de choque térmico 1 (do inglês *HeatShockFactor 1*, HSF) inibe a mudança de fase gerada por pulso de temperatura em cultura de células de hipófise e intestino. A temperatura iria então, atuar nos relógios periféricos mediante a transcrição de HSF1 intracelulares (BUHR; YOO; TAKAHASHI, 2010). A capsaicina e o RTX aumentam os níveis da proteína de choque térmico 70 (*HeatShockProtein*,

Hsp70) pela ativação de HSF1, já os antagonistas como capsazepina e AMG-9810, assim como o silenciamento gênico do TRPV1 via siRNA, diminui a acumulação dessas proteínas de choque térmico, sugerindo que, em células de mamíferos, o sensor de calor e a sinalização de estresse celular são dependentes dos canais TRPV1 (BROMBERG et al., 2013). Estes canais agiriam como componente central na via termossensorial celular e assim, tendo papel decisivo na sinalização da temperatura para os relógios biológicos.

Exposição de camundongos a um pulso de luz no período noturno leva a um aumento de GMPc, ativação da proteína quinase G, aumento de NO e ativação da quinase dependente de cálcio/ calmodulina II (CAMK II); esta via resulta em aumento da transcrição de *Per1* em neurônios do NSQ (DING et al., 1994; WATANABE et al., 1995; MELO; GOLOMBEK; RALPH, 1997; OBRIETAN et al., 1999; GOLOMBEK e ROSENSTEIN, 2010). Sabe-se que a fosforilação do canal TRPV1 pelas proteínas quinases C e A (PKA e PKC) e pela CAMKII leva a um aumento da sensibilidade do canal a seus agentes estimuladores (MOHAPATRA e NAU, 2005) e, ao contrário, a calcineurina promove a desfosforilação do canal, inativando-o (BINGHAM et al., 2009). No pico circadiano de temperatura ($38,2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,07$), o calor ativaria o canal, promovendo a entrada de cálcio e ativação da CAMKII, esta, por sua vez, alteraria a expressão de *Per1*, além de aumentar a sensibilidade do canal, por promover a sua fosforilação, mantendo o canal ativo durante toda a fase de escuridão.

Há evidências de que o canal TRPV1 sinalize toda a fase de aumento circadiano de temperatura e não variações abruptas de temperatura do organismo. Investigamos o efeito da exposição dos animais a ambiente quente

(34 °C), o que resulta num aumento de temperatura interna de cerca de 0,6 °C. Esta exposição foi realizada no nadir do ritmo circadiano de temperatura e esta manipulação não alterou a expressão dos genes de relógio nos tecidos analisados. Estes resultados corroboram o fato de que as alterações observadas nos genes de relógio, induzidas pelo bloqueio do canal TRPV1 e pela dessensibilização, não seriam devidas ao aumento da temperatura e sim, pela falta de atividade do canal, que estaria funcionando como um sensor do *status* térmico interno para os órgãos.

De forma interessante, o tratamento com o antagonista somente afetou a expressão dos genes de relógio, quando horário de pico era próximo do horário de infusão do antagonista (ZT0). O pico de expressão de *rPer1*, no fígado, ocorre no ZT12 e o antagonista não alterou a expressão deste gene, por outro lado o pico de *rBmal1* ocorre no ZT0, sendo que diferente do *rPer1*, o antagonista aumentou a expressão deste gene. Já na adrenal, este padrão foi observado somente para o gene *rPer1*, o qual mostrou valores de pico entre os ZT0 e 6 e, o antagonista aumentou a expressão deste gene. Não podemos fazer estas análises para a expressão no NSQ, uma vez que não foram detectadas alterações temporais no grupo controle, o que discutiremos a seguir. O arraste da maquinaria molecular tem sido atribuído a efeitos do ZT sobre a expressão do *Per1* e *Per2* e não de *Bmal1* (GOLOMBEK e ROSENSTEIN, 2010). Além disso, o efeito do ZT parece depender do momento em que é apresentado ao oscilador. Por exemplo, estimulação fóptica a fibroblastos modificados geneticamente para perceber a luz, aumenta a amplitude do ritmo quando apresentado no pico do gene *Per2* e não leva a mudança de fase, e se, apresentada no nadir da expressão pode levar a

mudança de fase e redução na amplitude do ritmo (PULIVARTHY et al., 2007). A análise em conjunto dos dados obtidos de expressão gênica após infusão do antagonista e RTX sugerem um efeito de arraste de fase na adrenal e redução da amplitude no fígado.

Experimentos *in vitro* mostram que, ao contrário do que é visto em relógios centrais, que não são sensíveis a temperatura (BUHR; YOO; TAKAHASHI, 2010), os ciclos de temperatura externa podem manter a expressão rítmica de genes de relógio em fibroblastos de ratos (células Rat-1) e em culturas primárias de células gliais, assim como em relógios periféricos no animal inteiro (RALPH e MENAKER, 1988; BALSALOBRE; MARCACCI; SCHIBLER, 2000).

