UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

Marcos Rodrigo Jerônimo da Costa

**Efeito do Estresse Térmico no Relógio Biológico de
Danio rerio: um Elo entre Temperatura, Luz, Canais
TermoTRPs e Genes de Relógio**

Thermal Stress Effects on *Danio rerio* Biological Clock: a
Link between Temperature, Light, Thermo-TRP Channels
and Clock Genes

São Paulo

2016

Marcos Rodrigo Jerônimo da Costa

**Efeito do Estresse Térmico no Relógio Biológico de
Danio rerio: um Elo entre Temperatura, Luz, Canais
TermoTRPs e Genes de Relógio**

Thermal Stress Effects on *Danio rerio* Biological Clock: a
Link between Temperature, Light, Thermo-TRP Channels
and Clock Genes

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientador (a): Profa. Dra. Ana Maria de
Lauro Castrucci

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO
DE BIOCÊNCIAS / USP

Costa, Marcos Rodrigo Jerônimo da

Efeito do estresse térmico no relógio biológico de *Danio rerio*: um elo entre temperatura, luz, canais termoTRPs e genes de relógio / Marcos Rodrigo Jerônimo da Costa; orientador Ana Maria de Lauro Castrucci. --. São Paulo, 2016.

92 f.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. *Danio rerio*. 2. Células ZEM-2S. 3. Genes de relógio. 4. Termo TRPs. 5. Proteínas de choque térmico. 6. HSP90. 7. Temperatura. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral. II. Título.

Nome: Costa, Marcos Rodrigo Jerônimo da

Título: Efeito do Estresse Térmico no Relógio Biológico de *Danio rerio*: um Elo entre Temperatura, Luz, Canais TermoTRPs e Genes de Relógio

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profª. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci

Orientadora

Agradecimentos

A meus pais José Jerônimo e Maria Costa pela luta, dedicação e exemplo de vida. Vocês são meu orgulho!

A minha esposa Eliedna que, quando ninguém mais acreditou, depositou toda a sua confiança em mim e mergulhou junto comigo nessa aventura, dando a segurança necessária para que eu pudesse enfrentar todos os desafios. Amor, sem você nada disso seria possível!

A meu irmão Rubens e sua esposa Valcília que me acolheram mais uma vez em seu humilde lar, mostrando o verdadeiro sentido de família.

A minha irmã Catarina e seu esposo Evandro que, mesmo longe, nunca deixaram de me apoiar e reconhecer o meu esforço.

A minha irmãzinha Sabrina, minhas sobrinhas Tiffany e Maria Alice, por sempre renovarem a minhas energias através de um simples sorriso, me fazendo acreditar em um mundo melhor.

À professora Doutora Ana Maria de Lauro Castrucci pela oportunidade de realizar esse trabalho em seu laboratório e por me proporcionar ensinamentos muito além do âmbito científico: ensinamentos de vida.

A todos os colegas e amigos de laboratório Maria Nathália, Leonardo Assis, Bruno, Jennifer, Nathana, Thainá e Márcio. À Maria Nathália deixo aqui o meu mais sincero agradecimento pela paciência e dedicação: Nath, nunca vou esquecer o dia em que “tocou meu ombro” e tornou esse sonho possível!

A meu mestre de graduação Professor Sebastião Pacheco Duque Neto por me fazer acreditar que seria capaz.

Às agências de fomento CNPq, FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro indispensável.

A José e Maria.

Resumo

COSTA, M. R. J. Efeito do Estresse Térmico no Relógio Biológico de *Danio rerio*: um Elo entre Temperatura, Luz, Canais TermoTRPs e Genes de Relógio. 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A adaptação temporal é fundamental para a sobrevivência de espécies que precisam coordenar sua fisiologia e comportamentos ajustando-se a sinais externos. Ritmos biológicos não são simplesmente uma resposta às mudanças de 24 horas no ambiente físico impostas pela rotação da Terra sobre o seu próprio eixo, ao contrário, surgem a partir de um sistema de cronometragem endógeno. No teleósteo *Danio rerio*, ainda não foi identificada a presença de uma região que atue como relógio central; alguns estudos têm evidenciado a existência de células e tecidos que contêm relógios circadianos autônomos, fotossensíveis, comprovando um outro tipo de regulação dos ritmos circadianos onde a percepção do ambiente e o ajuste do período circadiano são efetivados diretamente em nível celular.

As consequências deletérias do aumento da temperatura são impedidas, em certa medida, por uma resposta adaptativa que assegura a sobrevivência celular na presença de calor. Esta via de sobrevivência ativada por calor, conhecida como resposta ao choque térmico, é composta por uma cascata de eventos que conduzem à indução de proteínas de choque térmico (HSPs) que minimizam a lesão celular aguda.

Acredita-se que os sistemas de percepção dos ciclos diários de temperatura e luminosidade sofreram as mesmas pressões seletivas em sua co-evolução, resultando em sua associação. As bases da sensação térmica estão em um grupo de canais altamente conservados, presente em todos os metazoários estudados até o momento e envolvidos

em uma série de modalidades sensoriais, os canais de potencial receptor transiente (TRP); os que respondem a estímulos térmicos foram agrupados em uma subfamília e denominados termoTRPs,

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência do pulso de temperatura (33 °C) na expressão de genes de relógio e de proteínas de choque térmico, bem como o papel do canal TRPV1, em células embrionárias de blástula de *Danio rerio*, denominadas ZEM-2S, submetidas a escuro constante (DD) ou ciclos claro-escuro (LD 12:12).

Através de PCR em tempo real (quantitativo) demonstrou-se que as células ZEM-2S expressam os genes dos seguintes canais TRP: *trpA1a*, *trpA1b*, *trpV1/2*, *trpV4*, *trpC6*, *trpM2*, *trpM4a*, *trpM4b/c* e *trpM5*. Após um pulso de temperatura, observou-se um aumento no transcrito de *hsp90 aa1* em células mantidas tanto em DD como em LD, sendo a expressão de *hsp90 aa1* em LD, no ponto uma hora, duas vezes menor quando comparada a sua expressão no mesmo ponto temporal em DD. O pulso de temperatura não promoveu efeito em nenhum dos genes do relógio estudados (*bmal1a*, *bmal1*, *bmal2*, *cry1a*, *cry1b*, *per1*, *per2*) quando as células foram mantidas em DD. Porém, o transcrito de *per2* aumentou em resposta ao pulso de temperatura quando as células foram sincronizadas pelos ciclos claro-escuro.

A inibição do canal TRPV1 não alterou o efeito induzido pelo pulso de temperatura na expressão do gene *hsp90 aa1* em células ZEM-2S mantidas em DD. Por outro lado, nossos dados permitem afirmar que o mesmo participa parcialmente na indução do aumento da expressão do gene *per2* pelo estímulo térmico em células mantidas em LD, tendo em vista um decaimento significativo na resposta deste gene.

Os dados obtidos neste trabalho abrem uma nova perspectiva sobre a investigação da relação temperatura e genes de relógio, colocando um novo “ator” na regulação deste fenômeno: o canal TRPV1.

Palavras-chave: *Danio rerio*; Células ZEM-2S; Genes de relógio; TermoTRPs; Proteínas de choque térmico; HSP90; Temperatura.

Abstract

COSTA, M. R. J. Thermal Stress Effects on *Danio rerio* Biological Clock: a Link between Temperature, Light, Thermo-TRP Channels and Clock Genes. 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Temporal adaptation is essential for the survival of species which need to coordinately adjust their physiology and behavior to external signals. Biological rhythms are not just a response to the 24 hour changes in the physical environment imposed by the rotation of the Earth around its own axis, but they arise from an endogenous timing system. In the teleost *Danio rerio*, there has not been identified so far a region in the nervous system that could act as a central clock; some studies have reported the existence of cells and tissues which contain photosensitive, autonomous circadian clocks, demonstrating the existence of another type of circadian rhythm regulation in which environment perception and entrainment of the circadian period are directly effected at cell level.

The deleterious consequences of temperature increase are prevented by an adaptive response which assures cell survival in the presence of heat. This survival pathway activated by heat, known as response to temperature shock, is signaled by a cascade of events leading to the induction of thermal shock proteins (HSPs) which attenuate the acute cell lesion.

It is believed that the systems perceiving temperature and light daily cycles were subject to the same selective pressures during their co-evolution, resulting in their association. The base of thermal sensation is a family of highly conserved channels, present in all metazoans studied to date, and involved in a variety of sensorial

modalities, the transient receptor potential channels (TRP); those responding to thermal stimuli were grouped in a sub-family named thermo-TRPs.

The aim of this work was to investigate the influence of a temperature pulse (33 °C) on the expression of clock and heat shock protein genes, as well as the role of TRPV1 channel, in blastula embryonic cells of *Danio rerio*, named ZEM-2S, subject to constant dark (DD) or light-dark cycles (LD).

Using quantitative PCR, we demonstrated that ZEM-2S cells express genes for the following TRP channels: *trpA1a*, *trpA1b*, *trpV1/2*, *trpV4*, *trpC6*, *trpM2*, *trpM4a*, *trpM4b/c* and *trpM5*. After the pulse of temperature, we observed an increase of *hsp90 aa1* transcripts in DD as well as in LD; *hsp90 aa1* expression 1 hour after the stimulus was two-fold lower in LD than in DD. Temperature pulse did not affect the expression of any of the studied clock genes (*bmal1a*, *bmal1*, *bmal2*, *cry1a*, *cry1b*, *per1*, *per2*), when the cells were kept in DD. However, *per2* transcript increased in response to the temperature pulse when the cells were synchronized by light-dark cycles.

Inhibition of TRPV1 channel did not change the effect induced by the temperature pulse on *hsp90 aa1* in ZEM-2S cells kept in DD. On the other hand, our data suggest that this channel participates, at least partially, in the temperature-induced increase of *per2* in cells maintained in LD, as indicated by the significant decay observed in the gene response in the presence of the inhibitor.

Our results open new investigative perspective about the relationship between temperature and clock genes, placing a new “actor” in the regulation of the phenomenon: the TRPV1 channel.

Key words: *Danio rerio*; ZEM-2S cells; Clock Genes; Thermo-TRPs; Heat Shock Proteins; HSP90; Temperature.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação do relógio molecular de mamíferos	23
Figura 2. Modelo atual do mecanismo molecular do relógio circadiano de <i>Danio rerio</i>	25
Figura 3. Estrutura esquemática de um canal TRP.....	30
Figura 4. Gama de temperaturas de ativação dos canais termoTRPs em diferentes organismos.....	32
Figura 5. Esquema do protocolo experimental do pulso de temperatura de 33 °C (duração de uma hora) em células mantidas em DD	41
Figura 6. Esquema do protocolo experimental do pulso de temperatura de 33 °C (duração de 1 hora) em células mantidas em LD	42
Figura 7. Esquema do protocolo experimental do pulso de temperatura de 33 °C (duração de 1 hora) em células mantidas em DD, na presença de BCTC	43
Figura 8. Esquema do protocolo experimental do pulso de temperatura de 33 °C (duração de 1 hora), em células mantidas em LD, na presença de BCTC	44
Figura 9. PCR quantitativo dos genes <i>hsp90 aa1</i> (A) e <i>hsp90 ab1</i> (B) em células ZEM- 2S de <i>Danio rerio</i> submetidas a pulso de temperatura em DD	54
Figura 10. PCR quantitativo dos genes de relógio <i>bmal1a</i> (A), <i>bmal1b</i> (B) e <i>bmal2</i> (C) em células ZEM-2S de <i>Danio rerio</i> submetidas a pulso de temperatura em DD	55
Figura 11. PCR quantitativo dos genes de relógio <i>cry1a</i> (A) e <i>cry1b</i> (B) em células ZEM-2S de <i>Danio rerio</i> submetidas a pulso de temperatura em DD.....	55
Figura 12. PCR quantitativo dos genes de relógio <i>per1</i> (A) e <i>per2</i> (B) em células ZEM- 2S de <i>Danio rerio</i> submetidas a pulso de temperatura em DD	56
Figura 13. PCR quantitativo de <i>hsp90 aa1</i> (A) e <i>hsp90 ab1</i> (B) em células ZEM-2S de <i>Danio rerio</i>	57
Figura 14. PCR quantitativo dos genes de relógio <i>bmal1a</i> (A), <i>bmal1b</i> (B) e <i>bmal2</i> (C) em células ZEM-2S de <i>Danio rerio</i> submetidas a pulso de temperatura em LD.	58
Figura 15. PCR quantitativo dos genes de relógio <i>cry1a</i> (A) e <i>cry1b</i> (B) em células ZEM-2S de <i>Danio rerio</i> submetidas a pulso de temperatura em LD	59
Figura 16. PCR quantitativo dos genes de relógio <i>per1</i> (A) e <i>per2</i> (B) em células ZEM- 2S de <i>Danio rerio</i> submetidas a pulso de temperatura em LD.....	59

Figura 17. PCR quantitativo do gene <i>hsp90 aa1</i> em células ZEM-2S de <i>Danio rerio</i> após tratamento com inibidor do canal TRPV1	60
Figura 18. PCR quantitativo do gene de relógio <i>per2</i> em células ZEM-2S de <i>Danio rerio</i> após tratamento com inibidor do canal TRPV1	61

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Ritmos Biológicos	16
1.2. Percepção de Luz e Temperatura	17
1.3. Funcionamento da Maquinaria Molecular do Relógio Biológico	20
1.4. Temperatura e a Maquinaria do Relógio – Relação entre Proteínas de Choque Térmico (HSP, <i>Heat Shock Proteins</i>) e Genes do Relógio.....	25
1.5. Canais TRP e Percepção de Temperatura – TermoTRPs.....	29
1.6. Relógios Periféricos: Células ZEM-2S como Modelo de Estudo	33
2. OBJETIVOS	38
2.1. Objetivo Geral.....	38
2.2. Objetivos Específicos.....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1. Manutenção de Células Embrionárias ZEM-2S de <i>Danio rerio</i>	40
3.2. Protocolos Experimentais.....	41
3.3. Extração de RNA Total	44
3.4. Reação de Transcriptase Reversa - RT-PCR.....	45
3.5. PCR Quantitativo	46
3.6. Análise Estatística	50
4. RESULTADOS	52
4.1. Identificação de Canais TRP em Células Embrionárias ZEM-2S.....	52
4.2. Expressão de hsps e de Genes do Relógio em Células ZEM-2S Mantidas em Escuro Constante e Submetidas a um Pulso de 33 °C	53
4.3. Expressão de hsps e de Genes do Relógio em Células ZEM-2S Mantidas em Ciclos Claro-escuro e Submetidas a um Pulso de 33 °C	56
4.4. Expressão Gênica de <i>hsp90 aa1</i> e <i>per2</i> após Bloqueio do Canal TRPV1 por BCTC.....	60
5. DISCUSSÃO	63
6. BIBLIOGRAFIA	74

Introdução

“Até você tornar consciente, o inconsciente irá dirigir a sua vida, e você vai chamá-lo de destino”.

Carl Jung.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ritmos Biológicos

Ritmos biológicos podem ser entendidos como manifestações claras da organização temporal, que permitem aos organismos ocupar seu nicho no momento adequado. Está claro que os ritmos biológicos representam uma adaptação do organismo com relação ao ambiente em que vivem, sendo o tempo uma dimensão fundamental nesse processo, o qual possui caráter determinante na organização interna das espécies, permitindo a estas sincronizar eventos internos com os ciclos físicos do ambiente (Pittendrigh, 1993). Portanto, quase todas as espécies exibem variações periódicas em seu comportamento e/ou processos fisiológicos. Com exceção de cavernas, grandes profundidades marinhas ou certas nascentes de água quente, as características rítmicas de todos os ambientes na Terra são evidentes. Neste sentido, a adaptação temporal é fundamental para a sobrevivência de espécies que precisam coordenar sua fisiologia e comportamentos ajustando-se a sinais externos.

