



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA



OTONIEL GONÇALVES DE LIMA

**DESAFIOS DE FRIO E SEUS EFEITOS EM PROCESSOS
CANÔNICOS TERMOSENSORES NO BAT E SUA
POSSÍVEL INTERAÇÃO COM CANAIS TRP**



SÃO PAULO
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

Otoniel Gonçalves de Lima

**DESAFIOS DE FRIO E SEUS EFEITOS EM PROCESSOS CANÔNICOS
TERMOSENSORES NO BAT E SUA
POSSÍVEL INTERAÇÃO COM CANAIS TRP**

COLD CHALLENGE AND ITS EFFECTS ON THERMOSENSOR CANONICAL
PROCESSES IN BAT AND THEIR POSSIBLE INTERACTION WITH TRP
CHANNELS

EXEMPLAR CORRIGIDO

SÃO PAULO

2021

Otoniel Gonçalves de Lima

DESAFIOS DE FRIO E SEUS EFEITOS EM PROCESSOS CANÔNICOS
TERMOSENSORES NO BAT E SUA POSSÍVEL INTERAÇÃO COM CANAIS TRP

COLD CHALLENGE AND ITS EFFECTS ON THERMOSENSOR CANONICAL
PROCESSES IN BAT AND THEIR POSSIBLE INTERACTION WITH TRP
CHANNELS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências (Fisiologia Geral) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci.

São Paulo

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:
'<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

Lima, Otoniel Gonçalves
DESAFIOS DE FRIO E SEUS EFEITOS EM PROCESSOS
CANÔNICOS TERMOSENSORES NO BAT E SUA POSSÍVEL
INTERAÇÃO COM CANAIS TRP / Otoniel Gonçalves Lima ;
orientador Ana Maria de Lauro Castrucci -- São
Paulo, 2021.
87 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo. Programa
de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Mus musculus, . 2. Canais TRPA1. 3. Peptídeos
Natriuréticos. 4. Temperatura. 5. Termogênese. I.
Castrucci, Ana Maria de Lauro, orient. II. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228



OTONIEL GONÇALVES DE LIMA

Desafios de frio e seus efeitos em processos canônicos termosensores no BAT
e sua possível interação com canais TRP

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo, como
requisito para obtenção do título de Mestre em
Ciências, na área de Fisiologia Geral.

Aprovado em: __/__/____.

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Profa. Dra. Ana Maria L. Castrucci
Orientadora

A minha família, amor e amigos.

“Não importa o que aconteça, continue a nadar”

(Walters, Grahah; Procurando Nemo, 2003)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus por nunca me desamparar e estar comigo em todos os momentos, me protegendo, dando capacidade de prosseguir e transpor os obstáculos que nem eu mesmo acreditei que fosse capaz de superar. Por ter feito germinar dentro de mim o sonho de sair do meu estado que amo muito (Paraíba) e partir em busca dos meus objetivos. Não foi e nunca será fácil partir e deixar pessoas queridas de uma vida toda para construir algo do zero num lugar desconhecido, é bem difícil, mas até aqui o Senhor me ajudou.

Agradeço muito a minha família paiinho (Wanderley) e mainha (Maria Sandra) meus irmãos (Nemuel e Eliel) que sempre me encorajaram acreditar e ir em busca dos meus sonhos e nunca impediram o meu avançar como profissional, sem vocês nada seria de mim, obrigado por me amarem tanto.

Agradeço também a minha Tia Lourdes e toda família que me ampararam nessa cidade de pedra e sempre me encorajam a continuar.

Sou imensamente grato a meu amor (Willian de Campos) que surgiu na minha vida em um momento difícil para todos nós e que me fez verdadeiramente crescer, resgatando as esperanças que eu tinha perdido e me mostrar que o amor é a coisa mais linda do mundo. Obrigado por todo apoio, carinho, companheirismo, conselhos e paciência. Te amo muito neguinho.

Sou muito grato a Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci, por todo ensinamento a mim dado, sua amizade, seu instinto materno e puxões de orelha e toda experiência a seu lado é singular e engrandecedor, não tenho palavras para demonstrar o sentimento que tenho por ti.

Um muito obrigado ao Leonardo Assis e a Maria Nathalia que sempre me ajudaram a avançar, me ensinando com toda paciência, empenho e carinho. Sem vocês tudo seria mais difícil obrigado de coração por serem esse braço forte no qual eu pude contar no desenvolver desse projeto.

Ao Thales Lacerda que também veio para somar ainda mais com meu crescimento profissional e pessoal, obrigado por todas as palavras de conforto.

Agradeço a Daniela Dantas que abriu as portas de SP, sempre me confortou, me ouviu, me ensinou e me apoiou nos momentos decisivos do meu caminho de João Pessoa

até aqui, te amo muito amiga, que nossa amizade renda sempre bons frutos ao longo de nossa vida.

Sou grato a Neto e Kassiano por fazerem parte da minha família de amigos em São Paulo e desde o início mostrarem empatia para comigo.

Ao Cristhian por todo apoio, amizade e companheirismo na rotina laboratorial sendo um parceiro rochedo no desenvolver de experimentos importantes do meu mestrado.

A Giovanna minha grande amiga marrenta e determinada que me ensina muito com sua perseverança e boas energias, sou muito grato também a toda sua família no qual tenho um carinho imenso, obrigado por torcer por mim.

Enfim sou grato a todos colegas e amigos de laboratório, Guilherme, Leticia, Marcio muito obrigado por tudo por mim.

Sou grato demais a Profa. Marta e Rosana que sempre me encorajaram e me apoiaram, obrigado por acreditar em meu potencial e sempre me darem conselhos engrandecedores, muitas saudades.

Com o coração cheio de saudade agradeço todo o apoio de meus amigos: Débora, Marcio, Maria Helena, Felipe, Jessyca, Anderson, Graziella, Leandro, Clemilson, Andrey Welder e outros que torcem por minha realização.

Por último não menos importante, sou imensamente grato a USP, Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia (a todos os funcionários, secretárias, bioteristas, enfim a todos que nos auxiliam durante toda jornada), aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPESP que me possibilitaram os recursos para que pudesse realizar o desenvolver desse trabalho. O presente trabalho foi financiado pela FAPESP N° Processo: 2018/23915-8.

Enfim sou grato a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho e que sempre torceram por minhas conquistas e felicidade. Muito obrigado de todo coração.