Surpreendentemente, foi observado uma diminuição dos níveis *rPer1* no NSQ dos animais tratados com o antagonista para TRPV1, AMG-517, e um aumento de *rBmal1* no ZT0 nos animais tratados com RTX. Esses resultados se contrapõem com a proposta corrente do funcionamento da maquinaria molecular do relógio (concentrações altas dos fatores da alça negativa repercutem em baixas concentrações dos fatores da alça positiva e vice-versa), o que enfraquece a idéia de termos alterado um ZT de relevância para estes neurônios. De fato, tem sido proposto que este núcleo é resistente às variações da temperatura. Assim, estas alterações poderiam ser atribuídas a outros fatores. Uma ação direta do AMG-517 deveria ser considerada, uma vez que esta droga ultrapassa a barreira hemato-encefálica, porém os resultados obtidos após a dessensibilização abdominal descartam esta possibilidade.

Alternativamente, fatores secundários à ação destas drogas podem explicar o efeito delas sobre a expressão gênica no NSQ. Observamos

diminuição das concentrações de corticosterona induzido pelo AMG-517. E já foi reportado que os glicocorticóides atuam como um sinal de retroalimentação para o oscilador central (PEZUK et al., 2012). Este sinal de retroalimentação pode ser direto, uma vez que o NSQ expressa receptores de glicocorticóides (ROSENFELD et al., 1988), ou por uma ação indireta deste hormônio sobre outros substratos neuronais, os quais sinalizariam para o relógio central. Por exemplo, os glicocorticóides são responsáveis pela variação circadiana da enzima chave da produção de serotonina, a triptofano-hidroxilase, nos neurônios do núcleo da rafe e há projeções deste núcleo para o NSQ, sendo que projeções parecem estar envolvidas com o arraste do relógio central pela luz (MEYER-BERNSTEIN e MORIN, 1999; SAGE et al., 2004). Porém apenas com os dados do tratamento agudo, não é possível esclarecer se este hormônio estaria atuando como um agente sincronizador, uma vez que não foi acompanhado o perfil temporal de expressão gênica e hormonal após o tratamento com AMG-517. Além disso, não foi analisado o perfil hormonal dos animais dessensibilizados.

Ao contrário do encontrado na literatura, o perfil de expressão dos genes do relógio no NSQ não alterou nos diferentes tempos analisados nos animais controles, (HARBOUR et al., 2013). Esta divergência poderia ser atribuída a questões técnicas. A dosagem do RNAm foi realizada em microdissecções do NSQ, as quais podem não ter sido específicas para este núcleo, assim, numa região maior que abrangeu outras áreas além do NSQ. O ritmo circadiano de expressão dos genes de relógio tem sido descrito ser diferente em cada célula que compõem um tecido, e que a sincronia de fase dos ritmos é o que garante a fase resultante de um determinado tecido (OKAMURA; YAMAGUCHI;

YAGITA, 2002). Cada núcleo do sistema nervoso central apresenta ritmos circadianos com fases diferentes (HARBOUR et al., 2014), o que poderia ter levado a observação de uma resultante nula quando analisamos uma região hipotalâmica abrangente maior do que apenas o núcleo.

Há evidências da presença do canal TRPV1 em diversas regiões cerebrais, incluindo núcleos hipotalâmicos (MILLS et al., 2008; VENNEKENS; OWSIANIK; NILIUS, 2008). Em consonância com essas informações, o presente estudo acrescenta a expressão desses canais no NSQ do hipotálamo.

De forma surpreendente, foi encontrado neste trabalho um aumento na expressão do canal TRPV1 na adrenal com o tratamento com AMG-517 e RTX. Este resultado pode ter sido gerado como um mecanismo de defesa do organismo, devido ao bloqueio dos canais. Anh e colaboradores (2014) observaram que a expressão dos canais TRPV1, em células de câncer cervical imortalizadas (HeLa), foram reduzidos com o aumento dos níveis de cortisol. Sendo assim, o aumento da expressão de TRPV1 na adrenal dos animais tratados com AMG-517 pode ter ocorrido em resposta à redução dos níveis de corticosterona. Outro dado interessante, é que células de câncer de próstata aumentam a expressão de TRPV1 após o tratamento com capsaicina ou calor, sendo que este aumento poderia estar associado com o aumento de Hsp70 (BROMBERG et al., 2013). Neste trabalho não avaliamos a expressão de chaperonas, mas estas proteínas poderiam ser um caminho para explicar o aumento que observamos na expressão de TRPV1 e as alterações dos genes de relógio.