Ritmos biológicos não são simplesmente uma resposta às mudanças de 24 horas no ambiente físico impostas pela rotação da Terra sobre o seu próprio eixo, ao contrário, surgem a partir de um sistema de cronometragem endógeno. Este sistema de temporização próprio dos organismos baseia-se em mecanismos moleculares que determinam um período de oscilação. Entretanto, ciclos ambientais como o ciclo claro-escuro, de temperatura, de marés e outros, fornecem pistas que são interpretadas pelo organismo, permitindo que o mesmo se antecipe aos desafios impostos para sua sobrevivência através do ajuste dos programas temporais inatos a essas variáveis (Pittendrigh, 1993). Estas pistas ambientais denominam-se *zeitgebers* (doador do tempo em alemão), termo cunhado por Aschoff em 1960, referindo-se a quaisquer fatores

bióticos e abióticos cíclicos que podem promover a sincronização do organismo com o ambiente que ele ocupa, o que é denominado de arrastamento.

A presença de um temporizador em organismos eucariotos, como também em procariotos, garante um ritmo mesmo na completa ausência de pistas ambientais, situação em que o animal se encontra em livre curso, assegurando que as funções internas não percam seu perfil temporal (Aschoff, 1965). Relógios diferentes possuem períodos distintos, e aqueles que se aproximam de 24 horas de oscilação são denominados de relógios circadianos (*circa* = aproximadamente; *dien* = um dia). Ritmos com períodos mais curtos ou mais longos são chamados ultradianos ou infradianos, respectivamente.

1.2. Percepção de Luz e Temperatura

Dada a importância do ciclo claro-escuro como principal *zeitgeber* ambiental, muitos estudos constataram que células fotorreceptoras ou estruturas responsáveis pela captura da informação luminosa ambiental são encontradas desde organismos procariontes (Spudich *et al.*, 2000; Spudich, 2006). Opsinas compõem um grande grupo de proteínas estrutural e funcionalmente semelhantes, que são capazes de responder à luz em função da presença de um cromóforo associado à porção protéica (Findlay e Pappin, 1986). Atualmente existem seis importantes famílias de proteínas fotorreceptoras reconhecidas na literatura: as rodopsinas, os fitocromos, as xantopsinas, os criptocromos, as fototropinas e as *BLUF-proteins* (*blue-light using FAD proteins*) (Van Der Horst e Hellingwerf, 2004), sendo essa classificação baseada na estrutura química do componente responsável pela absorção da luz, o cromóforo.

O fotopigmento melanopsina pertence à família das rodopsinas, sendo uma proteína com sete domínios transmembrânicos, acoplada a proteína G, que se liga

covalentemente ao cromóforo 11-*cis*-retinal pela base de Schiff. A melanopsina foi inicialmente identificada nos melanóforos, retina e cérebro do anfíbio *Xenopus laevis* (Provencio *et al.*, 1998), sendo que nos melanóforos a presença deste fotopigmento os torna capazes de responder a luz com dispersão pigmentar (Isoldi *et al.*, 2005). Posteriormente, sua expressão foi verificada na retina de mamíferos (Provencio *et al.*, 2002), sendo hoje reconhecida como responsável pela sincronização do relógio central, o núcleo supra-quiasmático (NSQ) (Panda *et al.*, 2002; 2003). Nesta classe de vertebrados, a melanopsina está localizada em uma subpopulação de células ganglionares da retina (ipRGCs) sendo ativada pelo comprimento de onda do azul (480 nm). Ativação da melanopsina por luz recruta a participação de uma proteína Gq, seguida da ativação de uma fosfolipase C (PLC) e posterior abertura de canais de potencial receptor transitório C6 (TRPC6) e C7 (TRPC7), resultando na despolarização da membrana (Qiu *et al.*, 2005; Kumbalasiri *et al.* 2007; Hankins *et al.*, 2008; para revisão ver Hughes *et al.*, 2012). Das ipRGCs partem axônios que formam o Trato Retino-Hipotalâmico (TRH) que comunica a retina com o NSQ através do sinal de glutamato (Johnson *et al.*, 1988), promovendo a sincronização dos eventos internos com o ambiente (Reppert e Weaver, 2002).

Peixes, anfíbios, répteis e aves possuem células fotorreceptoras especializadas distribuídas em várias regiões do encéfalo, e a luz que incide sobre o corpo destes animais penetra pela pele e crânio e atinge essas células fotossensíveis, que veiculam a informação para uma região homóloga do NSQ (Menaker, 1972). No teleósteo *Danio rerio* ainda não foi identificada a presença de uma região que atue como relógio central, pelo contrário, alguns estudos têm evidenciado a existência de células e tecidos que contêm relógios circadianos autônomos, fotossensíveis, comprovando um outro tipo de regulação dos ritmos circadianos onde o funcionamento e a adaptação do período

circadiano são efetivados diretamente em nível celular (Whitmore *et al.*, 1998; Tamai *et al.*, 2005; Moore e Whitmore, 2014; Heussen e Whitmore, 2015). Porém essa responsividade celular à luz encontra-se prejudicada em estados patológicos, como em melanoma de *Danio rerio*, nos quais os genes induzíveis por luz e que exercem um papel crítico na regulação do relógio perdem essa capacidade (Hamilton *et al.*, 2015).

Acredita-se que os sistemas de percepção dos ciclos diários de temperatura e luminosidade sofreram as mesmas pressões seletivas em sua co-evolução, resultando em sua associação. O que suporta a hipótese evolutiva de “fuga da luz”, onde altas temperaturas encontradas na fase clara do dia seriam nocivas para a estabilidade de processos fisiológicos, bem como a radiação ultravioleta representaria uma ameaça à estrutura de ácidos nucleicos dos seres vivos. De acordo com Pittendrigh (1993), é provável que esta fuga da luz tenha exercido uma função significativa, de fato principal, na evolução da organização circadiana.

Uma recente descoberta que fortalece a interação de ciclos de luz e temperatura é descrita por Shen e colaboradores, que demonstraram que a detecção de temperatura mediada por canais TRP em *Drosophila* é dependente de rodopsina. Animais mutantes sem rodopsina perdem essa capacidade, sendo que a termossensibilidade é restaurada pela transfecção do fotopigmento melanopsina. É importante destacar que o papel da rodopsina/melanopsina é independente de luz, uma vez que os ensaios de termodescriminação foram realizados em condição de escuro constante (Shen *et al.*, 2011). Desta forma, os achados de Shen e colaboradores se destacam como uma importante contribuição para o entendimento da geração dos ritmos circadianos, uma vez que a melanopsina, um fotopigmento essencial para o arrastamento dos ritmos circadianos em vertebrados, é capaz de interagir com o TRP de *Drosophila* e reestabelecer a termossensibilidade nesses animais.

A convergência dos componentes das vias de sinalização de opsinas e de canais TRP pode ter resultado de um processo adaptativo considerável, uma vez que essa cascata enzimática confere ao sistema de detecção termossensorial uma capacidade de amplificação de sinal mesmo em pequenas diferenças de temperatura dentro de um intervalo confortável (Minke e Peters, 2011; Fowler e Montell, 2013). A co-evolução dos sistemas de fotorrecepção/termorrecepção pode ser considerada para explicar a interação dos canais TRP e rodopsina, ampliando a lista atual de proteínas sensíveis à temperatura conhecidas, incluindo proteínas classicamente sensíveis à luz como rodopsina e melanopsina. Trabalhos recentes vêm demonstrando esta interação opsina e canais TRP em outros processos, como a resposta de melanócitos humanos à radiação UVA com produção de melanina, atribuindo esse fenômeno à ação conjunta de rodopsina e o canal TRPA1 (Wicks *et al.*, 2011; Bellono *et al.*, 2013).

1.3. Funcionamento da Maquinaria Molecular do Relógio Biológico

A grande maioria do conhecimento a respeito do funcionamento da maquinaria molecular do relógio é originária de estudos realizados em mamíferos nos quais os sinais luminosos captados pela retina são convertidos em impulsos nervosos. O trato retino-hipotalâmico libera o neurotransmissor excitatório glutamato nas células do NSQ e provocando o arrastamento do relógio central, sincronizando a fase do relógio central com a fase dos ciclos claro-escuro ambientais (Ohi *et al.*, 1991; Takeuchi *et al.*, 1991).

O funcionamento do NSQ envolve mecanismos de retroalimentação positiva e negativa (Figura 1). As proteínas dos genes *Clock* (*Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*) e *Bmal1* (*Brain and Muscle Arnt-like protein 1*) formam o heterodímero CLOCK:BMAL1, que atua como fator de transcrição para a expressão dos genes *Per1*, *Per2* e *Per3* (*Period*), *Cry1* e *Cry2* (*Cryptochrome*) (Yamaguchi *et al.*, 2000). As

proteínas PER e CRY formam oligômeros com uma caseína quinase, são fosforilados e transportados do citoplasma para o núcleo, onde bloqueiam a sua própria transcrição ao interagirem com o heterodímero CLOCK/BMAL1 inibindo sua ação como fator de transcrição (Young *et al.*, 2001). O dímero CLOCK:BMAL1 também ativa uma segunda alça de retroalimentação composta pelos genes *Rev-erb α/β* e *Ror α/β* . As proteínas ROR α/β e REV-ERB α/β atuam sobre a mesma região, *Retinoic acid-related Orphan receptor Response Element* (RORE), do promotor de *Bmal1*, de forma competitiva, na qual a primeira inicia a transcrição de *Bmal1*, e a segunda a inibe (Buhr e Takahashi, 2013). A proteína REV-ERB α/β aumenta com a indução da transcrição de CLOCK:BMAL1 e vai para o núcleo, ligando-se ao promotor de *Bmal1* e reprimindo sua transcrição (Preitner *et al.*, 2002). Uma alta expressão de REV-ERB α/β é capaz de inibir a ação de ROR α/β (Guillaumond *et al.*, 2005); dessa maneira, quando a proteína REV-ERB está ausente, o gene *Bmal1* é novamente transcrito com o auxílio de ROR α/β , podendo formar novamente o fator de transcrição CLOCK:BMAL1, reiniciando um novo ciclo circadiano. Se *Clock* for removido do sistema, o funcionamento do NSQ permanece rítmico (DeBruyne *et al.*, 2006), pois o gene *Npas2* é capaz de assumir a função de *Clock* (DeBruyne *et al.*, 2007a). Já a remoção de *Bmal1* resulta na desregulação da maquinaria do relógio (Bunger *et al.*, 2000; Mieda e Sakurai, 2011).

Assim como os genes *Rev-erb α/β* e *Ror α/β* , a enzima caseína quinase 1 ϵ (CK1 ϵ) é um elemento essencial na regulação dos genes de relógio (Figura 1). Ela é responsável pela fosforilação e consequente estabilidade das proteínas PER no citoplasma e sua migração para o núcleo celular, enquanto CRY é fosforilado pela ativação das proteínas quinases AMPK1 e DYRK1A (Dibner *et al.*, 2010; Mohawk *et al.*, 2012; Brown e Azzi, 2013; Buhr e Takahashi, 2013; Partch *et al.*, 2014). A ubiquitinação e consequente degradação das proteínas PER e CRY as tornam

insuficientes para inibir o heterodímero CLOCK/BMAL1, reiniciando um novo ciclo. Todos esses ciclos anteriormente descritos levam em torno de 24 horas para se completarem, sendo a variação das concentrações dessas diferentes proteínas ao longo do dia a base molecular do relógio biológico.

Após a identificação de genes de relógio em fibroblastos de ratos ficou claro que tecidos periféricos funcionam como osciladores (Balsalobre *et al.*, 1998). Posteriormente, vários estudos comprovaram a presença desses genes em células de tecidos periféricos, o que permite sua sincronização a fatores locais independentemente do relógio central (Zylka *et al.*, 1998; Balsalobre *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 2000; Stokkan *et al.*, 2001; Storch *et al.*, 2002).

O heterodímero CLOCK1-BMAL1 atua ainda controlando a transcrição de outros genes, que não aqueles do relógio, mas que também possuem o elemento E-box na sua região promotora, o que torna a sua transcrição dependente dos componentes do relógio biológico. Estes genes são conhecidos como genes controlados pelo relógio *clock-controlled genes* (CCGs) e apresentam uma variação rítmica circadiana de seus transcritos. Dada essa característica, são considerados um dos possíveis mecanismos de eferência do relógio circadiano, pois controlam a produção e/ou liberação de substâncias como hormônios, neurotransmissores, neuropeptídios, moléculas de sinalização intracelular, entre outros, sincronizando todo o organismo ao funcionamento da maquinaria do relógio central (Zanquetta *et al.*, 2010; Mohawk *et al.*, 2012; Hamilton *et al.*, 2015).

Figura 1. Representação do relógio molecular de mamíferos. O heterodímero CLOCK/BMAL1 é um fator de transcrição para genes que possuem uma sequência E-box, como *Per* e *Cry*. As proteínas PER e CRY formam oligômeros, que são fosforilados pela caseína quinase 1 (ϵ e δ) e são transportadas para o interior do núcleo onde bloqueiam a ação de CLOCK/BMAL1. As proteínas PER e CRY são hiperfosforiladas para que sejam degradadas nos proteassomos, iniciando um novo ciclo (Burh e Takahashi, 2013).

Em *Danio rerio* foram identificados 4 genes *period* (*per1a*, *per1b*, *per2* e *per3*), 6 genes *cryptochrome* (*cry1a*, *cry1b*, *cry2a*, *cry2b*, *cry3* e *cry4*), 3 genes *clock* (*clock1a*, *clock1b* e *clock2*) e 3 genes *bmal* (*bmal1a*, *bmal1b*, *bmal2*) (Kobayashi *et al.*, 2000; Cahill, 2002; Wang, 2008; Vatine *et al.*, 2011). Entretanto, apesar dessa grande diversidade gênica, o funcionamento da maquinaria do relógio encontrada em mamíferos é filogeneticamente antiga, sendo a descrição das alças de retroalimentação

descritas para mamíferos válidas para a descrição do funcionamento do relógio molecular em *Danio rerio*.

De acordo com o modelo proposto por Vatine e colaboradores (Figura 2), o sinal luminoso é captado por um fotopigmento circadiano inserido na membrana (muito provavelmente a melanopsina). A partir disso se inicia a transcrição de TEF (*Thyrotroph Embryonic Factor*), que se ligará ao elemento D-box de *per2* e *cry1a*, ativando a expressão destes. PER2 e CRY1a iniciam o funcionamento da alça de retroalimentação central, a qual é composta por múltiplas cópias dos genes *clock*, *bmal*, *per* e *cry*, resultando em regulação do sistema. Do lado positivo da alça, há a expressão gênica de *clock* e *bmal* e produção de um heterodímero das proteínas resultantes desses respectivos genes. O complexo CLOCK:BMAL liga-se aos elementos E-box dos genes *per* e *cry* controlando a expressão rítmica destes. O heterodímero PER:CRY, quando em grandes concentrações no citoplasma, retorna ao núcleo e reprime sua própria transcrição através da interação com CLOCK:BMAL, caracterizando a porção negativa da alça. Além das alças positiva e negativa, há ainda a presença de uma alça central estabilizadora que regula a expressão de *bmal*, agindo através da indução ou repressão dos genes *Ror* e *Rev-erb*. Todo esse processo demora cerca de 24 horas, o que caracteriza um ciclo com padrão rítmico circadiano (Vatine *et al.*, 2011).

Figura 2. Modelo atual do mecanismo molecular do relógio circadiano de *Danio rerio* (Vatine *et al.*, 2011).

1.4. Temperatura e a Maquinaria do Relógio – Relação entre Proteínas de Choque Térmico (HSP, *Heat Shock Proteins*) e Genes do Relógio

Temperaturas elevadas podem provocar desnaturação, degradação e agregação de proteínas intracelulares que participam de processos críticos, ativando vias que levam à morte celular (Bivik *et al.*, 2007; Chinnathambi *et al.*, 2008). As consequências deletérias do aumento da temperatura são impedidas, em certa medida, por uma resposta adaptativa que assegura a sobrevivência celular na presença de calor (Soti *et al.*, 2005). Esta via de sobrevivência ativada por calor, conhecida como resposta ao choque térmico, é composta por uma cascata de eventos que conduzem à indução de proteínas de choque térmico (HSPs) que minimizam a lesão celular aguda. As HSPs pertencem a

uma família multigênica e podem apresentar um peso molecular que varia de 10 a 150 kDa. Outra função atribuída às HSPs é que as mesmas estão diretamente relacionadas com a resistência a apoptose celular encontrada no câncer (Samali e Cotter, 1996; Takayama *et al.*, 2003; Wrzal *et al.*, 2008).