RESUMO



As oscilações diárias de temperatura do ambiente atuam fortemente promovendo mudanças no metabolismo e atividade termogênica do tecido adiposo marrom (BAT) de mamíferos. A ação dos hormônios peptídeos natriuréticos (NPs) e seus respectivos receptores (NP-A, NP-B e NP-C) leva à modulação da atividade termogênica promovendo aumento na expressão de *Ucp1* e outros genes de metabolismo lipídico e mitocondrial no BAT. Com o intuito de explorar o papel do canal TRPA1 nessas respostas ao desafio de frio, investigamos tanto em animais WT C57Bl/6J como em nocautes para *Trpa1* (KO) o efeito da temperatura de 22°C em comparação com a termoneutralidade (30°C ± 1) sobre a expressão de genes temporizadores circadianos *Per1* e *Bmal1*, genes de receptores de NPs (*Npra*, *Nprb* e *Nprc*), níveis dos hormônios ANP e BNP plasmáticos, bem como dos genes participantes da atividade termogênica e metabolismo lipídico (*Ucp1*, *Pgc1α*, *Prdm16*, *Lcad*, *Cidea*, *Cpt1a*) no BAT de animais dos dois genótipos. Inicialmente, determinamos a zona de termoneutralidade e o peso corporal em camundongos após duas e quatro semanas. Verificamos que a temperatura de 30°C está inserida na zona termoneutra e passamos a usá-la como controle para os dois genótipos. Quanto ao peso corporal, o mesmo não foi alterado em nenhuma das condições experimentais exceto nos animais nocautes para o canal *Trpa1* submetidos a 22°C que apresentaram menor ganho de peso em comparação aos animais *Trpa1* KO mantidos em 30°C ou WT desafiados a 22°C. Como esperado, os genes *Per1* e *Bmal1* oscilam em antifase, com picos respectivamente na fase escura e na fase clara, na termoneutralidade. A ausência do canal TRPA1 não parece afetar esse padrão, porém animais *Trpa1* KO tiveram níveis reduzidos do gene *Per1* após serem expostos por duas semanas em temperatura de 22°C em relação aos animais mantidos em 30°C. Os resultados mostraram que nos animais submetidos a 22°C por 2 semanas, houve diminuição dos transcritos dos três subtipos de receptores de NPs e, curiosamente, a expressão de *Nprc* aumentou após 4 semanas a 30°C. Ainda mais, os níveis plasmáticos de BNP a 22°C permaneceram inalterados nos animais nocautes para *Trpa1*, ou até diminuíram nos WT, em comparação com 30°C. Estes níveis só aumentaram em ambos os genótipos quando o desafio foi agudo a 10°C, levantando a questão se é o extremo ou é a duração do estímulo que evoca a via dos NPs. Quanto a via termogênica, somente *Ucp1* e *Lcad* tiveram níveis aumentados em ambos os genótipos após 2 semanas a 22°C, enquanto vários componentes, *Prdm16*,

Cidea, *Cpt1*, mostraram forte aumento de ranscritos nos animais nocautes para canais *Trpa1*.

Palavras chave: *Mus musculus*, Canais TRPA1, Peptídeos Natriuréticos, Temperatura, Termogênese.

ABSTRACT

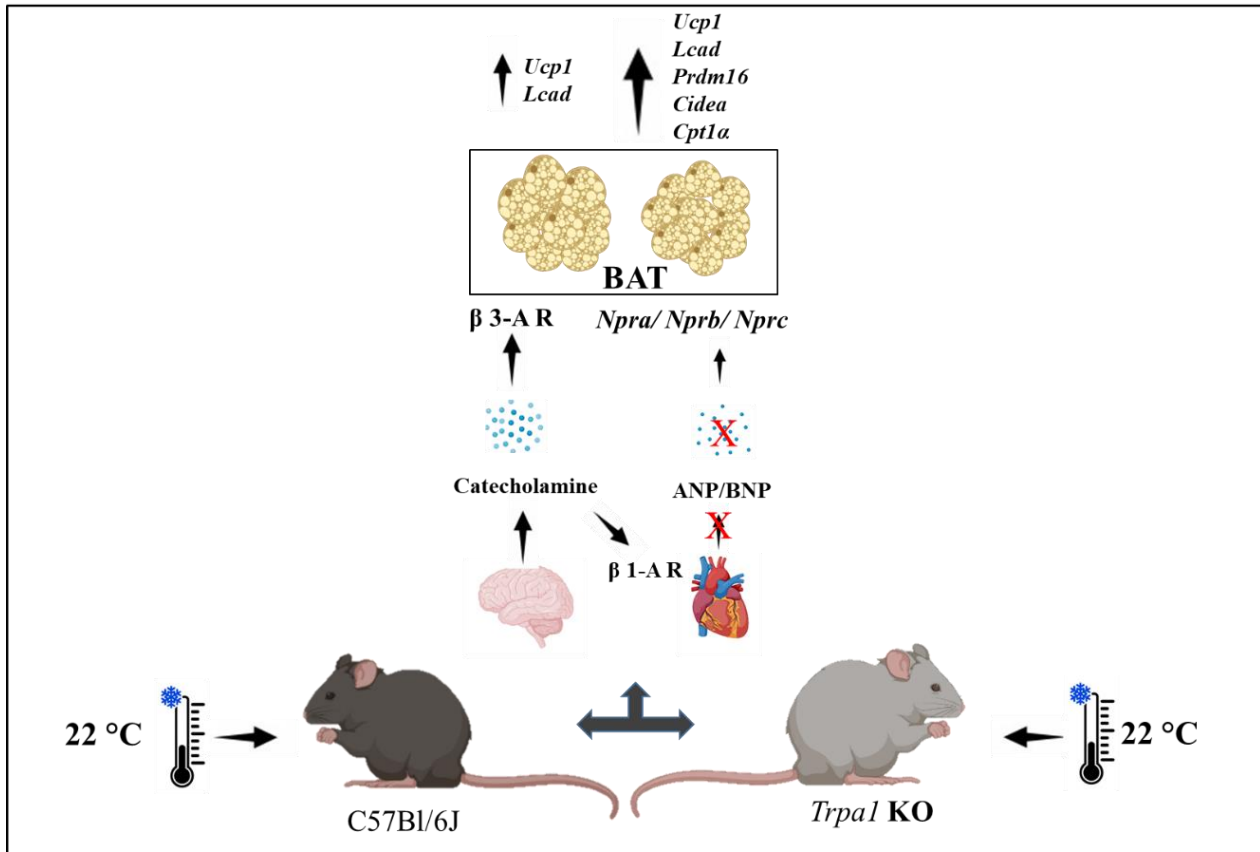
The daily environmental temperature oscillations promote strong changes in metabolism and thermogenic activity of the brown adipose tissue in mammals. The natriuretic peptides (NPs) and their receptors (NP-A, NP-B and NP-C) modulate thermogenic activity through the induction of *Ucp1* expression and other genes related to lipid and mitochondrial metabolism in BAT. Aiming to explore the role of TRPA1 channel in cold-evoked responses, we investigated, in WT C57Bl/6J and knockout *Trpa1* (KO) mice, the effect of 22°C exposure on the expression. of the clock genes *Per1* e *Bmall*, the receptor genes *Npra*, *Nprb* and *Nprc*, the blood levels of ANP and BNP, as well as the genes involved in the thermogenic activity and lipid metabolism (*Ucp1*, *Pgc1α*, *Prdm16*, *Lcad*, *Cidea*, *Cpt1α*) in both genotypes' BAT. Initially, we determine the thermoneutrality range and the body weight after two and four weeks. 30°C is within the neutral temperature range and, therefore, we used it as the control for both genotypes. As to body weight, it did not change under any of the experimental conditions, except for the *Trpa1* KO animals submitted to 22°C, which gained less weight as compared to the same genotype at 30°C or to WT at 22°C. As expected, the clock genes *Per1* e *Bmall* oscillated in antiphase, peaking in the dark and light phase, respectively in the thermoneutral temperature. The lack of the TRPA1 channel seems not to affect this pattern; however, *Trpa1* KO mice had a reduction in *Per1* mRNA after exposure to 22°C for two weeks as compared to the animals in thermoneutrality. Our results demonstrated that in the animals subject to 22°C for 2 weeks, there was a decrease of transcripts of all three subtypes of NP receptors and, curiously, *Nprc* expression. increased after 4 weeks at 30°C. Furthermore, BNP plasma levels at 22°C remained unaffected in *Trpa1* knockout animals, or even diminished in WT, in comparison with 30°C. These concentrations increased in both genotypes only after an acute 10oC challenge. Raising the question whether the stimulus extreme or its duration triggers the NP pathway. As to the thermogenic pathway genes, just *Ucp1* and *Lcad* transcripts increased in both genotypes,