Em consonância com os dados da literatura, a infusão do antagonista acarretou em um aumento da temperatura interna (GAVVA, 2008). Steiner e

colaboradores (2007) analisaram outro potente antagonista para os canais TRPV1 (AMG-0347). Ao infundir este antagonista observou uma hipertermia nos animais, gerando um aumento na vasoconstrição e na termogênese. Além disso, quando animais nocautes homocigotos (TRPV1^{-/-}) eram submetidos ao mesmo tratamento, não respondiam ao antagonista com hipertermia. Nossos achados somados aos da literatura apontam para a participação destes canais na manutenção da temperatura corporal interna, de tal maneira que sua disfunção leva a um desajuste nos mecanismos termoregulatórios. Quando a capsaicina ativa o TRPV1 ocorre perda de calor (vasodilatação e transpiração) resultando em uma hipotermia, além de efeitos cardiovasculares como taquicardia. Em seguida ocorre uma ativação da produção de calor como resultado da estimulação da secreção de catecolaminas pela adrenal. Estas repostas autonômicas devem-se a ativação do TRPV1 de gânglios da raiz dorsal que comunica as alterações periféricas para o sistema nervoso central, gerando dor ou repostas termoregulatórias(CATERINA, 2007).

Existem duas hipóteses para o mecanismo dos efeitos termoregulatórios do TRPV1, a primeira hipótese seria que a ativação dos canais TRPV1, nos terminais periféricos das fibras sensível a calor cutâneas ou viscerais, cujos corpos celulares estão nos gânglios da raiz dorsal, gerando a estimulação dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal. Estes neurônios enviam aferências diretas, pelo trato espino-talâmico, para o tálamo, e indiretas para a área pré-ótica, via colaterais que fazem sinapses na ponte. Esta via indireta ativa neurônios sensível ao calor e/ou inibe neurônios sensível ao frio. A outra hipótese seria pela ativação dos TRPV1 nos terminais pré-sinápticos das fibras colaterais pontinas, ou mesmo de outras aferências que liberam

neurotransmissores excitatórios (glutamato) e inibitórios (GABA) que exercerão seus efeitos sobre os neurônios sensíveis ao calor ou ao frio, respectivamente, na área pré-óptica. Ocorrendo assim, um reflexo de perda de calor, por redução do fluxo simpático vasoconstritor para pele e para a cauda, além de gerar respostas comportamentais que levam a perda de calor. Embora ainda não de forma conclusiva, dados apontam para um envolvimento dos canais TRPV1 em neurônios da área pré-óptica nas respostas termorregulatórias (CATERINA, 2007; MILLS et al., 2008).

Assim, os mecanismos termoregulatórios poderiam estar comprometidos, desencadeando alterações no padrão circadiano de temperatura interna, o que gerou a arritmicidade na expressão dos genes do relógio. De fato, a dessensibilização dos canais TRPV1 levou uma diminuição da amplitude da variação circadiana de temperatura e um aumento da T_{interna} tanto na fase escura, quanto na fase clara nos 5 dias após a dessensibilização. Estes resultados corroboram os obtidos pelo tratamento com capsaicina ou RTX, no qual logo após a dessensibilização há uma hipotermia seguida de uma hipertermia, que perdura por alguns dias (JANCSO-GABOR; SZOLCSANYI; JANCSO, 1970; WOODS et al., 1994). Esta hipertermia independente da fase do ciclo circadiano vão de encontro com outros dados da literatura. Entretanto em ratos neonatos tratados com capsaicina, há uma inversão do ciclo de temperatura, isto é, observa-se um perfil circadiano de temperatura diferente, no qual a T_{interna} é maior na fase clara quando comparado com a fase escura (MILLS et al., 2008; JEONG e SEONG, 2014).

Após a dessensibilização dos canais TRPV1, não houve alterações no período dos ritmos circadianos avaliados, mantendo-se em 24 horas. Este

resultado foi semelhante aos de Jeong & Seong (2014) avaliando ratos neonatos dessensibilizados. No entanto, observamos um avanço no *onset* da atividade locomotora e uma diminuição da amplitude dos ritmos de temperatura e ALE. O período, o *onset*, *offset* e a acrofase compõem os parâmetros da oscilação rítmica, alterações em qualquer um deles traduzem em mudanças no ritmo circadiano do organismo. Dentre eles, o período é o parâmetro mais resistente a variações externas e internas, exposições de camundongos noturnos a temperaturas constantes de 4 °C por 16 dias leva a completa mudança do *onset* e *offset*, invertendo o padrão de atividade do animal para diurno, sem alterar o período (VAN DER VINNE et al., 2014).