A classificação das subfamílias está de acordo com o peso molecular que cada grupo apresenta: HSP de 100-110 kDa, 90 kDa, 70 kDa, 60 kDa, 40 kDa e a subfamília que apresenta peso molecular de 18-30 kDa (Richter e Buchner, 2001; Sreedhar *et al.*, 2004). Estas proteínas são encontradas tanto em organismos procariontes como eucariontes e apresentam uma alta homologia em suas sequências nucleotídicas e de aminoácidos. Localizam-se principalmente no citoplasma, tendo como principal função a manutenção da homeostasia celular frente a um desafio por altas temperaturas.

Uma das sub-famílias mais abundantes é a das proteínas de choque térmico de 90 kDa, ou HSP90. Estas proteínas compõem 1 a 2% das proteínas citosólicas totais e sua expressão pode aumentar em até 10% durante eventos de estresse celular (Nollen e Morimoto, 2002). Duas isoformas, HSP90 α (HSP90aa) e β (HSP90ab), encontram-se no citosol, com frações muito pequenas no núcleo, diferenciando-se das outras isoformas que geralmente estão associadas a organelas (Sawarkar e Paro, 2013). Estas duas proteínas compreendem cerca de 80% desta subfamília, sendo as mais estudadas pelo fato de modularem a maioria das ações exercidas pelas HSP90 (Lindquist e Craig, 1988; Welch, 1991).

A função mais estudada e conhecida das proteínas HSP90 diz respeito a sua atuação como moduladoras alostéricas de várias proteínas denominadas “clientes de HSP90”, conferindo às HSP90 a função de chaperonas moleculares, proteínas que auxiliam o enovelamento de proteínas e previnem a sua agregação, entre outras importantes funções intracelulares, inclusive o crescimento de células eucariontes. Elas

são capazes de interagir com proteínas não-enoveladas, conservando-as em um estado re-enovelável, e mantêm a conformação, estabilidade e função de vasto número de proteínas (Khurana e Bhattacharyya, 2015). Fatores de transcrição (Zou *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2004), proteínas quinases (Buchner, 1999; Caplan, 1999; Mayer e Bukau, 1999) e outras proteínas que participam na regulação da transcrição e tradução de sinais, tais como o receptor de hormônios esteroides (Cadepond *et al.*, 1991; Pratt e Toft, 2003) e as sintases de óxido nítrico (Garcia-Cardena *et al.*, 1998; Bender, *et al.*, 1999; Balligand, 2002; Yoshida e Xia, 2003), são reconhecidos como proteínas clientes das HSP90. Outra função das HSP90 é prolongar a vida média de suas proteínas clientes, através da estabilização e prevenção da degradação proteassomal das proteínas às quais elas se unem (Lu *et al.*, 2007).

Resumidamente, em condições de estresse térmico, a indução das HSP90 se inicia com a liberação do fator de resposta a estresse térmico (HSF1), que normalmente se encontra inibido pela associação a HSP90 no citosol. Uma vez liberado, o HSF1 transloca-se para o núcleo onde se une a elementos de resposta a estresse térmico (HSE – *Heat Shock Elements*), iniciando a ativação da transcrição e o subsequente aumento da expressão das HSP90 (Leach *et al.*, 2012b). Por sua vez, as HSP90 são reguladas por proteínas quinases e/ou fosfatases (Richter e Buchner, 2001; Sud *et al.*, 2007).

Este sistema de resposta ao calor, através do HSF1, pode estar envolvido na regulação do oscilador circadiano central. Camundongos alterados geneticamente que não possuem o HSF1 apresentam um período mais longo em livre curso do que os camundongos do tipo selvagem (Reinke *et al.*, 2008). A inibição farmacológica das vias de sinalização das HSP aumenta o período de neurônios do NSQ e interfere no arrastamento da fase em relógios periféricos de camundongos (Buhr *et al.*, 2010).

Em culturas de neurônios da pineal de pintos ou do NSQ de mamíferos, as variações de temperatura do meio alteram a fase do relógio biológico (Barrett e Takahashi, 1997; Ruby *et al.*, 1999). Osciladores periféricos, incluindo fibroblastos, fígado, rim e intestino também são sensíveis às mudanças de temperatura (Abraham *et al.*, 2010; Buhr *et al.*, 2010). Lahiri e seus colegas descreveram que células da linhagem PAC-2, originárias do teleósteo *Danio rerio*, quando submetidas a ciclos de 27,5 °C e 23,5 °C (12:12) durante 6 dias em DD, apresentaram expressão diminuída dos genes *per4* (também designado de *per1b*) e *cry3*, na temperatura mais elevada, enquanto que em temperatura mais baixa estes genes exibiam um aumento em seus transcritos (Lahiri *et al.*, 2005).

Uma das possíveis explicações da influência da temperatura no funcionamento da maquinaria do relógio pode residir na relação entre as proteínas BMAL1 e HSP90. Como já mencionado, a proteína BMAL1 possui participação chave no funcionamento da maquinaria molecular do relógio circadiano, onde o seu heterodímero com CLOCK atua como fator de transcrição para a expressão de vários genes do relógio. Em seu trabalho, Schneider e colegas demonstraram que, em fibroblastos de ratos, a inibição da HSP90 reduz significativamente os níveis celulares de BMAL1, tendo consequência direta na maquinaria do relógio, diminuindo a expressão do gene *Per2* (Schneider *et al.*, 2014).

1.5. Canais TRP e Percepção de Temperatura – TermoTRPs

Para entender como a temperatura pode modificar os ritmos biológicos em nível molecular, é fundamental que conheçamos como os organismos podem detectar as variações térmicas no ambiente externo e interno. A capacidade de perceber variações de temperatura é um dos processos sensoriais mais antigos, do ponto de vista evolutivo. Todos os organismos, de bactérias até plantas e animais, possuem mecanismos capazes de detectar as variações térmicas que ocorrem no ambiente e gerar respostas que são cruciais para sua sobrevivência (Vriens *et al.*, 2014). As bases dessa sensação térmica estão em um grupo de canais altamente conservados – presente em todos os metazoários estudados até o momento e envolvidos em uma série de modalidades sensoriais – os já mencionados canais de potencial receptor transiente (TRP).

No ano de 1969, Cosens e Manning publicaram um trabalho no qual descreviam uma disfunção na cascata de fototransdução em *Drosophila* (Cosens e Manning, 1969), iniciando a grande jornada de descoberta e caracterização dos canais TRP. Após duas décadas, Montell e Rubin (1989) identificaram os verdadeiros responsáveis por essa disfunção, caracterizando a descoberta do primeiro canal TRP. Até o presente foram identificados mais de 50 canais TRP, que respondem aos mais variados estímulos e que estão presentes em uma ampla variedade de organismos.

Nos mamíferos, foram identificadas seis subfamílias que compõem o grande grupo dos canais TRP: TRPC (TRPC1-7), TRPV (TRPV1-6), TRPM (TRPM1-8), TRPP (TRPP2, TRPP3, TRPP5), TRPML (TRPML1-3) e TRPA (TRPA1).

Sabe-se que a família de canais TRP é distinta de outros grupos de canais iônicos por apresentar uma diversidade de seletividade iônica, modos de ativação e funções. No entanto, todos os seus componentes são compostos por quatro subunidades idênticas, onde cada uma delas consiste de seis domínios transmembrânicos com a

formação de um poro para a passagem de cátions presente entre os segmentos 5 e 6 da subunidade (Poletini *et al.*, 2015) (Figura 3).

Figura 3. Estrutura esquemática de um canal TRP (Poletini *et al.*, 2015).

Entre os membros da grande família dos canais TRP, os que respondem a estímulos térmicos foram agrupados em uma subfamília e denominados termoTRPs, os quais apresentam duas características comuns: 1) sua ativação provoca um influxo não seletivo de íons, podendo gerar uma alteração no potencial de repouso da membrana plasmática; 2) embora cada canal termoTRP seja ativado dentro de um intervalo de temperatura relativamente estreito, a gama que todos eles cobrem conjuntamente é muito ampla, partindo do frio nocivo até temperaturas altas que também podem ser nocivas à integridade do organismo (Romanovsky, 2007).

Em mamíferos, a ativação dos termoTRPs é seguida por um influxo de íons que pode gerar um potencial de ação em neurônios sensoriais, caracterizando o início do processo de transdução da termossensação (Dhaka *et al.*, 2006). Além de responder a estímulos térmicos, os termoTRPs também podem ser ativados por estímulos químicos

ou físicos, o que os caracteriza como receptores multimodais. Outra característica dessas proteínas é que a sua expressão não está restrita a neurônios sensoriais, podendo estar presente em vários tipos de tecidos (Patapoutian *et al.*, 2003). Os dez termoTRPs identificados em mamíferos são membros de diferentes subfamílias: TRPV (TRPV1-TRPV4), TRPM (TRPM2, TRPM4, TRPM5 e TRPM8), TRPA1 e TRPC5, sendo cada um ativado por diferentes faixas de temperatura (Saito e Tominaga, 2015).

Ao longo dos últimos anos, vários estudos vêm demonstrando que, apesar dos termoTRPs apresentarem estruturas semelhantes em diferentes organismos, eles são espécie-específicos, sendo ativados por diferentes faixas de temperaturas (Figura 4), comprovando que durante o processo evolutivo houve uma diferenciação funcional de um mesmo termoTRP (Gau *et al.*, 2013; Saito *et al.*, 2011; Caterina *et al.*, 1997; Gracheva e Bagriantsev, 2015).

Figura 4. Gama de temperaturas de ativação dos canais termoTRPs em diferentes organismos. Apesar de apresentarem a mesma estrutura, muitos canais termoTRPs respondem a diferentes temperaturas de acordo com a classe de vertebrados à qual pertencem (Poletini *et al.*, 2015).

Análises filogenéticas demonstraram que o teleósteo *Danio rerio* possui nove termoTRPs codificados em seu DNA, porém alguns deles diferem daqueles presentes nos mamíferos (Saito e Shingai, 2006), fato atribuído a algumas mudanças ocorridas no genoma deste teleósteo. Os termoTRPs presentes em *Danio rerio* são: TRPV1/2, TRPV4, TRPM2, TRPM4a, TRPM4b, TRPM4c, TRPM5, TRPA1a e o TRPA1b.

1.6. Relógios Periféricos: Células ZEM-2S como Modelo de Estudo

Hoje já está bem estabelecido que, em adição ao marcapasso circadiano localizado no sistema nervoso central, há osciladores em tecidos periféricos (Abe *et al.*, 2002). Plautz e Kay (1997) realizaram um estudo muito interessante em *Drosophila* no qual demonstraram que mesmo fragmentos separados do corpo são capazes de se sincronizar a ciclos claro-escuro. Resultado semelhante foi encontrado no peixe teleósteo *Danio rerio*, no qual tecidos e órgãos podem ser sincronizados por luz (Whitmore *et al.*, 2000). Experimentos com cultura celular também têm contribuído para o entendimento dos relógios periféricos, os quais nesses modelos podem ser sincronizados por diversos fatores como luz (Whitmore *et al.*, 2000; Pando *et al.*, 2002; Farhat *et al.*, 2009), temperatura (Buhr *et al.*, 2010) e choque de soro (Balsalobre *et al.*, 1998).

Yamazaki e colaboradores (2000) demonstraram que explantes de NSQ apresentavam ritmo constante de expressão de *Per1*, enquanto explantes derivados do pulmão e fígado rapidamente perdiam suas oscilações, indicando que a via de comunicação do relógio central com os relógios periféricos poderia ser importante para a manutenção dos ritmos periféricos. Dessa forma ficava claro que relógios periféricos distinguiam-se do relógio central em mamíferos, uma vez que a expressão rítmica dos genes do relógio em órgão ou células em cultura persistia somente por poucos dias (Yamasaki *et al.*, 2000).

A perda gradual da oscilação dos relógios periféricos em mamíferos, na ausência de sinais do NSQ, sugeria que o ajuste de fase dos osciladores periféricos fosse diariamente controlado pelo marcapasso central. A partir desses achados acreditava-se que este conceito de controle rítmico do oscilador central sobre os periféricos era baseado em uma relação de subordinação, onde o relógio central possuiria dominância

sobre os periféricos (Ripperger e Schibler, 2001; Carr e Whitmore, 2005). No entanto, vários laboratórios demonstraram a independência do oscilador em muitos tecidos (Yamazaki *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2002; Bartell *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2005; Davidson *et al.*, 2005) e hoje esse conceito foi reestruturado levando-se em consideração uma maior integração dos sistemas periféricos e central para a geração de uma resposta rítmica homeostática.

Experimentos mais recentes, não mais baseados em lesão do NSQ, mas em deleção gênica específica no NSQ, demonstraram que camundongos nocaute para *Bmal1* no marcapasso central apresentaram uma falta de sincronia nos tecidos periféricos em condições de escuro constante, sendo essa sincronia restabelecida quando esses animais foram submetidos a ciclos claro-escuro, comprovando que tecidos periféricos podem ser arrastados por luz de forma independente da maquinaria do relógio central (Izumo *et al.*, 2014; Husse *et al.*, 2015). Abriu-se, assim, espaço para um novo conceito de organização do sistema circadiano: o modelo federado. Tal modelo contesta a ideia clássica da organização hierarquizada, onde a luz promoveria o ajuste do NSQ e este realizaria o alinhamento temporal nos tecidos periféricos, pois demonstra que o SCN é necessário para sustentar os ritmos em condições de livre curso, mas é dispensável para sustentar ritmos quando o organismo é submetido a ciclos claro-escuro (Husse *et al.*, 2015).

O modelo de estudo escolhido para o nosso trabalho é representado por células embrionárias de blástula de *Danio rerio* (zebrafish), uma linhagem comercialmente disponível denominada ZEM-2S. Pertencente à família dos Cyprinidae, *Danio rerio* é um teleósteo, caracterizado principalmente por seu pequeno tamanho medindo, quando adulto, cerca de 4 a 5 cm, e que habita água doce. Apresenta um corpo cilíndrico e um padrão de coloração corporal no qual são facilmente identificáveis listras horizontais

que alternam cores escuras e claras (Spence *et al.*, 2008). O *zebrafish* é um animal euritérmico, capaz de suportar grandes variações térmicas. Em um estudo onde foram coletados exemplares da espécie na natureza, os locais apresentaram uma grande heterogeneidade quanto à temperatura média apresentada, no intervalo entre 16,5 °C e 38,5 °C (López-Olmeda e Sánchez-Vázquez, 2011).

A razão para o aumento da atenção para o sistema circadiano de *Danio rerio* é o seu potencial como modelo de sistema para análise genética dos mecanismos de relógio (Allada *et al.*, 2001; Loros e Dunlap, 2001; Yong e Kay, 2001; Okamura *et al.*, 2002; Stanewsky, 2002), já que linhagens celulares derivadas de embriões deste animal expressam genes do relógio sincronizados por luz (Whitmore *et al.*, 2000; Pando *et al.*, 2001; Farhat *et al.*, 2009). Além disso, suas semelhanças, no que diz respeito à composição e funcionamento da maquinaria molecular dos relógios biológicos, ao de mamíferos, permitiram que fosse adotado como modelo alternativo aos roedores nas investigações acerca da genética dos ritmos biológicos de vertebrados (Cahill, 2002; Vatine *et al.*, 2011).

A capacidade de percepção luminosa dessa linhagem celular foi comprovada por estudo realizado por nosso grupo onde ficou claro que, quando submetidas a ciclos claro-escuro com diferentes durações da fase de luz, as células ZEM-2S exibem diferentes perfis de proliferação, além de uma expressão rítmica de genes de relógio – *clock*, *per1* e *cry1b* – quando expostas a ciclo claro-escuro (12:12), comprovando a capacidade de sincronização desse modelo celular por luz (Farhat *et al.*, 2009).

Em um estudo dedicado à identificação de fotopigmentos em *Danio rerio*, Davies e colaboradores (2011) caracterizaram cinco genes de melanopsinas (*Opn4m-1*, *Opn4m-2*, *Opn4m-3*, *Opn4x-1* e *Opn4x-2*). No modelo ZEM-2S, Ramos e colaboradores (2014) identificaram as duas melanopsinas, *Opn4m-1* e *Opn4m-2*, como as mais

expressas. Ainda nesse mesmo estudo, os autores demonstraram que, quando mantidas em DD e submetidas a um pulso de luz azul com duração de dez minutos, as células ZEM-2S apresentavam um aumento expressivo na expressão do gene de relógio *per2* duas horas após o final do pulso (Ramos *et al.*, 2014).