whereas several components of the pathway, *Prdm16*, *Cidea*, *Cpt1*, were remarkably increased in the *Trpa1* channel knockouts.

Keywords: *Mus musculus*, TRPA1 Channels, Natriuretic Peptides, Temperature, Thermogenesis.



GRAPHICAL ABSTRACT



Graphical abstract. Esquema do efeito do desafio de temperatura de 22°C sobre a regulação da atividade termogênica e metabolismo lipídico no tecido adiposo marrom (BAT, *brown adipose tissue*) de camundongos WT e *Trpa1* KO expostos a 22°C após duas semanas. Setas maiores indicam uma maior participação do eixo na termogênese; maior expressão de genes entre os genótipos expostos a 22°C. A sinalização via ANP e BNP e seus respectivos receptores no BAT não contribui para resposta termogênica ao desafio de frio ambiental de 22°C no BAT.



LISTA DE FIGURAS



Figura 1. Esquema de produção de calor por desacoplamento mitocondrial.....	19
Figura 2. Esquema de canais TRP sensíveis à temperatura ativados em diferentes faixas de temperatura.....	22
Figura 3. Funcionamento da maquinaria molecular do relógio.....	24
Figura 4. Estante de animais em experimentação.....	29
Figura 5. Imagem representativa das bandas obtidas para os genótipos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO.....	31
Figura 6. Esquema representativo de exposição ao desafio de temperatura por duas e quatro semanas e horários (ZT) de eutanásia.....	33
Figura 7. Determinação de zona de termoneutralidade de camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a diferentes temperaturas (10 a 36°C) durante a fase clara.....	40
Figura 8. Delta de peso corporal de camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a temperatura de 22°C em comparação com animais expostos a 30°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas.....	42
Figura 9. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de <i>Npra</i> no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a temperatura de 30°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas.....	43
Figura 10. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de <i>Npra</i> no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a temperatura de 22°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas.....	44
Figura 11. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de <i>Npra</i> no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a temperatura de 22°C em comparação com 30°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas.....	45
Figura 12. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de <i>Nprb</i> no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a temperatura de 30°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas.....	45

Figura 13. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de <i>Nprb</i> no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a temperatura de 22°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas.....	46
Figura 14. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de <i>Nprb</i> no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a temperatura de 22°C em comparação com 30°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas.....	47
Figura 15. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de <i>Nprc</i> no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a temperatura de 30°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas.....	48
Figura 16. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de <i>Nprc</i> no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a temperatura de 22°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas.....	49
Figura 17. Expressão de <i>Nprc</i> no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a temperatura de 30 ou 22°C em após (A) duas semanas e (B) quatro semanas.....	50
Figura 18. Níveis plasmáticos de ANP em camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a 22°C após duas semanas em comparação com animais mantidos a 30°C.....	54
Figura 19. Níveis plasmáticos de BNP em camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a 22°C após duas semanas em comparação com animais mantidos a 30°C ou expostos a 10°C por 6 horas).....	55
Figura 20. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de <i>Per1</i> e <i>Bmal1</i> no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a temperatura de 30°C após duas semanas.....	57
Figura 21. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de <i>Per1</i> e <i>Bmal1</i> no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a temperatura de 22°C após duas semanas	58
Figura 22. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de <i>Per1</i> e <i>Bmal1</i> no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e <i>Trpa1</i> KO expostos a temperatura de 22°C em comparação com 30°C após duas semanas.....	59

Figura 23. Expressão de A) *Pgc1 α* ; B) *Prdm16*; C) *Cidea*; D) *Cpt1 α* ; E) *Ucp1*; F) *Lcad* no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1 KO* expostos a temperatura de 30 ou 22°C após duas semanas.63

Figura 24. Ilustração do possível mecanismo do canal TRPA1 na via termogênica do BAT no desafio de frio crônico.....68