Levando-se em consideração que a dose de RTX utilizada no presente estudo dessensibilizar apenas os canais TRPV1 periféricos (DOGAN et al., 2004; STEINER et al., 2007), aventamos a possibilidade de que a disfunção dos canais TRPV1 localizados no gânglio da raiz dorsal seriam os responsáveis pelas alterações autonômicas que geraram o desbalanço termorregulatório, afetando as variações circadianas de temperatura. Sabendo-se que a área pré-óptica participa do controle da temperatura circadiana (SATINOFF, 1983), provavelmente a via envolvida com as alterações de temperatura observada seria originada nas fibras contralaterais espinhais que inervam a área pré-óptica. Esta hipótese pode ser corroborada pelo fato de que a infusão do antagonista i.c.v. não acarreta em alterações da temperatura interna, e que a infusão de antagonista em animais com dessensibilização abdominal também não desencadeia uma hipertermia (STEINER et al., 2007).

O bloqueio e a dessensibilização dos canais TRPV1 alteram a expressão dos genes de relógio. Esta alteração foi observada em tecidos

periféricos e no NSQ, isto pode ter sido a causa das mudanças observadas nos ritmos circadianos de temperatura, atividade locomotora e liberação de corticosterona.

A ativação do canal pode ser diversos estímulos como temperatura, pH e ligantes endógenos e exógenos (GAVVA et al., 2008). O AMG-517 e o RTX não discriminam estes modos de ativação, portanto, não podemos afirmar qual estímulo TRPV1 sinaliza para os relógios biológicos. Embora, observamos alterações na variação circadiana da temperatura interna e em sua amplitude, sendo um indicativo que seria o estímulo chave para este canal na sincronização do relógio biológico.

7 CONCLUSÃO

A falta ou o bloqueio dos canais TRPV1 geram uma alteração no ritmo circadiano de temperatura interna, na expressão dos genes de relógio e nas concentrações de corticosterona. Assim, estes canais têm um importante papel na sinalização da temperatura aos relógios periféricos, participando da sincronização do relógio biológico endógeno.

Na figura abaixo (Figura 19) ilustramos os principais achados deste trabalho no que refere-se a função dos canais TRPV1 na expressão dos genes *Per1* e *Bmal1* no fígado e na adrenal.

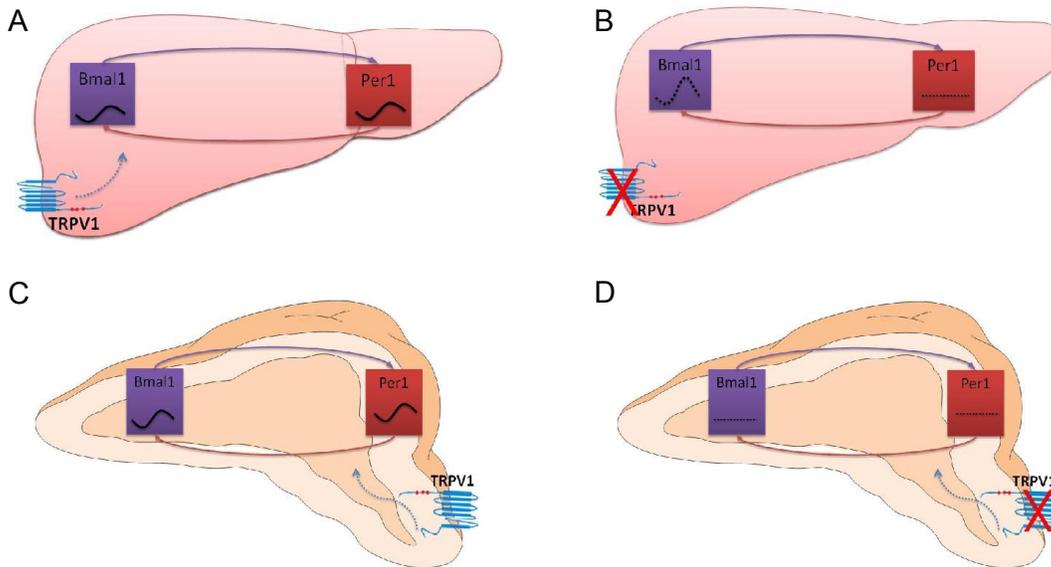


Figura 19: Ilustração da participação dos canais TRPV1 na sincronização dos relógios periféricos. Em A e C, os canais estão funcionais e os genes estão apresentando variação circadiana e em anti-fase, ou seja, com a elevação do *Per1* ocorre redução da expressão de *Bmal1*, no fígado e na adrenal, respectivamente. Em B e D, a disfunção dos canais TRPV1 promovida pela dessensibilização induzida pelo tratamento com a resiniferatoxina, leva ao aumento da amplitude de expressão de *Bmal1* e perda de ritmicidade de *Per1* no fígado, enquanto que na adrenal, a expressão de ambos os genes apresentam-se arritmicas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, S. M.; ATTARIAN, H.; ZEE, P. C. Sleep disorders in perinatal women. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 28, n. 1, p. 159-168, 2014.

ABRAHAM, U., *et al.* Coupling governs entrainment range of circadian clocks. **Mol Syst Biol**, v. 6, n., p. 438, 2010.