Gau e colaboradores verificaram que larvas de *Danio rerio* apresentavam uma resposta locomotora maior quando expostas a temperaturas acima de 32 °C, preferindo ambientes com temperaturas mais amenas. Quando o gene ortólogo de TRPV1 nesses organismos foi deletado, as larvas perderam a capacidade de termotaxia, levando a crer que o canal TRPV1 é o principal responsável pela detecção da temperatura nessa fase de desenvolvimento (Gau *et al.*, 2013).

Baseando-se nos dados de literatura descritos neste capítulo, propusemo-nos a investigar a influência do pulso de temperatura (33 °C) na expressão de genes de relógio e de proteínas de choque térmico, bem como o papel do canal TRPV1, em células ZEM-2S submetidas a escuro constante e ciclos claro-escuro (12:12) tendo em vista a relação intrincada destes dois fatores ambientais na sincronização dos relógios circadianos em outros modelos (Lee e Montel, 2013). Portanto, levantamos a seguinte hipótese: as células ZEM-2S percebem calor o que leva ao aumento da expressão de genes do relógio, possivelmente através da ativação de HSP90 e de canais TRPV1.

Objetivos

“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços.”

Albert Einstein

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar a influência do pulso de temperatura nas células ZEM-2S do teleósteo *Danio rerio*, em livre curso (DD) ou sincronizadas por ciclo claro-escuro (LD 12:12).

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar a presença de genes *hsp90 aa1*, *hsp90 ab1* e de canais termo-TRPs em células ZEM-2S de *Danio rerio*;
- Avaliar a expressão gênica de *hsp90 aa1*, *hsp90 ab1*, *per1*, *per2*, *cry1a*, *cry1b*, *bmal1a*, *bmal1b*, *bmal2* em resposta a pulso de temperatura de 33 °C, em células ZEM-2S de *Danio rerio* mantidas em escuro constante (DD) ou ciclo claro-escuro (LD);
- Avaliar o efeito do inibidor de canais TRPV1 na expressão de *hsp90* e de genes de relógio alterados no protocolo anterior, em experimentos de pulso de temperatura de 33 °C, em células ZEM-2S de *Danio rerio* mantidas em DD ou LD.

Material e Métodos

“O método científico é comprovado e verdadeiro. Não é perfeito, é apenas o melhor que temos. Abandoná-lo, junto com seus protocolos céticos, é o caminho para uma idade das trevas.”

Carl Sagan

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Manutenção de Células Embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*

Células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio* (gentilmente cedidas pelo Prof. Mark Rollag, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD, EUA e adquiridas originalmente da ATCC, CRL-2147, Manassas, VA, EUA) foram mantidas em frascos de 75 cm² com meio composto de 50% de L15, 35% de D-MEM, 15% de F12 (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e 15 mM de HEPES (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA), complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico/antimicótico (10.000 U/mL penicilina; 10.000 µg/mL estreptomicina; 25 µg/mL anfotericina B, ThermoFisher, Waltham, MA, EUA), em estufa a 28 °C, em escuro constante. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana e as células foram subcultivadas (1:3) quando atingiam a semi-confluência nos frascos. Para tanto foram removidas com solução de Tyrode/EDTA (NaCl 8,0 g/L; KCl 0,2 g/L; NaHCO₃ 1,0 g/L; NaH₂PO₄ 0,05 g/L; MgCl₂ 1,0 g/L; EDTA 1,86 g/L) e transferidas para novos frascos.

Para que a densidade celular fosse constante em todos os experimentos descritos abaixo, as células ZEM-2S foram destacadas dos frascos de cultura, centrifugadas a 500 x g por 5 min, ressuspensas em meio de cultura e contadas em câmara de Neubauer. Para calcular o volume necessário de suspensão de células para obtenção da densidade final de 2x10⁶ células por frasco de 25 cm², empregou-se a fórmula: $N \times 5 \times 10^3$, onde N igual ao número de células contadas, 5 referente ao fator de diluição da alíquota de 200 µL e 10³ equivalente a suspensão final de 1 mL preparada para a contagem. Adicionado

o volume calculado da suspensão de células em cada frasco de 25 cm², acrescentou-se meio de cultura para completar o volume final para 4 mL.

3.2. Protocolos Experimentais

I – Pulso de temperatura de 33 °C em escuro constante (DD)

Células ZEM-2S foram semeadas (2x10⁶ células/25 cm²) e mantidas por 6 dias em estufa a 28 °C, em DD, em meio como descrito acima, mas contendo retinaldeído 10⁻⁷ M e com SFB reduzido para 2%, sem nenhum tipo de manipulação ou troca de meio. No início do 7º dia, foi aplicado um pulso de temperatura de 33 °C, durante 1 hora, com extração temporal de RNA total 1, 2 e 4 horas após o final do estímulo (Figura 5).

Figura 5. Esquema do protocolo experimental do pulso de temperatura de 33 °C (duração de uma hora) em células mantidas em DD.

II – Pulso de temperatura de 33 °C em ciclo claro-escuro (LD)

Células ZEM-2S foram semeadas (2x10⁶ células/25 cm²) e mantidas em 12:12 LD (fotofase com luz branca, com espectro de emissão de 420 a 750 nm, intensidade de 95,18 mW/cm², 650 lux) em estufa a 28 °C, em meio idêntico ao do protocolo I por 6 dias, sem nenhum tipo de manipulação ou troca de meio. No início do 7º dia, fase clara,

foi aplicado um pulso de temperatura de 33 °C durante 1 hora, com extração temporal de RNA total 1, 2 e 4 horas após o final do estímulo (Figura 6).

Figura 6. Esquema do protocolo experimental do pulso de temperatura de 33 °C (duração de 1 hora) em células mantidas em LD.

III – Pulso de temperatura de 33 °C em DD, com adição do inibidor seletivo de canais TRPV1

Para experimentos com o inibidor N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl) tetrahydropyrazine-1(2H)-carbox-amide (BCTC) (Abcam Biochemicals®, Cambridge, MA, EUA), a solução estoque foi preparada em DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e as diluições intermediárias em H₂O livre de RNase/DNase estéril. O BCTC é um potente inibidor do canal TRPV1, sendo que a concentração deste fármaco utilizada nos experimentos, 4×10^{-8} M, foi baseada no valor de IC₅₀ recomendado pelo fabricante para mamíferos, com posterior verificação da sobrevivência celular em diferentes concentrações, através de testes realizados por nós em período nunca inferior a 24 horas. Devido ao fato que a dissolução deste fármaco requer DMSO, expusemos as células controle à mesma concentração final de DMSO presente no meio das células tratadas com inibidor.

Células ZEM-2S foram semeadas (2×10^6 células/25 cm²) e mantidas em estufa a 28 °C, em DD, em meio como descrito nos protocolos anteriores por 6 dias, sem

nenhum tipo de manipulação ou troca de meio. No início do 7º dia, foi aplicado um pulso de temperatura de 33 °C durante 1 hora, sendo o BCTC aplicado 30 min antes do início do pulso em concentração final de 4×10^{-8} M, permanecendo no meio durante toda a duração do experimento. Extração de RNA total foi feita 1 hora após o final do estímulo (Figura 7), ponto onde foi encontrada a maior resposta de expressão de genes do relógio e de *hsp90* em DD.

Figura 7. Esquema do protocolo experimental do pulso de temperatura de 33 °C (duração de 1 hora) em células mantidas em DD, na presença de BCTC.

IV – Pulso de temperatura de 33 °C em LD, com adição do inibidor seletivo de canais TRPV1 (BCTC)

Células ZEM-2S foram semeadas (2×10^6 células/25 cm²) e mantidas em 12:12 LD (fotofase com luz branca, com espectro de emissão de 420 a 750 nm, intensidade de 95,18 mW/cm², 650 lux) em estufa a 28 °C, em meio idêntico ao utilizado nos protocolos anteriores por 6 dias, sem nenhum tipo de manipulação ou troca de meio. No início do 7º dia, fase clara, foi aplicado um pulso de temperatura de 33 °C durante 1 hora, sendo o BCTC aplicado 30 min antes do início do pulso, na concentração final de 4×10^{-8} M, permanecendo no meio até o final do experimento. A extração de RNA total

foi 2 horas após o final do estímulo (Figura 8), ponto no qual foi encontrada a maior respostas de expressão de *per2* em LD.

Figura 8. Esquema do protocolo experimental do pulso de temperatura de 33 °C (duração de 1 hora), em células mantidas em LD, na presença de BCTC.

3.3. Extração de RNA Total

Após o descarte do meio, foi adicionado 1 mL de *Tri-Reagent-LS* (Ambion, Foster City, CA, EUA) diretamente sobre as células. O lisado celular foi coletado e incubado por 5 min à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação das proteínas nucleares. Adicionaram-se 200 µL de bromo-cloro-propano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e, em seguida, as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 seg. Após incubação por 10 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4 °C, separando-se em seguida a fase superior aquosa, que contém RNA. O RNA foi precipitado com a adição de 650 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 10 min à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000 x g por 35 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o RNA lavado com 1,3 mL de etanol 75%. O RNA foi recuperado por centrifugação a 12.000 x g por 15 min a 4 °C, e a lavagem com etanol repetida, sendo as amostras

colocadas a -80 °C por, no mínimo, 1 h. Após nova centrifugação, o etanol foi descartado e o precipitado de RNA evaporado à temperatura ambiente, ressuspendido em 20 µL de H₂O/DEPC (Ambion, Foster City, CA, EUA) e tratado com DNase I conforme instruções do fabricante (*turbo-DNA-freeTM*, Ambion, Foster City, CA, EUA). Resumidamente, adicionou-se a cada amostra, 10% do volume de 10x *Turbo DNase Buffer*, 1 µL de *Turbo DNase*, seguindo-se incubação de 30 min, a 37 °C. Logo após, foram acrescentados 3 µL ou 10% do volume do reagente de inativação de *DNase*, seguindo-se incubação de 2 min em temperatura ambiente, período durante o qual as amostras foram agitadas 2 a 3 vezes. Após centrifugação a 10.000 x g por 2 min, o sobrenadante contendo o RNA (20 µL) foi transferido para um novo *ependorf*.

3.4. Reação de Transcriptase Reversa - RT-PCR

A concentração de RNA foi determinada por leitura da absorbância a 260 nm em espectrofotômetro (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA) e o RT-PCR realizado com 1 µg de RNA total, utilizando 1 µL de oligonucleotídeos randômicos (50 µg/µL) e 1 µL de dNTPs 10 mM (ThermoFisher, Waltham, CA, EUA), em reação com volume final de 13 µL ajustado com H₂O/DEPC. As amostras foram aquecidas por 5 min a 65 °C e, a seguir, transferidas para cuba com gelo, adicionando-se 4 µL de tampão para PCR (5x), 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de inibidor de ribonuclease (40 U/µL) e 1 µL da enzima *Superscript III* (200 U/µL, ThermoFisher, Waltham, CA, EUA), para um volume final de 20 µL. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, incubada por 5 min a 25 °C, e em seguida por 50 min a 50 °C. A reação foi interrompida por incubação a 70 °C por 15 min. O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações subsequentes de PCR quantitativo.

3.5. PCR Quantitativo

Para os ensaios multiplex de PCR quantitativo simultâneo para até 4 genes (*Taqman*), foram preparadas soluções contendo os *primers* e sondas para *per1b*, *cry1b* e RNA ribossômico 18S (RNA 18S) ou para *per2*, *cry1a* e RNA 18S (Tabela 1), Supermix 2X (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA ou ThermoFisher, Waltham, CA, EUA) suplementado para 400 µM de dNTPS, 6 mM de MgCl₂ e 0,1 U/µL de Platinum Taq DNA polimerase (ThermoFisher, Waltham, CA, EUA). Esta solução foi alíquotada (87 µL, sendo cada alíquota suficiente para 3 poços) em tubos, e o cDNA de cada amostra adicionado (3 uL/alíquota). As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa de experimento (28 µL/poço). Controles negativos sem cDNA foram incluídos rotineiramente. As concentrações finais dos primers foram de 300 nM para os genes de interesse e 200 nM para RNA 18S; para os probes, utilizou-se 200 nM para os genes de interesse e 50 nM para RNA 18S.

Para as reações de PCR quantitativo pela tecnologia *SYBR*[®] *GreenER*[™] para os genes *hsp90 aa1*, *hsp90 ab1*, *bmal1a*, *bmal1b*, *bmal2*, *trpA1a*, *trpA1b*, *trpV1/2*, *trpV4*, *trpM2*, *trpM4a*, *trpMb/c*, *trpM5*, *trpC6* e RNA 18S, foram preparadas soluções contendo os *primers* (Tabela 1), Kapa *SYBR*[®] Fast qPCR Master Mix 2X (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA) e H₂O DNaseRNase-free (ThermoFisher, Waltham, CA, EUA), obtendo-se uma concentração final de 300 nM para os *primers* de genes de interesse e 50 nM para os *primers* do RNA 18S em soluções independentes. Cada solução foi alíquotada (44 µL, sendo cada alíquota suficiente para 2 poços) em tubos e o cDNA de cada amostra adicionado (2 µL/alíquota). As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa experimental (20 µL/poço).

Todos os ensaios, tanto com a metodologia *SYBR*[®] *GreenER*[™] como com a metodologia *TaqMan*[®], foram realizados em um termociclador i5 (BioRad, Hercules,

CA, EUA) nas seguintes condições: *SYBR*[®] *GreenER*[™] - 10 min a 95 °C, seguido por 45 ciclos de 15 seg a 95 °C, 1 min a 60 °C e 80 ciclos de 10 seg a 55 °C, com aumento gradual de 0,5 °C; *TaqMan*[®] – 7 min a 95 °C, seguido por 45 ciclos de 30 seg a 95 °C e 30 seg a 55 °C.

O par de *primers* e a sonda específicos para cada gene (Tabela 1) foram desenhados usando o programa *Primer Express* (ThermoFisher, Waltham, CA,EUA) ou *Primer Blast* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome), baseados nas sequências obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>), e sintetizados por IDT (Coralville, IO, EUA ou ThermoFisher, Waltham, CA, EUA). Os *primers* cruzaram íntrons sempre que estes estivessem presentes no gene. Foi utilizado como normalizador (*house-keeping gene*) dos experimentos RNA ribossômico 18S conforme amplamente utilizado na literatura (Goidin *et al.*, 2001; Schmid *et al.*, 2003; Aerts *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005; Mccurley e Callard, 2008).