SUMÁRIO



INTRODUÇÃO.....	16
1. Desafios de temperatura e ajustes termorregulatórios.....	16
2. Canais de potencial receptor transiente – TRPs.....	20
3. Relógios biológicos.....	23
4. Regulação neuroendócrina do metabolismo.....	25
OBJETIVOS.....	28
OBJETIVOS ESPECIFICIOS	28
MATERIAIS E MÉTODOS	29
1. Animais	29
2. Genotipagem.....	29
3. Determinação da zona de termoneutralidade.....	32
4. Protocolos experimentais	32
5. Métodos	34
5.1 Determinação de peso corporal.....	34
5.2 Determinação quantitativa de níveis plasmáticos de ANP e BNP por ELISA.....	34
5.3 Extração de RNA e RT PCR.....	35
5.4 Reações de PCR quantitativo (qPCR)	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
1. Termoneutralidade.....	39
2. Peso corporal	40
3. Expressão gênica de receptores <i>Npra</i> , <i>Nprb</i> e <i>Nprc</i>	42
4. NPs plasmáticos.....	53
4. Expressão gênica de <i>Per1</i> e <i>Bmall</i>	56
5. Expressão gênica da via termogênica e metabolismo lipídico (<i>Ucp1</i> , <i>Pgc1α</i> , <i>Prdm16</i> , <i>Cidea</i> , <i>Lcad</i> , <i>Cpt1α</i>).....	60
CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS.....	71

1. Desafios de temperatura e ajustes termorregulatórios

O ambiente impõe sobre os organismos importantes fatores de pressão seletiva, seja por oscilações de parâmetros abióticos (temperatura, luz, umidade) ou bióticos (disponibilidade de recurso energético, interações comportamentais inter e/ou intraespecíficas) (Porter & Gates, 1969). Dessa forma, a homeostasia do organismo é constantemente desafiada, porém em respostas a tais desafios ajustes são induzidos nos diferentes sistemas fisiológicos em associação com mudanças nos padrões comportamentais evitando assim efeitos deletérios (Terrien et al., 2011).

A temperatura representa um fator determinante para a distribuição ecológica, manutenção e sobrevivência de muitos organismos. Fisiologicamente, possui uma íntima relação com desenvolvimento, crescimento, maturação sexual, taxa metabólica, além de desenvolvimento de patologias (Gates, 2012).

Em animais homeotérmicos, como mamíferos e aves, a temperatura corpórea é ajustada dentro uma estreita faixa, independente das flutuações de temperatura do ambiente. Dessa forma, a temperatura corporal média é ajustada e corrigida frente a variação de temperatura ambiental percebida nos centros termorregulatórios localizados na região do hipotálamo anterior pré-óptico, desencadeando respostas comportamentais e autônomas (Romanovsky, 2007). Essa regulação homeostática da temperatura é permitida graças a mecanismos de *feedback* que controlam a perda e a produção de calor, que se refletem em pequenas variações de temperatura em torno da média defendendo o limiar ideal ao funcionamento do organismo.

Além disso, as oscilações moleculares da maquinaria do relógio de forma circadiana permitem a regulação das flutuações diárias da temperatura, agindo nos centros termorregulatórios do cérebro. Sabe-se que durante a fase de atividade, a temperatura corporal aumenta, e que decresce à medida que se avança a fase de repouso (Refinetti & Menaker, 1992). Basicamente ajustes de termorregulação envolvem termorreceptores centrais, periféricos e um sistema de condução eferente associado a um controle central (hipotálamo e outras partes do cérebro) que integra os impulsos elétricos desencadeando

respostas eferentes em relação ao frio (vasoconstrição, termogênese) ou calor (vasodilatação ativa).

São descritos dois tipos de termogênese: a termogênese obrigatória resultante da atividade muscular e a termogênese adaptativa que também é descrita como termogênese facultativa. A termogênese adaptativa é responsiva a baixas temperaturas e ou dieta hiperlipídica (Rothwell & Stock, 1979; Feldmann et al., 2009; Luijten et al., 2019). Em camundongos, a resposta aguda ao frio são tremores seguidos por termogênese adaptativa para a manutenção da temperatura corporal. (Cannon & Nedergaard, 2004) garantida por mudanças fisiológicas nos tecidos adiposos.

O tecido adiposo é classificado em duas categorias segundo sua composição: tecido adiposo marrom (BAT) formado por adipócitos multiloculares, maduros, células vasculares-estromais (células precursoras mesenquimais, pré-adipócitos, fibroblastos e células do sistema imune), vasos sanguíneos, linfonodos e nervos e distribuído heterogeneamente na região interescapular, pescoço, axilas e abdômen de camundongos. Os adipócitos são caracterizados por serem ricos em mitocôndrias e por possuírem capacidade termogênica devido à presença de proteínas desacopladoras 1 (UCP-1), bem como de possuir alta capacidade de captação e oxidação de ácidos graxos e glicose. Por sua vez, o tecido adiposo branco (WAT) é formado basicamente por adipócitos uniloculares, contém densidade mitocondrial e capacidade oxidativa baixas e, segundo a sua distribuição no corpo, está classificado em tecido adiposo subcutâneo localizado na hipoderme e tecido adiposo visceral localizado na cavidade abdominal envolvendo diversos órgãos, como gônadas e rins (Bartelt et al., 2011; Carobbio et al., 2013; Rosell et al., 2014). Em humanos, o BAT está presente principalmente em recém-nascidos tendo como principal função manter a temperatura corporal e por muito tempo acreditava-se que em adultos não existisse (Astrup et al., 1985). No entanto já foram demonstradas a presença e a contribuição desse tecido em humanos adultos (Nedergaard et al., 2007). Evolutivamente a abundância do BAT ao nascimento, tanto em roedores quanto em humanos, baseia-se na manutenção eficaz da temperatura corporal após uma redução abrupta na temperatura ambiental, e semelhantemente aos roedores, a atividade termogênica no BAT de humanos também é induzida pelo frio (Nedergaard et al., 2007; van Marken Lichtenbel et al., 2009; Marlatt, 2017; Straat et al., 2021).

O BAT e o WAT representam órgãos importantes na garantia de funções diversas associadas ao ajuste homeostático do metabolismo, ações como regulação termogênica,

armazenamento de energia, ações endócrina e imune são descritas na literatura (Farmer, 2009; Moulin et al, 2009; Wajchenberg et al, 2009; Friedman, 2019). É destacada a importância de BAT como importante órgão envolvido na produção de calor, produção e secreção de IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) e FGF21 (Fibroblast growth factor 21) (Cannon & Nedergaard, 2011; Villarroya et al., 2013). Por sua vez funções do WAT estão envolvidas na preservação da temperatura corporal como isolante térmico, armazenamento de energia, ação endócrina, produzindo e secretando adipocinas como leptina e mediadores pro-inflamatórios como TNF- α e IL-6 (Fonseca-Alaniz, et al, 2007).