AHERN, G. P. Transient receptor potential channels and energy homeostasis. **Trends Endocrinol Metab**, v. 24, n. 11, p. 554-560, 2013.

AHN, S., *et al.* Transient receptor potential cation channel V1 (TRPV1) is degraded by starvation- and glucocorticoid-mediated autophagy. **Mol Cells**, v. 37, n. 3, p. 257-263, 2014.

ALBRECHT, U.; EICHELE, G. The mammalian circadian clock. **Curr.Opin.Genet.Dev.**, v. 13, n. 3, p. 271-277, 2003.

ALBRECHT, U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. **Neuron**, v. 74, n. 2, p. 246-260, 2012.

AMARAL, F. G., *et al.* Environmental control of biological rhythms: effects on development, fertility and metabolism. **J Neuroendocrinol**, v. 26, n. 9, p. 603-612, 2014.

BALSALOBRE, A.; DAMIOLA, F.; SCHIBLER, U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. **Cell**, v. 93, n. 6, p. 929-937, 1998.

BALSALOBRE, A.; MARCACCI, L.; SCHIBLER, U. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. **Curr Biol**, v. 10, n. 20, p. 1291-1294, 2000.

BARRETT, R. K.; TAKAHASHI, J. S. Temperature compensation and temperature entrainment of the chick pineal cell circadian clock. **J Neurosci**, v. 15, n. 8, p. 5681-5692, 1995.

BASS, J.; TAKAHASHI, J. S. Circadian integration of metabolism and energetics. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1349-1354, 2010.

BINGHAM, B., *et al.* The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 5, n. 1, p. 28-37, 2009.

BROMBERG, Z., *et al.* The membrane-associated transient receptor potential vanilloid channel is the central heat shock receptor controlling the cellular heat shock response in epithelial cells. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57149, 2013.

BROWN, S. A., *et al.* Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. **Curr Biol**, v. 12, n. 18, p. 1574-1583, 2002.

BUHR, E. D.; YOO, S. H.; TAKAHASHI, J. S. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 379-385, 2010.

CALIXTO, J. B., *et al.* Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol Ther**, v. 106, n. 2, p. 179-208, 2005.

CATERINA, M. J., *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816-824, 1997.

CATERINA, M. J., *et al.* Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, n. 5464, p. 306-313, 2000.

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

DHAKA, A., *et al.* TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. **J Neurosci**, v. 29, n. 1, p. 153-158, 2009.

DING, J. M., *et al.* Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. **Science**, v. 266, n. 5191, p. 1713-1717, 1994.

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

FOSTER, R. G., *et al.* Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). **J Comp Physiol A**, v. 169, n. 1, p. 39-50, 1991.

FOSTER, R. G.; KREITZMAN, L. The rhythms of life: what your body clock means to you! **Exp Physiol**, v. 99, n. 4, p. 599-606, 2014.

GAVVA, N. R., *et al.* Repeated administration of vanilloid receptor TRPV1 antagonists attenuates hyperthermia elicited by TRPV1 blockade. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 323, n. 1, p. 128-137, 2007a.

GAVVA, N. R., *et al.* The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. **J Neurosci**, v. 27, n. 13, p. 3366-3374, 2007b.

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

GAVVA, N. R. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. **Trends Pharmacol Sci**, v. 29, n. 11, p. 550-557, 2008.

GOLOMBEK, D. A.; ROSENSTEIN, R. E. Physiology of circadian entrainment. **Physiol Rev**, v. 90, n. 3, p. 1063-1102, 2010.

HALL, J. C.; ROSBASH, M. Mutations and molecules influencing biological rhythms. **Annu.Rev.Neurosci.**, v. 11, n., p. 373-393, 1988.

HARBOUR, V. L., *et al.* Comprehensive mapping of regional expression of the clock protein PERIOD2 in rat forebrain across the 24-h day. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76391, 2013.

HARBOUR, V. L., *et al.* Phase differences in expression of circadian clock genes in the central nucleus of the amygdala, dentate gyrus, and suprachiasmatic nucleus in the rat. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e103309, 2014.

HARMS, P. G.; OJEDA, S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **J Appl Physiol**, v. 36, n. 3, p. 391-392, 1974.

HASTINGS, M. H. Neuroendocrine rhythms. **Pharmacol Ther**, v. 50, n. 1, p. 35-71, 1991.

HAUS, E. Chronobiology in the endocrine system. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, n. 9-10, p. 985-1014, 2007.

HUANG, W., *et al.* Circadian rhythms, sleep, and metabolism. **J Clin Invest**, v. 121, n. 6, p. 2133-2141, 2011.

JANCSO-GABOR, A.; SZOLCSANYI, J.; JANCSO, N. Irreversible impairment of thermoregulation induced by capsaicin and similar pungent substances in rats and guinea-pigs. **J Physiol**, v. 206, n. 3, p. 495-507, 1970.