Tabela 1. Sequências e concentrações de *primers* e sondas para os ensaios de PCR quantitativo

<i>Templates</i>	<i>Sequências</i>	<i>Seletividade</i>	<i>Concentração Final</i>
RNA 18S (X03205.1)	For: 5'- CGGCTACCACATCCAAGGAA - 3'	Todos os vertebrados	50 nM
	Rev: 5'- GCTGGAATTACCGCGGCT - 3'		50 nM
	Probe:5'- /5TexRd/TGCTGGCACCAGACTTG CCCTC/3BHQ_2/-3'		50 nM
<i>perl</i> (AY597250 ou M_212439.2)	For: 5'- AGCTCAAACCTCTCACAGCCCTT - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- TCAGAGCTGGCACTCAACAGA -3'		300 nM
	Probe:5'- /5Cy5/TCCACCCAGCAGTTCTCTG GCATACA/3BHQ_2/-3'		200 nM

MATERIAL E MÉTODOS

<i>cry1b</i> (NM_131790.4)	For: 5'- CGTCTCTGGAGGAGCTCGG - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- TCTCCCCCGGGCCAC - 3'		300 nM
	Probe:5'- /5HEX/TTTGAAACAGAGGGACTG TCCACTGCTG/3BHQ_1/-3'		200 nM
<i>per2</i> (ENSDARG00000034503)	For: 5'- GTGGAGAAAGCGGGCAGC - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- GCTCTTGTTGCTGCTTTCAGTTCT - 3'		300 nM
	Probe:5' /6FAM/ATGGGTTTCAGGATCAAAC CGCTGT/3BHQ_1/3'		200 nM
<i>cry1a</i> (ENSDAR000000045768)	For: 5'- CTACAGGAAGGTCAAAAAGAAC AGC - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- CTCCTCGAACACCTTCATGCC - 3'		300 nM
	Probe:5'- /5HEX/AAAGCGTGGGTTGTTTGT AGCAGC/3BHQ_1/-3'		200 nM
<i>hsp90 aa1</i> (NM_131328.1)	For: 5'- CTCTTCACCGAACTGGCAGA - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- CCTCCAGACCAGCTTTACGG - 3'		300 nM
<i>hsp90 ab1</i> (NM_131310.3)	For: 5'- ATCGTGACCAGCACTTACGG - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- GGGGGAATGTCTTCAGGAGC - 3'		300 nM
<i>bmal1a</i> (NM_131577.1)	For: 5'- GGATCTGGCCACAGGTGAAA - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5' - TTTTATCCGGCCCTGCTGTT - 3'		300 nM
<i>bmal1b</i> (BC134895.1)	For: 5'- CGTGTCAGAAAGCCTCAGGA - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- CTGTGTGAGCTGTGAGCTTG - 3'		300 nM
<i>bmal2</i> (BC128806.1)	For: 5'- AAGCAGCTATGGCGGTCATT - 3	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- ATGCCAACGGGGTAGAAGTG - 3'		300 nM
<i>trpA1a</i> (AY677196.1)	For: 5'- GAGTGTACGAGAGCTGCTTAAT - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM

MATERIAL E MÉTODOS

	Rev: 5'- GACCTGACCAACCTCTGTAATC - 3'		300 nM
<i>trpA1b</i> (EU826642.1)	For: 5' - GGGAACACAGCCCTTCATATAG - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- GTCCACTTCATCTCCAGGTATTT - 3'		300 nM
<i>trpV1/2</i> (EU423314.1)	For: 5'- GCTCGTCTTTGTATGACCTCTC- 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- TTGGACGCTTCCTTACCATATC - 3'		300 nM
<i>trpV4</i> (NM_001042730.1)	For: 5- GCTGTTGACCATCTGCCCTA -3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5- TTGCCCACAGTGACCATCTC - 3'		300 nM
<i>trpM2</i> (NM_001288817.1)	For: 5- GACCCTTGTGCAAACACTCG - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- TTTGATGGCCTCATCGCAGT - 3'		300 nM
<i>trpM4a</i> (NM_001288815.1)	For: 5'- GGGAGGAGAGAGAAAAGCCC - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- GGAGGGGTGTCTGAATGACAG - 3'		300 nM
<i>trpM4b/c (ou b.2)</i> (XM_009306415.1)	For: 5'- GAGCGGTCGAGTCAGAGATG - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- CCTGTAGGAGCAGGATGAAGC - 3'		300 nM
<i>trpM5</i> (NM_001128239.1)	For: 5'- TCTACCAAAAACCTTCCAGCGG - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- AAGGGTGCTCACATCGTCTG - 3'		300 nM
<i>trpC6</i> (NM_001030282.1)	For: 5'- CCTGGGTCATAGGGATGATTTG - 3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'- GGCCAGAAAGACTAGGATGAAG - 3'		300 nM

For=*primer forward*; Rev=*primer reverse*; Probe=*sonda fluorescente*.

3.6. Análise Estatística

A análise dos dados foi feita pela comparação entre ciclos de amplificação (C_{TS}) dos poços controle e experimentais, obtida entre as porções de crescimento geométrico das curvas, passando-se uma reta denominada limiar que cruza essas porções. Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta limiar (C_T), foi encontrado o ΔC_T que é a diferença entre o valor do gene de interesse e do RNA 18S. A seguir, foram subtraídos os valores encontrados para os poços experimentais daqueles dos poços controle, obtendo-se o $\Delta\Delta C_T$. Colocando-se esse valor como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), obteve-se a expressão relativa ao respectivo controle. Os resultados originados de, no mínimo, dois experimentos independentes, cada um com $n=3$, estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (SEM).

Antes do emprego de análise estatística, foi realizado teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Entre os diferentes tempos em uma mesma condição, ou entre diferentes condições em um mesmo ponto temporal, os dados em log foram comparados por *Two-way* ANOVA, seguida pelo pós-testes de Tukey ou de Bonferroni respectivamente. Para a comparação da expressão de *hsp90 aal* entre os grupos mantidos em DD e LD, submetidos ao pulso de temperatura, no ponto 1 hora, foi realizado o teste *t* de Student não pareado com correção Welch. Nos protocolos nos quais o inibidor BCTC foi empregado, a análise estatística foi feita por *One-way* ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey. Em todos os testes utilizamos $p \leq 0,05$ para rejeição da hipótese nula, através o software GraphPad Prism 6.

Resultados

“A maior recompensa pelo nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma.”

John Ruskin

4. RESULTADOS

4.1. Identificação de Canais TRP em Células Embrionárias ZEM-2S

A família dos canais TRP em mamíferos já está bem descrita na literatura, porém, o papel fisiológico de cada integrante desta grande família e suas subfamílias continua sendo tema de pesquisas em vários centros de estudo no mundo. Uma das funções descritas para alguns canais TRP é sua responsividade a estímulos térmicos. Portanto, de acordo com a proposta do nosso trabalho, o primeiro passo foi identificar a presença de canais TRP no nosso modelo celular, principalmente os relacionados à detecção de temperatura, tendo em vista que o peixe *Danio rerio* expressa tais canais em seu genoma (Saito e Shingai, 2006); entretanto sua expressão na fase embrionária, aqui representada pelo modelo ZEM-2S, ainda é desconhecida.

A Tabela 2 contém os resultados obtidos por PCR quantitativo para os genes dos seguintes canais TRP: *trpA1a*, *trpA1b*, *trpV1/2*, *trpV4*, *trpC6*, *trpM2*, *trpM4a*, *trpM4b/c* e *trpM5*, a partir de cDNA de células ZEM-2S. Considerando-se como indicador aceitável de expressão valores abaixo de 35 ciclos de amplificação, podemos afirmar que todos os canais TRP investigados encontram-se expressos nas células ZEM-2S.

Tabela 2. Resultados obtidos na identificação dos canais TRP em células ZEM-2S através de PCR quantitativo

Canal TRP	Cts
<i>trpA1a</i>	33.36
<i>trpA1b</i>	31.08
<i>trpV1/2</i>	31.17

<i>trpV4</i>	31.48
<i>trpC6</i>	28.68
<i>trpM2</i>	30.55
<i>trpM4a</i>	32.30
<i>trpM4b/c</i>	29.04
<i>trpM5</i>	32.77

4.2. Expressão de *hsps* e de Genes do Relógio em Células ZEM-2S Mantidas em Escuro Constante e Submetidas a um Pulso de 33 °C

Como já citado anteriormente neste trabalho, a exposição a temperaturas elevadas pode desencadear um processo de resposta ao estresse, que tem início com a ativação do fator de transcrição HSF que, por sua vez, desencadeia a síntese de proteínas HSPs (Anckar e Sistonen, 2007). Para validar que a estimulação aguda de temperatura aplicada nas células ZEM-2S é percebida, avaliamos a expressão dos genes das HSPs do subtipo 90, as quais sabidamente aumentam imediatamente após a elevação da temperatura.

De fato, a expressão do gene *hsp90 aa1* (Figura 9 A) apresentou um aumento de aproximadamente 20 vezes em relação ao seu respectivo controle ($p \leq 0,0001$) uma hora após o estímulo térmico. O transcrito decaiu no ponto de duas horas a um valor relativamente maior do que o seu respectivo controle, porém sem diferença estatística, retornando a níveis próximos do controle 4 horas após o final da estimulação, caracterizando um perfil transitório e agudo na expressão deste gene em resposta ao pulso de temperatura. Por outro lado, a expressão do gene *hsp90 ab1* não foi alterada após o pulso de 33° C (Figura 9 B).

Figura 9. PCR quantitativo dos genes *hsp90 aa1* (A) e *hsp90 ab1* (B) em células ZEM-2S de *Danio rerio*. Para os resultados expressos nesta e nas Figuras 10 a 12, as células foram mantidas por 6 dias em escuro constante (DD) e, no início do 7º dia, submetidas a um pulso de 33 °C, com 1 hora de duração. O RNA total foi extraído 1, 2 e 4 horas após o final do estímulo. Barras escuras representam os grupos que receberam o estímulo e as barras claras representam os seus respectivos controles mantidos a 28 °C durante todo o experimento. Os valores são apresentados como a média ($n = 3 - 6$) $\pm$ EPM de expressão do gene de interesse normalizado por RNA 18S e expressos relativos ao menor valor do grupo controle. A análise estatística foi feita por *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

Sabe-se que ciclos de temperatura atuam como sincronizadores da expressão de genes de relógio em larvas de *Danio rerio* (Lahiri *et al.*, 2005), mas não há dados na literatura sobre o efeito de pulsos térmicos. Assim, avaliamos o efeito agudo do pulso de temperatura em células ZEM-2S mantidas em escuro constante. Para tanto, aplicamos o mesmo protocolo experimental utilizado nos experimentos voltados para determinação da expressão gênica das HSPs. A expressão dos genes de relógio *bmal1a*, *bmal1b* e *bmal2* (Figura 10 A, B, C), *cry1a* e *cry1b* (Figura 11 A e B), *per1* e *per2* (Figura 12 A e B) não foi alterada após o pulso de temperatura.

Figura 10. PCR quantitativo dos genes de relógio *bmal1a* (A), *bmal1b* (B) e *bmal2* (C) em células ZEM-2S de *Danio rerio* submetidas a pulso de temperatura em DD (n=3-6).

Figura 11. PCR quantitativo dos genes de relógio *cry1a* (A) e *cry1b* (B) em células ZEM-2S de *Danio rerio* submetidas a pulso de temperatura em DD (n=3-6).

Figura 12. PCR quantitativo dos genes de relógio *per1* (A) e *per2* (B) em células ZEM-2S de *Danio rerio* submetidas a pulso de temperatura em DD (n=3-6).

4.3. Expressão de *hsps* e de Genes do Relógio em Células ZEM-2S Mantidas em Ciclos Claro-escuro e Submetidas a um Pulso de 33 °C

Sabe-se que culturas de células de *Danio rerio* podem ser sincronizadas por um pulso de luz ou por ciclos claro-escuro (Whitmore *et al.*, 2000; Farhat *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2014). Tendo em vista que, nos experimentos anteriores, foi observado que o pulso de temperatura não exerceu nenhum efeito na expressão dos genes de relógio, e que no ambiente natural os peixes são expostos a altas temperaturas na mesma fase em que à luz, nosso próximo passo foi avaliar os mesmos genes do protocolo em DD após o pulso de 33 °C em células submetidas a ciclos claro-escuro (LD 12:12).

Semelhante ao que aconteceu em células mantidas em DD, uma hora após o pulso de temperatura observou-se um aumento da expressão do gene *hsp90 aa1* em células mantidas em LD, mas agora também no ponto de 2 horas após o final do estímulo. A expressão deste gene no ponto de 1 hora foi maior quando comparado aos demais ($p \leq 0,001$) e no ponto 2 horas foi maior quando comparado ao ponto de 4 horas ($p \leq 0,001$) (Figura 13 A), quando retornou a valores iguais ao seu respectivo controle. Assim, em LD também se nota um perfil de ativação transitório e agudo, porém persistindo por um

período maior de tempo do que quando o estímulo foi aplicado em células mantidas em DD. Conforme demonstrado para *hsp90 ab1* em DD, a expressão deste gene também não se alterou nas células submetidas ao pulso de temperatura em LD (Figura 13 B).

Figura 13. PCR quantitativo de *hsp90 aa1* (A) e *hsp90 ab1* (B) em células ZEM-2S de *Danio rerio*. Os resultados expressos nesta e nas Figuras 14 a 16 foram obtidos em células submetidas a ciclos claro-escuro (LD 12:12) durante 6 dias, com aplicação de um pulso de 33 °C, com 1 hora de duração, no início do 7º dia. O RNA total foi extraído 1, 2 e 4 horas após o final do pulso de temperatura. Barras escuras representam os grupos que receberam o estímulo e as barras claras representam os seus respectivos controles mantidos a 28 °C durante todo o experimento. Os valores são apresentados como a média ($n = 3 - 6$) $\pm$ EPM de expressão do gene de interesse normalizado por RNA 18S e expressos relativos ao menor valor do grupo controle. As diferenças entre os grupos que receberam o pulso em relação aos seus respectivos controles foram analisadas por *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni.

É interessante notar que em LD a expressão de *hsp90 aa1*, no ponto uma hora, foi duas vezes menor quando comparada a sua expressão no mesmo ponto temporal em DD (Tabela 3), fato que demonstra um efeito antagônico do ciclo claro-escuro à resposta evocada pelo pulso de temperatura.

Tabela 3. Comparação dos valores para o gene *hsp90 aa1* em células ZEM-2S estimuladas com pulso de temperatura em DD e em LD (teste *t* de Student).

Gene	Tempo	Média em DD	Média em LD	Significância
<i>hsp90 aa1</i>	1 hora	$18,65 \pm 3,134$	$9,031 \pm 1,069$	$p \leq 0,05$

Em seguida, avaliamos o efeito do choque de temperatura sobre a expressão de genes de relógio em células mantidas em LD. Nossos dados demonstram que nenhum efeito do pulso de temperatura foi observado para os seguintes genes: *bmal1a*, *bmal1b* e *bmal2* (Figura 14 A, B, C), como também para *cry1a* e *cry1b* (Figura 15 A e B).

Figura 14. PCR quantitativo dos genes de relógio *bmal1a* (A), *bmal1b* (B) e *bmal2* (C) em células ZEM-2S de *Danio rerio* submetidas a pulso de temperatura em LD (n=3-5).

Figura 15. PCR quantitativo dos genes de relógio *cry1a* (A) e *cry1b* (B) em células ZEM-2S de *Danio rerio* submetidas a pulso de temperatura em LD (n = 3 – 4).

Semelhante ao observado para *per1* em DD, o pulso de temperatura não teve efeito sobre a expressão de *per1* em células mantidas em LD (Figura 16 A). Já *per2*, diferentemente do perfil apresentado em DD, teve sua expressão significativamente aumentada em LD 1 ($p \leq 0,05$) e 2 horas ($p \leq 0,01$) após o pulso, em relação aos respectivos controles (Figura 16 B). Estes dados demonstram que *per2* foi responsivo ao pulso de temperatura quando as células foram sincronizadas pelos ciclos claro-escuro.

Figura 16. PCR quantitativo dos genes de relógio *per1* (A) e *per2* (B) em células ZEM-2S de *Danio rerio* submetidas a pulso de temperatura em LD (n = 3 – 4).

4.4. Expressão Gênica de *hsp90 aa1* e *per2* após Bloqueio do Canal TRPV1 por BCTC

Nos experimentos anteriores comprovamos que células ZEM-2S, mantidas em DD e submetidas a um pulso de 33 °C, apresentaram aumento agudo da expressão do gene *hsp90 aa1*, uma hora após o final do pulso. Dada a evidência da expressão do canal TRPV1 no nosso modelo e que dados da literatura comprovam que em *Danio rerio* esse canal é ativado por temperaturas acima de 32 °C (Gau *et al.*, 2013), lançamos mão de ferramentas farmacológicas para inibição do canal.

A Figura 17 demonstra que o efeito induzido pelo pulso de temperatura na expressão do gene *hsp90 aa1* em células ZEM-2S em DD não foi modificado pela inibição do canal TRPV1.