Estudos dos processos metabólicos no WAT evidenciam existência de um terceiro tipo de tecido adiposo, o tecido adiposo bege (Scheja & Heerem, 2016), resultante de processos de caquexia, estresse térmico e outros estímulos que levam ao seu escurecimento (*browning*) (Petruzzelli et al., 2014; Sidossis et al., 2015). A variação no tecido celular do WAT é dependente de sua localização, espécie animal e presença de patologias como distúrbios metabólicos diversos, obesidade, caquexia, dentre outras (Hausman et al., 2001; Gesta et al., 2007).

Termogênese por tremor é bastante difundido em aves e mamíferos, porém a termogênese sem tremor é pouco evidenciada em aves e amplamente comum em mamíferos (Cannon & Nedergaard, 2011). A termogênese sem tremor ocorre nas mitocôndrias, especificamente na membrana interna mitocondrial. Canonicamente é descrita a modulação desse ajuste via sistema nervoso simpático, levando a liberação de epinefrina estimulando um aumento na taxa de oxidação lipídica, uma vez que ocorrendo a metabolização lipídica, ácidos graxos tornam-se disponíveis, substratos essenciais para que o desacoplamento aconteça no BAT, promovendo assim um aumento na taxa de calor produzido (Cannon & Nedergaard, 2011).

O ajuste termogênico ocorre através de uma regulação complexa de diversos genes, enzimas e proteínas possibilitando a disponibilidade de substratos em prol do pleno funcionamento de UCP1. É bem estabelecido na literatura que, em resposta ao desafio de baixas temperaturas ambientais, sensores periféricos captam a informação e a direcionam até o hipotálamo, onde é integrada desencadeando uma resposta simpática. As catecolaminas liberadas ligam-se a receptores β -adrenérgicos tipo 3 (β 3-AR) no BAT, estimulando a proteína G estimulatória (Gs) que ativa a enzima adenilil ciclase promovendo assim o aumento dos níveis de AMPc intracelular. Este, por sua vez, estimula a atividade de proteína quinase A, PKA, que fosforila a lipase hormônio-sensível

(LHS) promovendo a hidrólise de triglicerídeos, que serão transportados para o interior da mitocôndria por ação da proteína carnitina palmitoil-transferase tipo 1(CPT1). PKA também fosforila proteína ligante de resposta a AMPc, CREB, fator de transcrição que regula a expressão *Ucp1*, culminando na produção de calor desacoplado na mitocôndria (Cannon & Nedergaard, 2004; Collins et al., 2010).

De onde vem essa energia que é convertida em calor? A termogênese ocorre porque a UCP1 permite a reentrada de prótons contra gradiente de concentração na matriz mitocondrial e desacopla a respiração da produção de ATP. Essa proteína de 33 kDa, característica de BAT, é um carreador de prótons e localiza-se na membrana interna das mitocôndrias. UCP1 desacopla a cadeia respiratória da produção de ATP, convertendo a energia metabólica em calor. Com isso, há maior produção de calor, aumento na oxidação de substratos, no consumo de O_2 e produção de CO_2 e redução na produção de ATP (Ježek, 1998) (Figura 1).

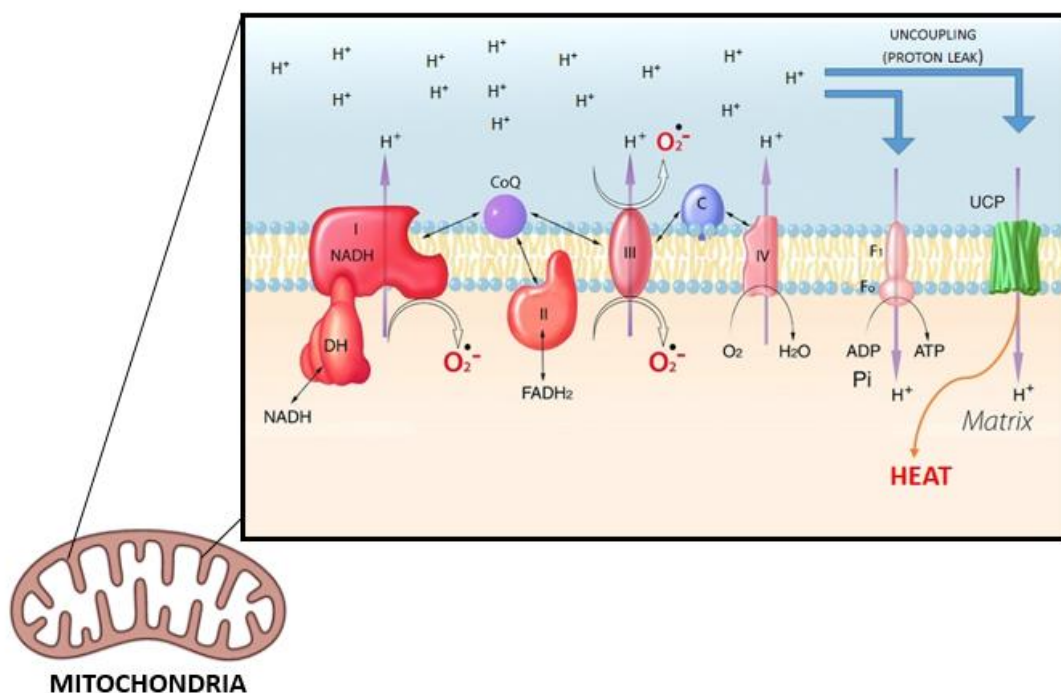


Figura 1. Esquema de produção de calor por desacoplamento mitocondrial. Diferentes complexos de fosforilação oxidativa em tons de vermelho (complexo I, II, III, IV), em roxo (coenzima Q), em azul (citocromo C), em rosa (ATP sintase), em verde a proteína desacopladora (UCP1). Setas indicam o sentido de transporte dos íons H^+ . Adaptado de Balaban et al., 2005.