JASPER, M. S.; ENGELAND, W. C. Splanchnicotomy increases adrenal sensitivity to ACTH in nonstressed rats. **Am J Physiol**, v. 273, n. 2 Pt 1, p. E363-368, 1997.

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

KALSBECK, A., *et al.* Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Mol Cell Endocrinol**, v. 349, n. 1, p. 20-29, 2012.

KIDA, K., *et al.* The circadian change of gluconeogenesis in the liver in vivo in fed rats. **J Biochem**, v. 88, n. 4, p. 1009-1013, 1980.

KONOPKA, R. J.; BENZER, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 68, n. 9, p. 2112-2116, 1971.

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**, v. 7, n. 6, p. 1626-1638, 1987.

MELO, L.; GOLOMBEK, D. A.; RALPH, M. R. Regulation of circadian photic responses by nitric oxide. **J Biol Rhythms**, v. 12, n. 4, p. 319-326, 1997.

MEYER-BERNSTEIN, E. L., *et al.* Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. **Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 207-218, 1999.

MEYER-BERNSTEIN, E. L.; MORIN, L. P. Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduces light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythm phase shifts. **Neuroscience**, v. 92, n. 1, p. 267-279, 1999.

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

MINKE, B. The history of the *Drosophila* TRP channel: the birth of a new channel superfamily. **J Neurogenet**, v. 24, n. 4, p. 216-233, 2010.

MINKE, B.; PETERS, M. Cell biology. Rhodopsin as thermosensor? **Science**, v. 331, n. 6022, p. 1272-1273, 2011.

MOHAPATRA, D. P.; NAU, C. Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. **J Biol Chem**, v. 280, n. 14, p. 13424-13432, 2005.

MOHAWK, J. A.; TAKAHASHI, J. S. Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. **Trends Neurosci**, v. 34, n. 7, p. 349-358, 2011.

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

MONTELL, C. TRP channels in *Drosophila* photoreceptor cells. **J Physiol**, v. 567, n. Pt 1, p. 45-51, 2005.

NILIUS, B., *et al.* Transient receptor potential cation channels in disease. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 165-217, 2007.

OBRIETAN, K., *et al.* Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. **J Biol Chem**, v. 274, n. 25, p. 17748-17756, 1999.

OKAMURA, H.; YAMAGUCHI, S.; YAGITA, K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. **Cell Tissue Res**, v. 309, n. 1, p. 47-56, 2002.

OKAMURA, H. Suprachiasmatic nucleus clock time in the mammalian circadian system. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 72, n., p. 551-556, 2007.

OSTER, H., *et al.* The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. **Cell Metab**, v. 4, n. 2, p. 163-173, 2006.

PALKOVITS, M. Punch sampling biopsy technique. **Methods Enzymol**, v. 103, n., p. 368-376, 1983.

PATAPOUTIAN, A., *et al.* ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 7, p. 529-539, 2003.

PAXINOS, G., WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. New York: Academic Press, 2007

PEDERSEN, S. F.; OWSIANIK, G.; NILIUS, B. TRP channels: an overview. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3-4, p. 233-252, 2005.

PEZUK, P., *et al.* Glucocorticoids as Entraining Signals for Peripheral Circadian Oscillators. **Endocrinology**, v. 153, n. 10, p. 4775-4783, 2012.

PITTENDRIGH, C. S. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. **Annu Rev Physiol**, v. 55, n., p. 16-54, 1993.

POLETINI, M. O., *et al.* A method to study preovulatory surges of gonadotropins. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 12, n. 1, p. 41-48, 2003.

PREITNER, N., *et al.* The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 251-260, 2002.

PROVENCIO, I.; ROLLAG, M. D.; CASTRUCCI, A. M. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. **Nature**, v. 415, n. 6871, p. 493, 2002.

PULIVARTHY, S. R., *et al.* Reciprocity between phase shifts and amplitude changes in the mammalian circadian clock. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 51, p. 20356-20361, 2007.

RALPH, M. R.; MENAKER, M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. **Science**, v. 241, n. 4870, p. 1225-1227, 1988.

RAMSEY, I. S.; DELLING, M.; CLAPHAM, D. E. An introduction to TRP channels. **Annu Rev Physiol**, v. 68, n., p. 619-647, 2006.

RITTER, R. C.; LADENHEIM, E. E. Capsaicin Pretreatment Attenuates Suppression of Food-Intake by Cholecystokinin. **American Journal of Physiology**, v. 248, n. 4, p. R501-R504, 1985.

ROESLER, W. J.; KHANDELWAL, R. L. Diurnal variations in the activities of the glycogen metabolizing enzymes in mouse liver. **Int J Biochem**, v. 17, n. 1, p. 81-85, 1985.