Figura 17. PCR quantitativo do gene *hsp90 aa1* em células ZEM-2S de *Danio rerio* após tratamento com inibidor do canal TRPV1. As células foram mantidas por 6 dias em escuro constante (DD) e, no início do 7º dia, submetidas a um pulso de 33 °C, com 1 hora de duração. O BCTC, assim como o DMSO, foram adicionados ao meio 30 minutos antes do início do pulso, permanecendo até o final do ensaio. O RNA total foi extraído 1 hora após o final do pulso de temperatura. Os valores são apresentados como a média ($n = 3 - 6$) $\pm$ EPM de expressão do gene de interesse normalizado por RNA 18S e expressos relativos ao menor valor do grupo controle. *One-way* ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Apesar de nossos dados indicarem que TRPV1 não participaria como o termossensor que leva ao aumento da expressão de *hsp90 aa1*, demonstramos que as células ZEM-2S mantidas em ciclos claro-escuro (12:12) e submetidas ao pulso de 33 °C apresentaram um aumento mais pronunciado da expressão do gene *per2* duas horas após o estímulo. Diante disso, fizemos uso do bloqueador de canal TRPV1 para investigar se o mesmo estaria envolvido nesse fenômeno. Conforme demonstrado na Figura 18, podemos afirmar que o canal TRPV1 participa, embora de forma parcial, na indução do aumento da expressão do gene *per2*, tendo em vista que o bloqueio do mesmo provocou um decaimento significativo na resposta deste gene. O bloqueio não foi total, pois existe uma diferença estatística entre controle e pulso com BCTC.

Figura 18. PCR quantitativo do gene de relógio *per2* em células ZEM-2S de *Danio rerio* após tratamento com inibidor do canal TRPV1. As células foram submetidas a ciclos claro-escuro (LD 12:12) durante 6 dias, com aplicação de um pulso de 33 °C, com 1 hora de duração, no início do 7º dia. O BCTC, assim como o DMSO, foram adicionados ao meio 30 minutos antes do início do pulso. O RNA total foi extraído 2 horas após o final do pulso de temperatura. Os valores são apresentados como a média ($n = 3 - 4$) $\pm$ EPM de expressão do gene de interesse normalizado por RNA 18S e expressos relativos ao menor valor do grupo controle. *One-way* ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Discussão

“Se você não pode explicar algo de forma simples, então você não entendeu muito bem o que tem a dizer.”

Einstein

5. DISCUSSÃO

A habilidade de termossensação é de extrema importância para a sobrevivência dos seres vivos, permitindo que os mesmos mantenham a homeostase através da escolha de ambientes que possuam uma temperatura que não seja capaz de provocar danos ao organismo. O peixe *Danio rerio* normalmente é encontrado em ambientes de águas rasas, local que possui como característica estar exposto a grandes variações de temperatura e luminosidade ao longo do dia (López-Olmeda e Sánchez-Vázquez, 2011). A temperatura (Buhr *et al.*, 2010), assim como a luz (Farhat *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2014), pode servir de pista ambiental para que o organismo ajuste sua fisiologia às alterações do ambiente externo. De fato, essa relação foi proposta anos atrás quando o pesquisador Colin Pittendrigh propôs a teoria da “fuga da luz”, onde altas temperaturas são encontradas durante a fase onde há maior incidência de luminosidade (Pittendrigh, 1993). Assim estes dois fatores, luz e temperatura, atuam como entidades ambientais que têm empiricamente os mesmos efeitos sobre relógios biológicos.

Recentemente essa teoria voltou a ser considerada quando Shen e colaboradores demonstraram a participação de opsinas na termodiscriminação: animais mutantes sem rodopsina, mantidos em escuro constante, perderam a capacidade de discriminar a temperatura, sendo que a termossensibilidade foi restaurada pela transfecção do fotorpigmento melanopsina (Shen *et al.*, 2011).

Podemos afirmar que as células ZEM-2S são um excelente modelo para investigação da validação desta teoria, visto que estas células expressam opsinas que são sabidamente responsáveis pela percepção de luz (Farhat *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2014) e teoricamente pela percepção de temperatura, além da expressão de diversos membros da família dos canais TRPs descritos aqui. Em mamíferos, onde a variação na

temperatura interna não ultrapassa a faixa de 1 a 2 graus, seria plausível pensar que a ativação de opsinas, em ação conjunta com canais TRP, seria o principal evento responsável pela detecção de variações térmicas. Ciclos de temperatura com variação de 2,5 graus (36-38,5 °C; LD 12:12) promoveram modificação nos parâmetros rítmicos em explante de pulmão e cultura de fibroblastos de camundongos (Buhr *et al.*, 2010). Por outro lado, animais ectotérmicos, que são expostos a gamas de temperatura muito mais amplas, poderiam perceber estímulos térmicos através de alteração da fluidez da membrana o que, provavelmente, provocará a abertura de canais termoTRPs (Bromberg *et al.*, 2013), promovendo o influxo não seletivo de íons, os quais poderão ativar diversas cascatas intracelulares, inclusive as envolvidas na transcrição de genes do relógio.

O pulso de temperatura não alterou a expressão dos genes de relógio quando as células ZEM-2S foram mantidas em DD. Mas constatamos que o estímulo térmico foi percebido, haja vista o aumento pronunciado da expressão do gene *hsp90 aa1*. Dados na literatura demonstram que, em células PAC-2 originárias de *Danio rerio* e mantidas em ciclos de temperatura, alterações na expressão de genes do relógio só são observadas 9 horas após o final da fase de temperatura mais alta do ciclo (Lahiri *et al.*, 2005). Tendo em vista que o propósito do nosso trabalho era avaliar somente o efeito agudo do pulso, não podemos descartar que o estímulo aplicado possa ter provocado a alteração da expressão de algum dos genes do relógio em horários posteriores aos escolhidos. Além disso, a duração de pulso adotada em nosso protocolo experimental foi de uma hora; talvez uma duração maior ou uma frequência maior de aplicação (p. ex., pulsos diários por 3 dias) possam ser futuramente considerados.

Em um trabalho em que se buscava analisar os níveis de expressão de *hsp90 α (aa1)* e *hsp90 β(ab1)* durante os estágios de embriogênese de *Danio rerio* após um

pulso de 34 °C com duração de uma hora, Krone e Sass comprovaram que a temperatura promoveu um aumento da expressão somente do gene da *hsp90 α* , logo após o final do estímulo (Krone e Sass, 1994). Já Murtha e Keller (2003) realizaram um trabalho no intuito de caracterizar a resposta ao choque térmico em *Danio rerio* adulto (3 meses), através de um pulso de 37 °C com duração de 30 minutos, avaliando a expressão dos genes *hsp90 α 1*, *hsp90 α 1* e *hsp70* em amostras provenientes do cérebro, fígado e músculo em vários pontos temporais, 5, 10, 20, 30 min; 1, 2 e 4 h (Murtha e Keller, 2003). Em nenhum dos tecidos analisados foi encontrado aumento da expressão dos genes *hsp90 α 1* e *hsp90 α 1*, somente do gene *hsp70*, fato que, segundo os autores, pode estar relacionado à perda da resposta da expressão gênica das *hsp90* ocasionada pelo envelhecimento celular (Murtha e Keller, 2003). As células ZEM-2S são embrionárias, o que poderia explicar o aumento agudo da expressão de *hsp90 α 1* após o estímulo térmico, tanto em DD como em LD. Adotando outro modelo de estudo, Meng e colegas (1993) demonstraram que o gene *hsp90 α* em cultura celular proveniente de aves não é responsivo a elevadas temperaturas, enquanto que o gene *hsp90 α* apresenta um grande aumento em sua expressão. Dados não publicados do nosso grupo comprovam que ambos os genes *hsp90* são induzíveis por calor em melanócitos Melan-a de mamíferos (M.N. Moraes, comunicação pessoal). Nossos resultados, aliados aos descritos na literatura, fortalecem a hipótese de que a responsividade do gene *hsp90 α* a estresse térmico pode ter se desenvolvido somente mais tarde ao longo da evolução dos vertebrados.

Quando mantidas em ciclo LD, também observamos um aumento da expressão do gene *hsp90 α 1* uma hora após estímulo térmico, porém quando comparados aos resultados em DD, detectamos que o aumento da expressão gênica foi significativamente menor. Interessantemente, demonstramos pela primeira vez em

Danio rerio efeitos antagônicos da luz branca e temperatura. Nesta linha, nosso laboratório evidenciou que, em melanócitos e melanomas murinos, os efeitos induzidos pela radiação UVA, como aumento do conteúdo de melanina e ativação de genes do relógio, são antagonizados pelo aumento de temperatura (de Assis *et al.*, submetido). Apesar da diferença dos estímulos fóticos entre luz branca e radiação UVA, os resultados estão em concordância, o que reforça nossa recente descoberta relativa aos efeitos antagônicos de estímulos fóticos e térmicos. Estes resultados reforçam a hipótese de que, como luz e altas temperaturas estão presentes na natureza de forma concomitante, seus efeitos, ao invés de sinérgicos ou somatórios, seriam antagônicos de modo a mitigar eventuais efeitos individuais deletérios. Diante desse raciocínio, as respostas fisiológicas evocadas por estes dependeriam da intensidade de cada estímulo. Além disso, se as respostas fossem sinérgicas os efeitos desencadeados por esses estímulos, uma vez que são apresentados de forma concomitante, poderiam ser danosos a homeostase celular.

O aumento concomitante do gene *hsp90 aal* e do gene de relógio *per2* em células mantidas em LD pode evidenciar uma relação entre a geração de ritmos circadianos e a expressão de HSP, os quais podem possuir uma via de ativação comum nas células ZEM-2S. Sabe-se da literatura que o estímulo térmico provoca a dissociação do complexo HSP90/HSF1 permitindo que HSF1 livre possa migrar para o núcleo e ativar a transcrição de genes que possuam a sequência HSE (HSE – *Heat Shock Elements*) em seus promotores. Existem relatos da presença de HSE no gene *Per2* em várias espécies de mamíferos (Kornmann *et al.*, 2007; Tamaru *et al.*, 2011; Chappuis *et al.*, 2013). Desta forma, a ativação de HSF1 estaria relacionada a dois eventos fisiológicos: (1) exercendo um efeito de proteção contra choques térmicos através da ativação de HSPs e interação com BMAL1, resultando em manutenção da expressão

dos genes de relógio; (2) ativando componentes do relógio como, por exemplo, *Per2* através de HSE, auxiliando na sincronização da maquinaria molecular e/ou no controle de importantes genes controlados pelo relógio.

O fato de não termos observado o aumento da transcrição do gene *per2* em DD em resposta ao estímulo térmico (via HSF1) poderia ser explicado pela situação de desacoplamento celular. Quando as células são colocadas em cultura sem a aplicação de um *zeitgeber* (p. ex., ciclo claro-escuro) podem se tornar dessincronizadas, e as expressões de genes em células individuais passam a exibir diferentes fases e amplitudes, implicando em uma resultante nula de oscilação da população (Welsh *et al.*, 1995; 2004). *In vitro*, vários estímulos têm sido descritos como sincronizadores da população celular, tais como choque de soro (Balsalobre *et al.*, 1998), trocas de meio (Yamazaki *et al.*, 2000), éster de forbol (TPA) (Akashi e Nishida, 2000), glicocorticoides (Balsalobre *et al.*, 2000), endotelina (Nakahata *et al.*, 2006) e luz (Farhat *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2014). A comprovação de que as células ZEM-2S podem ser sincronizadas por luz deu-se em um trabalho anterior do nosso grupo no qual se demonstrou que, quando mantidas em cultura, em ciclos claro-escuro, estas células passavam a apresentar um perfil circadiano da expressão dos genes *per1* e *cry1b* (Farhat *et al.*, 2009). Nossos dados evidenciam que o pulso de temperatura só foi capaz de promover alterações na expressão dos genes do relógio no sistema sincronizado por ciclo claro-escuro.

Outra relação entre HSP90 e genes do relógio foi proposta através do estudo de fibroblastos de ratos em cultura, onde a inibição farmacológica de HSP90 promoveu uma drástica redução na expressão de BMAL1, tendo como consequência direta uma alteração no funcionamento da maquinaria do relógio (Schneider *et al.*, 2014). Em adição, inibição farmacológica aguda ou crônica de HSF1 bloqueia a mudança de fase

na expressão de *Per2* em tecidos periféricos promovida pelo estímulo de temperatura, enquanto que no NSQ o bloqueio de HSF1 prejudica o mecanismo de compensação à temperatura (Buhr *et al.*, 2010). Reinke e colaboradores (2008) relatam outros dados que comprovam a relação da geração do ritmo circadiano e HSP: camundongos nocaute para HSF1 em livre curso (DD) possuem um período maior do que animais do tipo selvagem em mesmas condições.

Experimentos *in vitro* mostraram que, ao contrário do que é visto no relógio central, ciclos de temperatura externa podem manter a expressão rítmica de genes de relógio em fibroblastos Rat-1 de ratos e em culturas primárias de células gliais de ratos (Prolo *et al.*, 2005), assim como em relógios periféricos em ensaios *in vivo* (Brown *et al.*, 2002). No ano de 2010, o grupo do pesquisador Takahashi demonstrou, através de registros de bioluminescência em camundongos expressando o gene da luciferase sob o controle do promotor de *Per2*, PER2::LUC, que tecidos periféricos destes animais, mantidos em DD, são sensíveis a variação de temperatura. Está descrito na literatura que todos os genes do relógio identificados em *Danio rerio* são arrastados por luz, mas dois deles, *per2* e *cry1a*, são diretamente induzidos por luz (Vatine *et al.*, 2011). Nosso grupo comprovou a responsividade dos genes *per2* e *cry1a* a pulso de luz azul em células ZEM-2S em um trabalho anterior (Ramos *et al.*, 2014). Lahiri e colegas confirmaram em seu trabalho que ciclos de temperatura não induzem nenhuma mudança na expressão do gene *per2* em larvas de *Danio rerio*, ao contrário dos ciclos claro-escuro (Lahiri *et al.*, 2005). Os resultados do presente trabalho comprovam pela primeira vez que o gene *per2* pode ser induzido por um pulso de temperatura, fenômeno que se assemelha ao anteriormente demonstrado por Ramos e colaboradores (2014), indução de *per2* por pulso de luz azul.

Tendo, portanto, visto que as células ZEM-2S percebem calor através de expressão aumentada de *hsp 90 aa1*, e que esse evento promoveu aumento na expressão do gene *per2*, decidimos avaliar se havia a participação do canal TRPV1 nessa resposta. Muitos estudos atribuem ao canal TRPV1 a função de principal sensor de calor em várias espécies de vertebrados, sendo ativado por temperaturas quentes inócuas até aquelas que se tornam nocivas para o organismo. Ademais, estudos em camundongos TRPV1 nocaute mostraram que TRPV1 é necessário para a detecção de temperaturas acima de 43 °C neste modelo (Caterina *et al.*, 2000; Gracheva *et al.*, 2011; Ohkita *et al.*, 2012). O canal TRPV1 apresenta diferentes limiares de ativação térmica dependendo da espécie. Gracheva e colegas mostraram que variações nas sequências de aminoácidos de canal TRPV1 determinam o limiar de ativação térmica, por exemplo, em morcegos em torno de 30°C (Gracheva *et al.*, 2011). Ohkita e colaboradores concluíram que, em *Xenopus tropicalis*, a ativação de TRPV1 estaria restrita ao intervalo compreendido entre 22-28 °C (Ohkita *et al.*, 2012). Gau e colaboradores verificaram que as larvas de *Danio rerio* apresentavam a capacidade de termotaxia, a qual lhes permitia o deslocamento para ambientes com temperaturas mais confortáveis para o seu desenvolvimento (em torno de 28 °C), quando confrontadas com temperaturas acima de 32 °C. Esse fenômeno foi abolido quando o gene do ortólogo de TRPV1 foi deletado, levando a crer que o canal TRPV1 é ativado por temperaturas acima de 32 °C nesses organismos, sendo o principal responsável pelo mecanismo de detecção térmica de *Danio rerio* em sua fase de desenvolvimento (Gau *et al.*, 2013).

Antagonistas como capsazepina e AMG-9810, assim como o silenciamento gênico do TRPV1 via siRNA, diminuem a acumulação de 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). Diferentemente dos

resultados do estudo anterior, o bloqueio seletivo dos canais TRPV1 em nosso modelo celular não foi capaz de impedir o aumento da expressão do gene da *hsp90 aa1*, sugerindo que essas vias de sinalização evoluíram diferentemente ao longo da filogenia.

Nossos resultados, no entanto, demonstraram que a inibição do canal TRPV1 diminuiu parcialmente o aumento da expressão de *per2* induzido por pulso de temperatura nas células ZEM-2S mantidas em LD. Esta ação parcial pode ser resultado de uma interação do canal TRPV1 com outro canal TRP através da formação de um heterodímero, ou então quando na impossibilidade de ativação do TRPV1, outro canal possa ser ativado redundantemente e desencadeie a cascata de ativação, resultando na transcrição do *per2*.