Atualmente são descritas pelo menos 5 proteínas UCP em diferentes órgãos: UCP1 envolvida na atividade termogênica (BAT e no *browning* do tecido adiposo branco,

WAT). A UCP2 é descrita como abundante em células tronco, câncer e células do sistema imunológico no cérebro, distribuição está apoiada por vários estudos (Pecqueur et al., 2009; Yu et al., 2013; Rupprecht et al., 2012, 2014; Hilse et al., 2018). UCP3 é abundante no tecido muscular, cardiomiócitos e BAT, onde se tem demonstrado uma íntima relação entre a expressão do gene *Ucp3* com o metabolismo lipídico em resposta a dieta e exposição ao frio (Matsuda et al., 1997; Millet et al., 1997; Weigle et al., 1998; Cadenas et al., 1999).

A expressão de UCP3 em resposta aos níveis de ácidos graxos sustenta o conceito do seu envolvimento na regulação do metabolismo celular, originalmente proposto para UC2 e UCP4 (Rupprecht et al., 2014). Em contraste, a proteína UCP4 é abundante em células altamente ativas porém com baixo potencial de proliferação, dependentes de um fornecimento estável de glicose, como neurônios e células sensoriais (Liu et al., 2006; Smorodchenko et al., 2009, 2011, 2017; Rupprecht et al., 2014)

2. Canais de potencial receptor transiente – TRPs.

Os canais de potencial receptor transiente (TRP) são canais catiônicos geralmente independentes de voltagem, possuem conformação tetrâmera e com unidades compostas por seis alças transmembrânicas, e são responsáveis por sensações mecânicas, térmicas e químicas (por exemplo, nocicepção, toque, sabor, olfação e sensação térmica) (Voets et al., 2005; Oancea et al., 2009; Nilius & Flockerzi, 2014). São descritos vários tipos de canais agrupados por homologia: TRPC (canônica), M (melastatina), V (ligação vanilóide), A (repetição de ankirina), P (policistina) e ML (mucopolipina) (Ramsey et al., 2006). Com exceção de TRPM4 e TRPM5 que são permeáveis apenas a cátions monovalentes, todos os demais possuem permeabilidade ao Ca^{2+} (Liao et al., 2013). Muitos dos canais TRPs são descritos como termossensíveis exibindo variações nos padrões de ativação frente a oscilações de temperatura (Pertusa et al., 2012), embora compostos naturais também possam alterar seu funcionamento (Palazzo et al., 2013). Os canais TRPV1-4, TRPM2-5 são ativados por calor, enquanto TRPM8, TRPA1 e TRPC5 são ativados por frio (Pertusa et al., 2012; Fowler & Montell, 2013) (Figura 2).

Todos os canais TRPs possuem múltiplos sítios de interação ativados e regulados por fosforilação pelas proteínas quinases A (PKA) e C (PKC), com domínios de reconhecimento para fosfatidil inosítídeo 3-quinase SH2 (Bevan et al., 2014). Sua

regulação envolve a ativação das vias das fosfolipases PLC- β e PLC- γ , ativação por diacilglicerol (DAG), ácido araquidônico, bisfosfato de fosfatidil inositol (PIP₂), baixa concentração de Ca²⁺ citoplasmático e tensão de cisalhamento (Watanabe et al., 2008). O PIP₂ possui um papel central na regulação da maioria dos canais TRPs C, M, V, podendo ser encontrado em abundância na membrana plasmática (Kruse et al., 2012).

Como característica intrínseca, os canais TRPs possuem acoplamentos alostéricos que respondem a estímulos distintos possuindo uma íntima relação com várias funções metabólicas (Wang & Siemens, 2015). Os que compõem a família TRPV (V1, V3 e V4), por exemplo, desempenham importante controle fisiológico nos adipócitos (Ye et al., 2012; Zsombok, 2013; Cheung et al., 2015; Derbenev & Zsombok, 2016; Zsombok & Derbenev, 2016). Dentre eles, TRPV1 destaca-se por sua contribuição a fatores associados a obesidade e diabetes mellitus (Westerterp-Plantenga et al., 2005; Suri & Szallasi, 2008; Kang et al., 2011; Lee et al., 2015). TRPV1 e TRPV2 possuem estreita relação com a adipogênese no BAT (Kida et al., 2016; Sun et al., 2016), enquanto TRPM8 participa do controle e modulação da termogênese no BAT (Ma et al., 2012).

Inicialmente os canais TRPA1 foram descritos como receptor de frio (Story et al., 2003) e posteriormente proposto por Dhaka e colaboradores (2007) que atuariam como sensor de temperaturas abaixo de 17°C que porventura fossem nocivas ao organismo. As participações de TRPA1 na modulação de funções não se resumem apenas ao papel desse receptor na sensação térmica de frio, mas sua contribuição na alodinia e dor neuropática (Caspani & Happenstall, 2009; Caspani et al., 2009), e de estímulos nocivos (Stucky et al., 2009; Fernandes et al., 2012).

Evidências como a similaridade com canais mecanossensores de *Drosophila* (TRPN e *painless*), quanto a propriedades biofísicas como abertura de poros, a expressão de TRPA1 em nociceptores responsivos a estímulos mecânicos e sua possível participação nas células ciliadas do sistema auditivo levam a supor que TRPA1 possui função termo- e mecano-transdutora (García-Añoveros & Nagata, 2007; Levine & Alessandri-Haber, 2007; Stucky et al., 2009). Também foi visto que mutações no gene *Trpa1* de *Caenorhabditis elegans* levaram a alterações nas respostas comportamentais a estímulos mecânicos (Kindt et al., 2007).

Curiosamente existem divergências quanto a ativação de alguns ortólogos do TRPA1. Enquanto em alguns organismos, esses canais são ativados por frio (camundongos e *C. elegans*), em outros por calor, (lagartos, rãs, cascáveis, cobras-rei,

Drosophila) (Story et al., 2003; Chatzigeorgiou et al., 2010; Gracheva et al., 2010; Saito et al., 2012; Kurganov et al., 2014; Karashima et al., 2009)

Foi recentemente descrito que o canal TRPA1 em camundongos também é importante para detecção de calor nocivo (Vandewauw et al., 2018), em conjunção com TRPV1, porém não há efeito aditivo (Hoffmann et al., 2013). Canais TRPA1 em humanos parecem ter a capacidade de detectar tanto o frio quanto o calor (Moparthi et al., 2016). Esses autores descrevem que diferentes conformações do canal TRPA1 são determinantes para a sensibilidade ao tipo de estímulo recebido, temperaturas baixas ou altas (Moparthi et al., 2016) e que mutações em um único ponto do domínio da anquirina podem alterar seu limiar de ativação por temperatura (Jabba et al., 2014; Pagán, 2017)

Podemos assim supor que modificações pós-traducionais mínimas e / ou o ambiente celular representam fatores importantes para ativação do TRPA1 nos mais diferentes organismos (Story et al., 2003; Karashima et al., 2009; Chen et al., 2013).