ROESLER, W. J., *et al.* Aberrations in the diurnal rhythms of plasma glucose, plasma insulin, liver glycogen, and hepatic glycogen synthase and phosphorylase activities in genetically diabetic (db/db) mice. **Horm Metab Res**, v. 17, n. 11, p. 572-575, 1985.

ROMANOVSKY, A. A. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 1, p. R37-46, 2007.

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

ROSENFELD, P., *et al.* Ontogeny of the type 2 glucocorticoid receptor in discrete rat brain regions: an immunocytochemical study. **Brain Res**, v. 470, n. 1, p. 119-127, 1988.

RUBY, N. F.; BURNS, D. E.; HELLER, H. C. Circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus are temperature-compensated and phase-shifted by heat pulses in vitro. **J Neurosci**, v. 19, n. 19, p. 8630-8636, 1999.

RUITER, M., *et al.* The daily rhythm in plasma glucagon concentrations in the rat is modulated by the biological clock and by feeding behavior. **Diabetes**, v. 52, n. 7, p. 1709-1715, 2003.

SAGE, D., *et al.* Influence of the corticosterone rhythm on photic entrainment of locomotor activity in rats. **J Biol Rhythms**, v. 19, n. 2, p. 144-156, 2004.

SAINI, C., *et al.* Simulated body temperature rhythms reveal the phase-shifting behavior and plasticity of mammalian circadian oscillators. **Genes Dev**, v. 26, n. 6, p. 567-580, 2012.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada a experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002

SATINOFF, E. Disturbances in Circadian Body-Temperature Rhythms in Rats with Hypothalamic Damage. **Journal of Thermal Biology**, v. 8, n. 1-2, p. 149-157, 1983.

SCHWARTZ, G. J., *et al.* Gut vagal afferent lesions increase meal size but do not block gastric preload-induced feeding suppression. **Am J Physiol**, v. 276, n. 6 Pt 2, p. R1623-1629, 1999.

SHEN, W. L., *et al.* Function of rhodopsin in temperature discrimination in *Drosophila*. **Science**, v. 331, n. 6022, p. 1333-1336, 2011.

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

SOUTH, E. H. Cholecystokinin reduces body temperature in vehicle- but not capsaicin-pretreated rats. **Am J Physiol**, v. 263, n. 6 Pt 2, p. R1215-1221, 1992.

STEINER, A. A., *et al.* Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. **J Neurosci**, v. 27, n. 28, p. 7459-7468, 2007.

STOKKAN, K. A., *et al.* Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. **Science**, v. 291, n. 5503, p. 490-493, 2001.

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

SZIKSZAY, M.; OBAL, F., JR.; OBAL, F. Dose-response relationships in the thermoregulatory effects of capsaicin. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 320, n. 2, p. 97-100, 1982.

TUREK, F. W., *et al.* Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1043-1045, 2005.

VAN DER STELT, M.; DI MARZO, V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. **Eur J Biochem**, v. 271, n. 10, p. 1827-1834, 2004.

VAN DER VINNE, V., *et al.* Cold and hunger induce diurnality in a nocturnal mammal. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 42, p. 15256-15260, 2014.

VAN DIEPEN, H. C.; FOSTER, R. G.; MEIJER, J. H. A Colourful Clock. **PLoS Biol**, v. 13, n. 5, p. e1002160, 2015.

VENNEKENS, R.; OWSIANIK, G.; NILIUS, B. Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 1, p. 18-31, 2008.

VITATERNA, M. H.; TAKAHASHI, J. S.; TUREK, F. W. Overview of circadian rhythms. **Alcohol Res Health**, v. 25, n. 2, p. 85-93, 2001.

WANNER, S. P., *et al.* Aging reverses the role of the transient receptor potential vanilloid-1 channel in systemic inflammation from anti-inflammatory to proinflammatory. **Cell Cycle**, v. 11, n. 2, p. 343-349, 2012.

WATANABE, A., *et al.* Effect of a nitric oxide synthase inhibitor, N-nitro-L-arginine methylester, on light-induced phase delay of circadian rhythm of wheel-running activity in golden hamsters. **Neurosci Lett**, v. 192, n. 1, p. 25-28, 1995.

WHITMORE, D.; FOULKES, N. S.; SASSONE-CORSI, P. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. **Nature**, v. 404, n. 6773, p. 87-91, 2000.

WINTER, J.; BEVAN, S.; CAMPBELL, E. A. Capsaicin and pain mechanisms. **Br J Anaesth**, v. 75, n. 2, p. 157-168, 1995.

WOODS, A. J., *et al.* Thermoregulatory effects of resiniferatoxin in the rat. **Eur J Pharmacol**, v. 264, n. 2, p. 125-133, 1994.

YAGITA, K., *et al.* Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock protein. **EMBO J**, v. 21, n. 6, p. 1301-1314, 2002.