Canais TRP possuem a habilidade de formar complexos heteroméricos (Strübing *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2002; Hellwig *et al.*, 2005; Schaefer, 2005). Está bem documentado que a maioria, se não todos, os neurônios do gânglio da raiz dorsal de mamíferos que expressam TRPA1, co-expressam o TRPV1 (Story *et al.*, 2003; Bautista *et al.*, 2006), como também recentes estudos têm sugerido que TRPA1 e TRPV1 podem formar um complexo heteromérico em sistemas nativos e heterólogos (Salas *et al.*, 2009; Staruschenko *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2014), sendo o seu significado funcional e modulação ainda pouco conhecidos. Chen e colegas afirmam que o canal TRPA1 pode ter sua sensibilidade térmica alterada dependendo do acoplamento com outros canais TRP, como o TRPV1 e o TRPM8 (Chen *et al.*, 2015). A associação de canais TRPV1 e TRPM8 foi proposta em células HEK293; capsaicina (agonista do canal TRPV1; Takaishi *et al.*, 2015) e altas temperaturas (Chung *et al.*, 2011) promovem redução da expressão de TRPM8, enquanto que mentol (agonista do canal TRPM8) suprime a expressão do canal TRPV1 indicando que a estimulação térmica tem efeitos opostos sobre TRPV1 e TRPM8 (Takaishi *et al.*, 2015). Já Sadofsky

e colaboradores propõem que a co-expressão de TRPA1 e TRPV1 na mesma célula pode alterar a resposta destes canais (Sadofsky *et al.*, 2014). Possivelmente o fenômeno observado em nosso trabalho pode se assemelhar aos dados acima, revelando um possível envolvimento de um ou outro canal TRP nesse fenômeno. Aparentemente os canais que possuem funções relacionadas são os canais TRPV1, A1 e M8, entretanto as células ZEM-2S expressam apenas o canal TRPA1 e TRPV1, colocando o TRPA1 como um possível candidato a mediar o efeito da temperatura juntamente com o TRPV1, o que poderá ser comprovado com estudos posteriores.

Embora a identificação de qual canal forme heterodímero com TRPV1, mediando os efeitos da temperatura em células embrionárias de *Danio rerio*, ainda esteja em aberto, é inquestionável a relação do canal TRPV1 com a ativação da maquinaria molecular dos genes do relógio. Recentemente nosso grupo vem se mostrando pioneiro em demonstrar a relação de canais TRP e genes do relógio, não só em *Danio rerio*, mas também em tecidos relacionados ao metabolismo energético de mamíferos. O tecido adiposo marrom é um órgão que possui forte relação com a temperatura, uma vez que é responsável pela termogênese. Neste tecido, os genes do relógio apresentam um perfil oscilatório, o qual é drasticamente abolido em animais nocaute para o TRPV1 (Mezzalira, 2015, Moraes *et al.*, 2015a). No fígado, o mesmo perfil de oscilação é observado na expressão dos genes de relógio e, curiosamente em animais TRPV1 nocaute, a expressão destes genes foi diminuída, porém sem alterar o perfil oscilatório, demonstrando uma participação parcial deste canal (Moraes *et al.*, 2015b, Mezzalira, 2015). Interessantemente a resposta vista no fígado de camundongos é muito similar à observada aqui, em células ZEM-2S de *Danio rerio* através de inibição farmacológica.

Assim, hipotetizamos que o estímulo térmico percebido pelas células ZEM-2S poderia promover uma alteração na fluidez da membrana, o que por sua vez, levaria à abertura do canal TRPV1 possibilitando a entrada de cátions de forma não seletiva. Dentre as possibilidades, a concentração de cálcio intracelular seria aumentada em resposta à abertura do canal. Dados anteriores do grupo demonstraram que a sinalização por cálcio é chave para a ativação de genes do relógio, sendo que o cálcio ativa a via da CAMKII que recruta a via das MAPK em células ZEM-2S de *Danio rerio* (Ramos *et al.*, 2014). Por outro lado, esta mesma via poderia também promover a liberação de HSP90 do complexo HSP90/HSF1 permitindo que HSF1 se translocasse para o núcleo e ativasse a expressão tanto de *per2* quanto de *hsp90*. De fato, Bromberg e colaboradores (2013) demonstraram em células HEK293 que o uso de capsazepina e AMG-9810, ambos antagonistas de TRPV1, e tratamento com EGTA, bloqueiam o acúmulo de HSPs induzidas pelo estímulo térmico, colocando a sinalização de cálcio via TRPV1 como um passo chave na ativação de HSF1.

Os dados obtidos neste trabalho abrem uma nova perspectiva sobre a investigação da relação temperatura e genes de relógio, colocando um novo “ator” na regulação deste fenômeno: os canais TRPV1. O entendimento dos mecanismos de controle endógeno em resposta à temperatura em *Danio rerio* é de extrema importância, uma vez que estes animais habitam regiões de águas rasas e são constantemente expostos a uma ampla variação de temperatura. Esta condição ganha grande atenção nos dias atuais onde se evidencia um aumento médio da temperatura global a qual continuará a sofrer aumentos ao longo dos próximos anos. Entender como estes animais irão responder a esta nova condição poderá abrir perspectivas quanto a sua utilização como excelente modelo biomarcador.

Bibliografia

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

6. BIBLIOGRAFIA

- Abe, M., Herzog, E.D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., Block, G.D., 2002. Circadian rhythms in isolated brain regions. *J. Neurosci.* 22, 350-356.
- Abraham, U., Granada, A.E., Westermarck, P.O., Heine, M., Kramer, A., Herzog, H. 2010. Coupling governs entrainment range of circadian clocks. *Mol. Syst. Biol.* 6, 438.
- Aerts, J.L., Gonzales, M.I., Topalian, S.L. 2004. Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques* 36(1), 84-86,88,90-91.
- Akashi, M., Nichida, E. 2000. Involvement of the MAP kinase cascade in resetting the mammalian circadian clock. *Genes Dev.* 14(6), 645-649.
- Allada, R., Emery, P., Takahashi, J.S., Rosbash, M. 2001. Stopping time: the genetics of the mouse circadian clocks. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1091-1119.
- Anckar, J., Sistonen, L. 2007. Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.* 594, 78-88.
- Aschoff, J. 1965. Circadian rhythms in man. *Science* 148(3676), 1427-1432.
- Balligand, J.L. 2002. Heat shock protein 90 in endothelial nitric oxide synthase signaling: Following the lead(Er)? *Circ. Res.* 90, 838-841.
- Balsalobre, A., Damiola, F., Schibler, U. 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93, 929-937.
- Balsalobre, A., Marcacci, L., Schilber, U. 2000. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr. Biol.* 10, 1291-1294.

- Barrett, R.K., Takahashi, J.S. 1997. Lability of circadian pacemaker amplitude in chick pineal cells: a temperature-dependent process. *J Biol Rhythms*, 12(4):309-318.
- Bartell, P.A., Miranda-Anaya, M., Menaker, M. 2004. Period and phase control in a multioscillatory circadian system (*Iguana iguana*). *J. Biol. Rhythms* 19(1), 47-57.
- Bautista, D.M., Jordt, S.E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I., Julius, D. 2006. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124, 1269–1282.
- Bellono, N.W., Kammel, L.G., Zummerman, A.L., Oancea, E. 2013. UV light phototransduction activates transient receptor potential A1 ion channels in human melanocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 2383-2388.
- Bender, A.T., Silverstein, A.M., Demady, D.R., Kanelakis, K.C., Noguchi, S., Pratt, W.B., Osawa, Y. 1999. Neuronal nitric- oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J. Biol. Chem.* 274, 1472-1478.
- Bivik, C., Rosdahl, I., Ollinger, K. 2007. Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes. *Carcinogenesis* 28, 537–544.
- Bromberg, Z., Goloubinoff, P., Saidi, Y., Weiss, Y.G. 2013. 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* 8(2), e57149.
- Brown, S.A., Azzi, A. 2013. Peripheral circadian oscillators in mammals. *Handb. Exp. Pharmacol.* 217, 45-66.

- Brown, S.A., Zumbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., Schibler, U. 2002. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr. Biol.* 12, 1574-1583.
- Buchner, J. 1999. Hsp90 & Co. - A holding for folding. *Trends Biochem. Sci.* 24, 136-141.
- Buhr, E. D., Takahashi, J.S. 2013. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb. Exp. Pharmacol.* 217, 3-27.
- Buhr, E.D., Yoo, S.H., Takahashi, J.S. 2010. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science* 330, 379-385.
- Bunger, M.K., Wilsbacher, L.D., Moran, S.M., Clendenin, C., Radcliffe, L.A., Hogenesch, J.B., Simon, M.C., Takahashi, J.S., Bradfield, C.A. 2000. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103(7), 1009-1017.
- Cadepond, F., Schweizer-Groyer, G., Segard-Maurel, I., Jibard, N., Hollenberg, S.M., Giguère, V., Evans, R.M., Baulieu, E.E. 1991. Heat shock protein 90 as a critical factor in maintaining glucocorticosteroid receptor in a nonfunctional state. *J. Biol. Chem.* 266, 5834-5841.
- Cahill, G.M. 2002. Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.* 309(1), 27-34.
- Caplan, A.J. 1999. Hsp90's secrets unfold: New insights from structural and functional studies. *Trends Cell Biol.* 9, 262-268.
- Carr, A.J., Whitmore, D. 2005. Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods. *Nature Cell Biol.* 7(3), 319-321.
- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., Julius, D. 2000. Impaired nociception

- and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288(5464), 306-313.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389(6653), 816-824.
- Chappuis, S., Ripperger, J.A., Schnell, A., Rando, G., Jud, C., Wahli, W., Albrecht, U. 2013. Role of the circadian clock gene *Per2* in adaptation to cold temperature. *Mol. Metab.* 2, 184-193.
- Chen, R., Romero, G., Christiansen, M.G., Mohr, A., Anikeeva, P. 2015. Wireless magnetothermal deep brain stimulation. *Science* 347(6229), 1477-1480.
- Chinnathambi, S., Tomanek-Chalkley, A., Bickenbach, J.R. 2008. HSP70 and EndoG modulate cell death by heat in human skin keratinocytes in vitro. *Cells Tissues Organs* 187, 131–140.
- Chung, M.-K., Wang, S. 2011. Cold suppresses agonist-induced activation of TRPV1. *J. Dental Res.* 90(9), 1098–1102.
- Cosens, D.J., Maning, A. 1969. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224(5216), 285-287.
- Costa, A., Castanon-Cervantes, O., Menaker, M., Piccione, G., Caola, G. 2005. Daily rhythm of lactate dehydrogenase in the rat (*Rattus norvegicus*) carrying a *Per1*-luciferase transgene: assessment on serum and liver. *Vet. Res. Commun.* 29(2), 183-186.
- Davidson, A.J., London, B., Block, G.D., Menaker, M. 2005. Cardiovascular tissues contain independent circadian clocks. *Clin. Exp. Hypertens.* 27(2-3), 307-311.
- Davies, W.I., Zheng, L., Hughes, S., Tamai, T.K., Turton, M., Halford, S., Foster, R.G., Whitmore, D., Hankins, M.W. 2011. Functional diversity of melanopsins and

- their global expression in the teleost retina. *Cell Mol. Life Sci.* 68(24), 4115-4132.
- de Assis, L.V.M., Moraes, M.N., Castruci, A.M.L. 2016. Heat shock antagonizes UVA-induced responses in melanocytes and melanoma: an unexpected interaction. *Cancer Lett.*, submitted.
- DeBruyne, J.P., Noton, E., Lambert, C.M., Maywood, E.S., Weaver, D.R., Reppert, S.M. 2006. A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron* 50(3), 465-477.
- DeBruyne, J.P., Weaver, D.R., Reppert, S.M. 2007. CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nature Neurosci.* 10(5), 543-545.
- Dhaka, A., Viswanath, V., Patapoutian, A. 2006. Trp ion channels and temperature sensation. *Annu. Rev. Neurosci.* 29:135–161.
- Dibner, C., Schibler, U., Albrecht, U. 2010. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 517-549.
- Farhat, F.P., Martins, C.B., De Lima, L.H.R.G., Isoldi, M.C., Castrucci, A.M.L. 2009. Melanopsin and clock genes: regulation by light and endothelin in the zebrafish ZEM-2S cell line. *Chronobiol. Int.* 26(6), 1009-1119.
- Findlay, J.B., Pappin, D.J. 1986. The opsin family of proteins. *Biochem. J.* 238(3), 625-642.
- Fischer, M.J., Balasuriya, D., Jeggle, P., Goetze, T.A., McNaughton, P.A., Reeh, P.W., Edwardson, J.M. 2014. Direct evidence for functional TRPV1/TRPA1 heteromers. *Pflügers Archiv.-Eur. J. Physiol.*, 466(12), 2229-2241.

- Fowler, M.A., Montell, C. 2013. *Drosophila* TRP channels and animal behavior. Life Sci. 92(8-9), 394-403.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C. 1998. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. Nature 392, 821-824.
- Gau, P., Poon, J., Ufret-Vincenty, C., Snelson, C.D., Gordon, S.E., Raible, D.W., Dhaka, A. 2013. The zebrafish ortholog of TRPV1 is required for heat-induced locomotion. J. Neurosci. 33, 5249-5260.
- Goel, M., Sinkins, W.G., Schilling, W.P. 2002. Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. J. Biol. Chem. 277, 48303–48310.
- Goidin, D., Mamessier, A., Staquet, M.J., Schmitt, D., Berthier-Vergnes, O. 2001. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. Anal. Biochem. 295(1), 17-21.
- Gracheva, E.O., Bagriantsev, S.N. 2015. Evolutionary adaptation to thermosensation. Curr. Opin. Neurobiol. 34, 67-73.
- Gracheva, E.O., Cordero-Morales, J.F., González-Carcacía, J.A., Ingolia, N.T., Manno, C., Aranguren, C.I., Weissman, J.S., Julius, D. 2011. Ganglion-specific splicing of TRPV1 underlies infrared sensation in vampire bats. Nature 476(7358), 88-91.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., Cermakian, N. 2005. Differential control of *Bmal1* circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. J. Biol. Rhythms 20, 391–403.

- Hamilton, N., Diaz-de-Cerio, N., Whitmore, D. 2015. Impaired light detection of the circadian clock in a zebrafish melanoma model. *Cell Cycle* 14(8), 1232-1241.
- Hankins, M.W., Peirson, S.N., Foster, R.G. 2008. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci.* 31, 27-36.
- Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G., Schaefer, M. 2005. Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J. Cell Sci.* 118, 917–928.
- Heussen, R., Whitmore, D. 2015. The importance of stochastic effects for explaining entrainment in the zebrafish circadian clock. *Comp. Math. Methods Med.* 2015, 254979.
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., Gudermann, T. 2002. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7461–7466.
- Hughes, S., Hankins, M.W., Foster, R.G., Peirson, S.N. 2012. Melanopsin phototransduction: slowly emerging from the dark. *Prog. Brain Res.* 199, 19–40.
- Husse, J., Eichele, G., Oster, H. 2015. Synchronization of the mammalian circadian timing system: Light can control peripheral clocks independently of the SCN clock. *Bioessays* 37(10), 1119-1128.
- Isoldi, M.C., Rollag, M.D., Castrucci, A.M.L., Provencio, I. 2005. Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102, 1217-1221.
- Izumo, M., Pejchal, M., Schook, A.C., Lange, R.P., Walisser, J.A., Sato, T.R., Wang, X., Bradfield, C.A., Takahashi, J.S. 2014. Differential effects of light and feeding on circadian organization of peripheral clocks in a forebrain *Bmal1* mutant. *eLife* 3, e04617.