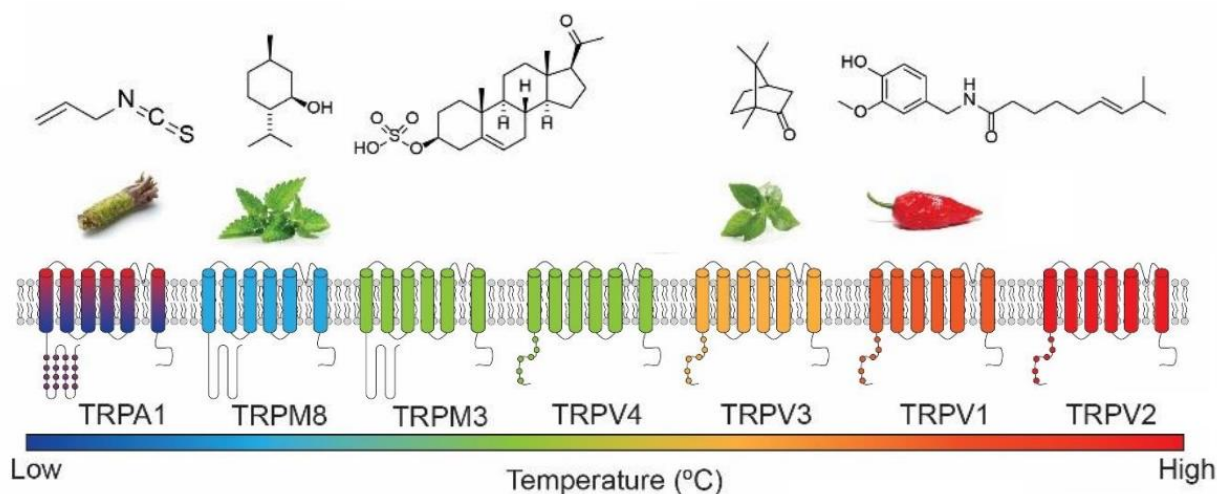


Figura 2. Esquema de canais TRP sensíveis à temperatura ativados em diferentes faixas de temperatura. Acima dos canais, encontram-se as estruturas de produtos naturais capazes de ativar os canais TRPs (TRPA1 - raiz forte, isotiocianato de alila; TRPM8 – tomilho, timol; TRPM3 e TRPV4 - sulfato de androstenolona, (esteróide endógeno produzido no córtex adrenal; TRPV3 – cânfora, terpenóide; TRPV2 – pimenta, capsaicina). A régua de temperatura ilustra os intervalos para ativação por frio nocivo (azul escuro) a calor nocivo (vermelho) (Pagán, 2017).

3. Relógio biológico

Há fortes evidências da relação entre a oscilação temporal da maquinaria do relógio e o controle do metabolismo (Brown, 2016; Shimizu et al., 2016) bem como a participação dos canais TRPs na modulação dos processos metabólicos (Voets & Nilius, 2007; Wang & Siemens, 2015). A quebra nesse mecanismo de controle temporal pode desencadear alterações fisiológicas refletindo em quadros patológicos como exemplo síndrome metabólica (Landsberg & Yuan, 2004; Liu et al., 2008; Berwick et al., 2012).

A existência do ciclo claro e escuro impõe aos organismos padrões diferentes ao longo do dia (24 h), uma fase com radiação e temperaturas altas e outra de baixa incidência luminosa e temperaturas menores. A radiação luminosa visível e não-visível, e a temperatura desempenham importantes pressões seletivas ao longo da evolução dos seres vivos. O que fez Pittendrigh (1993) propor a teoria da “fuga da luz” onde através do ciclo claro e escuro os fotorreceptores associados a osciladores endógenos que seriam ajustados ritmicamente resultaram na co-evolução desses dois sistemas frente àquelas pressões de luz. A identificação dos parâmetros ambientais rítmicos e sua previsão (antecipação) permitem aos seres vivos gerenciar suas atividades metabólicas e garantir a obtenção e uso de recursos energéticos (Froy, 2010; Gerstner & Yin, 2010; Kyriacou & Hastings, 2010; Hogenesch & Ueda, 2011)

Mamíferos possuem uma maquinaria gênica e proteica responsável pelo funcionamento do relógio central, o núcleo supraquiasmático (NSQ), localizado no hipotálamo. Através de ajustes nas alças de retroalimentação de transcrição, tradução e modificações pós-traducionais, positivas e negativas, controlam a própria síntese desses fatores. Os produtos proteicos resultantes da expressão dos genes *Clock* (e seu parálogo *Npas2*) e *Bmal1* formam heterodímeros capazes de se ligar a elementos E-box dos promotores dos genes *Per* (1, 2 e 3) e *Cry* (1, 2 e 3), ativando-os – esta é a alça positiva. As proteínas dos genes *Per* e *Cry* formam a alça negativa bloqueando sua própria transcrição ao inibirem a ação de CLOCK:BMAL1 (Brown & Azzi, 2013). CLOCK:BMAL1 ainda ativa uma alça secundária do cerne do relógio da qual fazem parte os genes *Rev-erb α/β* e *Ror α/β* ; e suas proteínas agem antagonicamente competindo pelo elemento RORE e respectivamente promovem ou inibem a transcrição de *Bmal1* (Buhr & Takahashi, 2013). A dinâmica e modulação dessas alças interligadas ocorrem em um período de 24 horas (Bass & Takahashi, 2010). Foi visto também que a acetilação e

adiposo marrom, branco inguinal e epididimal (Renaud et al., 2000; Raspe et al., 2002a; Zvonic et al., 2006; Yin et al., 2006). Outras características que reafirmam esse padrão são observadas na atividade de enzimas participantes da síntese e quebra de lipídeos, síntese de ácidos graxos, bem como seu transportadores, apresentando ritmo circadiano em mamíferos (Mazzoccoli et al., 2012; Tarquini & Mazzoccoli, 2017).