YAMAMOTO, H.; NAGAI, K.; NAKAGAWA, H. Role of SCN in daily rhythms of plasma glucose, FFA, insulin and glucagon. **Chronobiol Int**, v. 4, n. 4, p. 483-491, 1987.

YAMAZAKI, S., *et al.* Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. **Science**, v. 288, n. 5466, p. 682-685, 2000.

YOUNG, M. W.; KAY, S. A. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. **Nat Rev Genet**, v. 2, n. 9, p. 702-715, 2001.

ZYLKA, M. J., *et al.* Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. **Neuron**, v. 20, n. 6, p. 1103-1110, 1998.

9 ANEXOS

Tabela 2: Horário de início de atividade (*onset*). Média por dia dos horários do início da atividade dos animais do grupo veículo e do grupo tratado com RTX.

Dias	<i>Grupo Veículo (hr)</i>	<i>Grupo RTX (hr)</i>
1	15:09:07	18:08:20
2	18:23:20	18:23:55
3	16:30:00	13:56:45
4	17:37:20	06:11:35
5	17:59:07	16:11:10
6	18:32:27	16:12:40
7	18:34:47	17:40:25
8	18:48:13	19:13:50
9	19:05:00	18:40:05
10	18:50:00	16:54:00
11	19:17:13	17:58:55
12	18:41:20	18:30:00

Tabela 3: Valores da média de T_{interna} dos animais do grupo veículo e do grupo tratado com RTX nos horários que ocorreram diferenças significativas tratado versus o veículo pelo teste *two-way* Anova, seguido de *Tukey*.

Dia	Horário	Tinterna Veículo	Tinterna RTX	p	Dia	Horário	Tinterna Veículo	Tinterna RTX	P
4	8:00	36,95	36,48	<0,01	6	1:00	37,08	37,41	<0,05
	9:00	37,03	36,58	<0,001		2:00	37,04	37,45	<0,01
	10:00	37,19	36,89	<0,05		3:00	37,05	37,43	<0,05
	12:00	37,56	37,24	<0,01		4:00	37,08	37,42	<0,05
	13:00	37,84	37,29	<0,01		5:00	37,08	37,38	<0,05
	14:00	37,97	37,26	<0,01		8:00	37,11	37,46	<0,05
	15:00	37,86	37,38	<0,01		9:00	37,26	37,63	<0,05
	16:00	37,90	37,58	<0,05		10:00	37,44	37,77	<0,05
	20:00	37,71	38,07	<0,01		11:00	37,49	37,87	<0,05
	21:00	37,79	38,24	<0,01		12:00	37,52	37,89	<0,05
	22:00	37,73	38,27	<0,001		21:00	37,60	37,94	<0,05
23:00	37,69	38,19	<0,001	7	1:00	37,07	37,36	<0,05	
0:00	37,40	38,03	<0,001		2:00	37,04	37,42	<0,05	
1:00	37,15	37,90	<0,001		3:00	37,10	37,47	<0,05	
2:00	37,22	37,94	<0,001		5:00	37,05	37,46	<0,01	
3:00	37,13	37,84	<0,001		6:00	36,99	37,44	<0,01	
4:00	37,14	37,80	<0,001		7:00	37,03	37,40	<0,05	
5:00	37,13	37,90	<0,001		8:00	37,11	37,46	<0,05	
6:00	36,98	37,76	<0,001		9:00	37,18	37,60	<0,01	
7:00	37,11	37,85	<0,001		10:00	37,29	37,63	<0,05	
8:00	37,16	38,03	<0,001		12:00	37,48	37,88	<0,01	
9:00	37,34	38,16	<0,001		13:00	38,06	38,46	<0,01	
5	10:00	37,49	38,08	<0,001	20:00	37,70	38,01	<0,05	
	11:00	37,40	38,10	<0,001	21:00	37,61	37,98	<0,05	
	12:00	37,64	38,25	<0,001	8	2:00	37,13	37,48	<0,05
	13:00	38,00	38,53	<0,001		11:00	37,47	37,80	<0,05
	14:00	38,09	38,41	<0,05		13:00	38,14	38,46	<0,05
	15:00	37,96	38,45	<0,001	21:00	37,55	37,85	<0,05	
	16:00	37,78	38,31	<0,001	9	2:00	37,35	37,83	<0,01
	17:00	37,76	38,19	<0,01		3:00	37,20	37,66	<0,01
	18:00	37,73	38,26	<0,001		4:00	37,15	37,57	<0,01
	19:00	37,51	38,11	<0,001		5:00	37,17	37,52	<0,05
	20:00	37,49	38,05	<0,001		9:00	37,16	37,47	<0,05
21:00	37,49	38,03	<0,001	10:00		37,26	37,62	<0,05	
22:00	37,43	38,06	<0,001	11:00		37,29	37,69	<0,01	
23:00	37,45	37,83	<0,01	12:00		37,57	37,93	<0,05	