- Johnson, R.F., Moore, R.Y., Morin, L.P. 1998. Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res.* 460, 297-313.
- Khurana, N., Bhattacharyya, S. 2015. Hsp90, the concertmaster: tuning transcription. *Front. Oncol.* 5, 100.
- Kobayashi, Y., Ishikawa, T., Hirayama, J., Daiyasu, H., Kanai, S., Toh, H., Fukuda, I., Tsujimura, T., Terada, N., Kamei, Y., Yuba, S., Iwai, S., Todo, T. 2000. Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells* 5, 725-738.
- Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., Takahashi, J.S., Schibler, U. 2007. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol.* 5(2), e34.
- Krone, P.H., Sass, J.B. 1994. Hsp 90 α and Hsp 90 β genes are present in the zebrafish and are differentially regulated in developing embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204(2), 746-752.
- Kumbalasiri, T., Rollag, M.D., Isoldi, M.C., Castrucci, A.M., Provencio, I. 2007. Melanopsin triggers the release of internal calcium stores in response to light. *Photochem. Photobiol.* 83(2), 273-279.
- Lahiri, K., Vallone, D., Gondi, S.B., Santoriello, C., Dickmeis, T., Foulkes, N.S. 2005. Temperature regulates transcription in the zebrafish circadian clock. *Plos Biol.* 3(11), e351.
- Leach, M.D., Klipp, E., Cowen, L.E., Brown, A.J.P. 2012. Fungal Hsp90 - a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs. *Nature Rev. Microbiol.* 10, 693–704.

- Lee, Y., Montell, C. 2013. *Drosophila* TRPA1 functions in temperature control of circadian rhythm in pacemaker neurons. *J. Neurosci.* 33(16), 6716-6725.
- Lindquist, S., Craig, E.A. 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631-677.
- López-Olmeda, J.F., Sánchez-Vázquez, F.J. 2011. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *J. Therm. Biol.* 36, 91-104.
- Loros, J.J., Dunlap, J.C. 2001. Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora*. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 757-794.
- Lu, C., Chen, D., Zhang, Z., Fang, F., Wu, Y., Luo, L., Yin, Z. 2007. Heat shock protein 90 regulates the stability of C-Jun in HEK293 cells. *Mol. Cells* 24, 210-214.
- Mayer, M.P., Bukau, B. 1999. Molecular chaperones: The busy life of Hsp90. *Curr. Biol.* 9, 322-325.
- Mccurley, A.T., Callard, G.V. 2008. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Mol. Biol.* 9, 102.
- Menaker, M. 1972. Nonvisual light reception. *Sci. Am.* 226, 22-29.
- Meng, X., Jerome, V., Devin, J., Beaulieu, E.E., Catelli, M.C. 1993. Cloning of chicken hsp90b: The only vertebrate hsp90 insensitive to heat shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 630-636.
- Mezzalira, M. 2015. Efeito da luz e temperatura sobre a expressão dos genes do relógio em mamífero: tecidos periféricos como modelo de estudo. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

- Mieda, M., Sakurai, T. 2011. *Bmal1* in the nervous system is essential for normal adaptation of circadian locomotor activity and food intake to periodic feeding. *J. Neurosci.* 31(43), 15391-15396.
- Minke, B., Peters, M. 2011. Cell biology. Rhodopsin as thermosensor? *Science* 331(6022), 1272-1273.
- Mohawk, J.A., Green, C.B., Takahashi, J.S. 2012. Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu. Rev. Neurosci.* 35, 445-462.
- Montell, C., Rubin, G.M. 1989. Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2(4), 1313-1323.
- Moraes, M.N., dos Santos, L.R., Mezzalira, N., Poletini, M.O., Castrucci, A.M. 2014. Regulation of melanopsins and *Per1* by α -MSH and melatonin in photosensitive *Xenopus laevis* melanophores. *Biomed. Res. Int.* 654710.
- Moraes, M.N., Mezzalira, N., Menaker, M., Guler, A., Castrucci, A.M.L. 2015a. TRPV1 participates in the activation of clock molecular machinery in the brown adipose tissue in response to light-dark cycle. *J. Physiol.* (em preparação).
- Moraes, M.N., Mezzalira, N., Menaker, M., Guler, A., Castrucci, A.M.L. 2015b. TRPA1 transcription is altered in the absence of TRPV1: Clock molecular machinery regulation in *Mus musculus* liver. Abstracts of the L Congress of the Brazilian Society of Physiology, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil.
- Murtha, J.M., Keller, E.T. 2003. Characterization of the heat shock response in mature zebrafish (*Danio rerio*). *Exp. Gerontol.* 38, 683–691.

- Nakahata, Y., Akashi, M., Trcka, D., Yasuda, A., Takumi, T. 2006. The in vitro real-time oscillation monitoring system identifies potential entrainment factors for circadian clocks. *BMC Mol Biol.* 7, 5-12.
- Nollen, E.A., Morimoto, R.I. 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat-shock' proteins. *J. Cell. Sci.* 115, 2809-2816.
- Ohi, K., Takashima, M., Nishikawa, T., Takahashi, K. 1991. N-methyl-D-aspartate receptor participates in neuronal transmission of photic information through the retinohypothalamic tract. *Neuroendocrinology* 53(4), 344-348.
- Ohkita, M., Saito, S., Imagawa, T., Takahashi, K., Tominaga, M., Ohta, T. 2012. Molecular cloning and functional characterization of *Xenopus tropicalis* frog transient receptor potential vanilloid 1 reveal its functional evolution for heat, acid, and capsaicin sensitivities in terrestrial vertebrates. *J. Biol. Chem.* 287(4), 2388-2397.
- Okamura, H., Yamaguchi, S., Yagita, K. 2002. Molecular machinery of the mammalian circadian clock. *Cell Tissue Res.* 309, 47-56.
- Panda, S., Provencio, I., Tu, D.C., Pires, S.S., Rollag, M.D., Castrucci, A.M., Pletcher, M.T., Sato, T.K., Wiltshire, T., Andahazy, M., Kay, S.A., Van Gelder, R.N., Hogenesch, J.B. 2003. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*, 301:525-527, 2003.
- Panda, S., Sato, T.K., Castrucci, A.M., Degrip, W.J., Hogenesch, J.B., Provencio, I., Kay, S.A. 2002. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298, 2213-2216.

- Pando, M.P., Morse, D., Cermakian, N., Sassone-Corsi, P. 2002. Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell* 110, 107-117.
- Pando, M.P., Pinchak, A.B., Cermakian, N., Sassone-Corsi, P. 2001. A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10178-10183.
- Partch C.L., Green, C.B., Takahashi, J.S. 2014. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol.* 24(2), 90-99.
- Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M., Viswanath, V. 2003. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 529–539.
- Pittendrigh, C.S. 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 17-54.
- Plautz, J.D., Kaneko, M., Hall, J.C., Kay, S.A. 1997. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* 278(5343), 1632-1635.
- Poletini, M.O., Moraes, M.N., Ramos, B.C., Jerônimo, R., Castrucci, A.M.L. 2015. TRP channels: a missing bond in the entrainment mechanism of peripheral clocks throughout evolution. *Temperature* 2(4), 522-534.
- Pratt, W.B., Toft, D.O. 2003. Regulation of signaling protein function and trafficking by the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med.* 228, 111-133.
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakani, J., Duboule, D., Albrecht, U., Schibler, U. 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERB alpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110, 251-260.

- Prolo, L.M., Takahashi, J.S., Herzog, E.D. 2005. Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *J. Neurosci.* 25, 404-408.
- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W.J., Hayes, W.P., Rollag, M.D. 1998. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 340-345.
- Provencio, I., Rollag, M.D., Castrucci, A.M. 2002. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* 415, 493.
- Qiu, X., Kumbalasiri, T., Carlson, S.M., Wong, K.Y., Krishna, V., Provencio, I., Berson, D.M. 2005. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature* 433(7027), 745-749.
- Ramos, B.C.R., Moraes, M.N.C.M., Poletini, M.O., Lima, L.H.R.G., Castrucci, A.M.L. 2014. From blue light to clock genes in zebrafish ZEM-2S cells. *Plos One* 9(9), e106252.
- Reinke, H., Saini, C., Fleury-Olela, F., Dibner, C.; Benjamin, I.J.; Schibler, U. Differential display of DNA-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor. *Genes Dev.*, 22(3):331-345, 2008.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R. 2001. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Ann. Rev. Physiol.* 63, 647-676.
- Richter, K., Buchner, J. 2001. Hsp90: Chaperoning signal transduction. *J. Cell Physiol.* 188, 281-290.
- Ripperger, J.A., Schibler, U. 2001. Circadian regulation of gene expression in animals. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13(3), 357-362.

- Romanovsky, A.A. 2007. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, 37–46.
- Ruby, N.F., Burns, D.E., Heller, H.C. 1999. Circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus are temperature-compensated and phase-shifted by heat pulses in vitro. *J. Neurosci.* 19(19), 8630-8636.
- Sadofsky, L.R., Sreekrishna, K.T., Lin, Y., Schinaman, R., Gorka, K., Mantri, Y., Haught, J.C., Huggins, T.G., Isfort, R.J., Bascom, C.C., Morice, A.H. 2014. Unique responses are observed in transient receptor potential ankyrin 1 and vanilloid 1 (TRPA1 and TRPV1) co-expressing cells. *Cells* 3(2), 616-626.
- Saito, S., Fukuta, N., Shingai, R., Tominaga, M. 2011. Evolution of vertebrate transient receptor potential vanilloid 3 channels: opposite temperature sensitivity between mammals and western clawed frogs. *PLoS Genetics* 7, e1002041.
- Saito, S., Shingai, R. 2006. Evolution of thermos-TRP ion homologs in vertebrates. *Physiol. Genomics* 27, 219–230.
- Saito, S., Tominaga, M. 2015. Functional diversity and evolutionary dynamics of thermoTRP channels. *Cell Calcium* 57, 214-221.
- Salas, M.M., Hargreaves, K.M., Akopian, A.N. 2009. TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur. J. Neurosci.* 29, 1568–1578.
- Samali, A., Cotter, T.G. 1996. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp. Cell Res.* 223(1), 163-170.
- Sawarkar, R., Paro, R. 2013. Hsp90 at chromatin.nucleus: an emerging hub of a networker. *Trends Cell Biol.* 23(4), 193-201.

- Schaefer, M. 2005. Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflügers Archiv: Eur. J. Physiol.* 451, 35–42.
- Schmid, H., Cohen, C.D., Henger, A., Irrgang, S., Schlondorff, D., Kretzler, M. 2003. Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney Int.* 64(1), 356-360.
- Schneider, R., Linka, R.M., Reinke, H. 2014. HSP90 affects the stability of BMAL1 and circadian gene expression. *J. Biol. Rhythms* 29(2), 87– 96.
- Shen, W.L., Kwon, Y., Adegbola, A.A., Luo, J., Chess, A., Montell, C. 2011. Function of rhodopsin in temperature discrimination in *Drosophila*. *Science* 331, 1333-1336.
- Soti, C., Pál, C., Papp, B., Csermely, P. 2005. Molecular chaperones as regulatory elements of cellular networks. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 210-215.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. 2008. The behavior and ecology of the zebrafish *Danio rerio*. *Biol. Rev.* 83,13-34.
- Spudich, J. 2006. The multitasking microbial sensory rhodopsins. *Trends Microbiol.* 14(11), 480-487.
- Spudich, J.L., Yang, C., Jung, K., Spudich, E.N. 2000. Retinylidene proteins: Structures and functions from Archaea to humans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 365–392.
- Sreedhar, A.S., Kalmar, E., Csermely, P., Shen, Y.F. 2004. Hsp90 isoforms: Functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* 562, 11-15.
- Stanewsky, R. 2002. Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res.* 309, 11-26.
- Staruschenko, A., Jeske, N.A., Akopian, A.N. 2010. Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *J. Biol. Chem.* 285, 15167–15177.

- Stokkan, K.A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M. 2001. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291, 490-493.
- Storch, K.F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F.C., Wong, W.H., Weitz, C.J. 2002. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417, 78-83.
- Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., Patapoutian, A. 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112, 819–829.
- Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Clapham, D.E. 2001. TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29, 645–655.
- Sud, N., Sharma, S., Wiseman, D.A., Harmon, C., Kumar, S., Venema, R.C., Fineman, J.R., Black, S.M. 2007. Nitric oxide and superoxide generation from endothelial NOS: Modulation by HSP90. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 293, 1444-1453.
- Takaishi, M., Uchida, K., Suzuki, Y., Matsui, H., Shimada, T., Fujita, F., Tominaga, M. 2016. Reciprocal effects of capsaicin and menthol on thermosensation through regulated activities of TRPV1 and TRPM8. *J. Physiol. Sci.* 66,143-155, 2016.
- Takayama, S., Reed, J.C., Homma, S. 2003. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* 22, 9041–9047.
- Takeuchi, Y., Takashima, M., Katoh, Y., Nishikawa, T., Takahashi, K. 1991. N-methyl-D-aspartate, quisqualate and kainate receptors are all involved in transmission of photic stimulation in the suprachiasmatic nucleus in rats. *Brain Res.* 563, 127-131.

- Tamai, T.K., Carr, A.J., Whitmore, D. 2005. Zebrafish circadian clocks: cells that see light. *Biochem. Soc. Trans.* 33(5), 962-966.
- Tamaru, T., Hattori, M., Honda, K., Benjamin, I., Ozawa, T., Takamatsu, K. 2011. Synchronization of circadian *Per2* rhythms and HSF1-BMAL1:CLOCK interaction in mouse fibroblasts after short-term heat pulse. *PLoS One* 6, e24521.
- Van der Horst, M.A., Hellingwerf, K.J. 2004. Photoreceptor proteins, "star actors of modern times": a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Acc. Chem. Res.*, 37(1), 13-20.
- Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y., Foulkes, N.F. 2011. It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS lett.* 585(10),1485-1494.
- Vriens, J., Held, K., Janssens, A., Tóth, B.I., Kerselaers, S., Nilius, B., Vennekens, R., Voets, T. 2014. Opening of an alternative ion permeation pathway in a nociceptor TRP channel. *Nature Chem. Biol.* 10(3), 188-195.
- Wang, H. 2008. Comparative analysis of period genes in teleost fish genomes. *J. Mol. Evol.* 67, 29-40.
- Welch, W.J. 1991. The role of heat-shock proteins as molecular chaperones. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 1033-1038.
- Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., Reppert, S.M. 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14(4), 697-706.
- Welsh, D.K., Yoo, S.H., Liu, A.C., Takahashi, J.S., Kay, S.A. 2004. Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr. Biol.* 14(24), 2289-2295.

- Whitmore, D., Foulkes, N.S., Sassone-Corsi, P. 2000. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* 404, :87-91.
- Wicks, N.L., Chan, J.W., Najera, J.A., Criello, J.M., Oancea, E. 2011. UVA phototransduction drives early melanin synthesis in human melanocytes. *Curr. Biol.* 21, 1906-1911.
- Wrzal, P.K., Bettaieb, A., Averill-Bates, D.A. 2008. Molecular mechanisms of apoptosis activation by heat shock in multidrug-resistant Chinese hamster cells. *Radiat. Res.* 170(4), 498-511.
- Xu, W., Yu, F., Yan, M., Lu, L., Zou, W., Sun, L., Zheng, Z., Liu, X. 2004. Geldaminycin, a heat shock protein 90-binding agent, disrupts Stat5 activation in IL-2-stimulated cells. *J. Cell Physiol.* 198, 188-196.
- Yamaguchi, S., Mitsui, S., Miyake, S., Yan, L., Onishi, H., Yagita, K., Suzuki, M., Shibata, S., Kobayashi, M., Okamura, H. 2000. The 5' upstream region of mPer1 gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation. *Curr Biol.* 10(14), 873-876.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M., Tei, H. 2000. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288, 682-685.
- Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H. 2004. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 5339-5346.
- Yoshida, M., Xia, Y. 2003. Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of inducible nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 278, 36953-36958.

- Young, M.W., Kay, S.A. 2001. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. Nat. Rev. Genet. 2, 521-526.
- Zanquetta, M.M., Corrêa-Giannella, M.L., Monteiro, M.B., Villares, S.M. 2010. Body weight, metabolism and clock genes. Diabetol. Metab. Syndr. 2, 53.
- Zhu, L.J., Altmann, S.W. 2005. mRNA and 18S-RNA coapplication-reverse transcription for quantitative gene expression analysis. Anal. Biochem. 345(1), 102-109.
- Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D.F., Voellmy, R. 1998. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. Cell 94, 471-480.
- Zylka, M.J., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Reppert, S.M. 1998. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. Neuron 20:1103-1110.