Animais nos quais ocorrem alterações nos diferentes componentes do relógio exibem perturbações metabólicas (Block, 2005; Turek et al., 2005; Williams & Schwartz, 2005). Por exemplo, camundongos com perda de função de *Clock* são hiperfágicos, tornando-se obesos e passam a desenvolver características da síndrome metabólica, como hiperleptinemia, hiperlipidemia, esteatose hepática e hiperglicemia (Turek et al., 2005). Além de desempenhar um papel importante na regulação do cerne da maquinaria molecular do relógio, *Rev-erba* possui implicações no controle de vários fatores da homeostase lipídica, como o metabolismo lipoprotéico e diferenciação de adipócitos (Sacks et al., 2000; Raspe et al., 2002b; Gerhart-Hines et al., 2013).

De forma pioneira, nosso grupo (Moraes et al., 2017a, b) descreveu a relação entre os genes do relógio com os canais TRP. Demonstrou-se que em BAT de animais nocautes para o canal *TrpV1* ou *TrpM8*, a expressão da maquinaria molecular do relógio sofreu uma grande diminuição se comparada a camundongos selvagens. Também foi observada uma redução na expressão de UCP1 e maior depósito de gotículas lipídicas em adipócitos de animais nocautes *TrpM8* em comparação aos animais selvagens ou nocautes para *Trpa1*, levando a acreditar que a desregulação temporal pode alterar o mecanismo de termogênese (Ma et al., 2012a; Moraes et al., 2017b).

4. Regulação neuroendócrina do metabolismo

Existem dois eixos neuro-endócrinos importantes que controlam os ritmos circadianos de muitos tecidos periféricos: hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) onde seus órgãos alvo são modulados pela ação de glicocorticoides e hipotálamo-pineal-tecidos periféricos, modulados pela sinalização do escuro promovida pelo aumento da síntese e secreção de melatonina (Hardeland et al., 2011). A resposta às variações ultradianas e circadianas dos diversos hormônios do eixo HPA e da melatonina é tecido-específica, evento esse partilhado com a maioria dos hormônios (Lightman & Terry, 2014) possibilitando sincronização nos tecidos periféricos e com núcleos do sistema nervoso

central. Pistas endógenas, como a temperatura resultante da ativação do NSQ pela sinalização de ciclo claro-escuro, ou alimentação, são importantes moduladores de relógios locais em centros de metabolismo e termogênese, como fígado e tecidos adiposos branco e marrom. A variação de temperatura corporal interna caracteriza um importante sinalizador, reforçando o ritmo permitindo a sincronização dos tecidos periféricos entre si e com o tempo externo (Husse et al., 2015; West & Bechtold, 2015).

Bold e colegas (1981) foram os primeiros a demonstrar uma ligação endócrina entre o coração e o rim, identificando um fator natriurético sob a forma de um pequeno peptídeo. Posteriormente foi identificada a presença de uma ponte dissulfeto em sua estrutura, o que conferia uma configuração adequada para seu acoplamento ao receptor específico (Flynn et al., 1983). Os peptídeos natriuréticos (NPs) compreendem 3 subfamílias ANP, BNP e CNPs, cujos pró-hormônios são codificados por 3 genes distintos. Os receptores de NPs NPR-A e NPR-B são do tipo guanililciclase onde sua interação com o hormônio catalisa a reação diretamente aumentando os níveis de GMPc intracelular (Gupta & Wang, 2015). Ambos ANP e BNP ligam-se preferencialmente ao receptor NPR-A, enquanto CNP preferencialmente liga-se ao receptor NPR-B. Todos os 3 peptídeos podem ligar-se ao receptor NPR-C, proposto ser um receptor de depuração regulando os níveis extracelulares plasmáticos e locais dos NPs (Rose & Giles, 2008; Pandey, 2014)., e que não tem atividade guanililciclase (Nakagawa et al., 2019).

Os NPs são secretados primordialmente pelos cardiomiócitos atriais e, além de suas ações canônicas em diminuir a pressão arterial através de variados mecanismos, promovem aumento da lipólise em adipócitos humanos (Sengenès et al., 2000) e induzem o *browning* em adipócitos brancos mediante estimulação da expressão de genes termogênicos (Bordicchia et al., 2012). Em adipócitos humanos, ANP e BNP ativam a expressão de PGC-1 α e UCP1, induzindo assim a mitocôndriogênese promovendo aumento na respiração desacoplada e total. Fatores como a presença de agonistas dos receptores NPA e NPB e β -adrenérgicos e o desafio ao frio em camundongos estimulam um aumento na expressão de marcadores mitocondriais do BAT de uma maneira dependente de p38 MAPK. Processos como lipólise e termogênese são estimulados pela atividade de proteína quinase, PKG, em adição á proteína quinase A, PKA, da via β -adrenérgica (Bordicchia et al., 2012; Harms & Seale 2013).

Embora expresso em outros tecidos, a produção extra-cardíaca de ANP parece ter pouco impacto nas suas concentrações plasmáticas em comparativo ao lançamento

cardíaco (Goetze et al., 2005). Camundongos expostos ao frio mostram níveis aumentados de NPs e, no BAT e no WAT, dos receptores *Npra* e *Nprb*, e níveis diminuídos de *Nprc*, o receptor de *clearance*. Animais nocautes para *Nprc* (-/-) têm estoques menores de WAT e BAT, e expressão aumentada de genes termogênicos como *Ucp1*, o que segundo os autores (Bordicchia et al., 2012) define o coração como um regulador importante da fisiologia dos tecidos adiposos.

Em estudos no intuito de elucidar a contribuição de NPs no metabolismo de tecido adiposo em comparação com o músculo *in vivo*, utilizaram-se camundongos com deleção específica do receptor de depuração, NPRC, no tecido adiposo (*NprcA* KO) ou no músculo esquelético (*NprcM* KO). Os resultados mostraram que nos camundongos *NprcA* KO foi observada resistência a obesidade induzida por *high fat diet*, diferentemente do que foi visto em camundongos *NprcM* KO, além de aumento no dispêndio de energia, maior sensibilidade à insulina e aumento da absorção de glicose no BAT (Springer et al., 2014).

A presença de elementos regulatórios na região promotora do gene codificador de NPs, com destaque para E-box, indica um possível controle temporal da expressão de ANPs (Garami & Gardner, 1996) possibilitando a ligação do heterodímero CLOCK/BMAL1 em seu elemento responsivo E-box controlando a produção de ANP.

Tendo em mente que camundongos submetidos a desafio de frio respondem com aumento da secreção de NPs pelo coração, os quais irão estimular a termogênese no BAT, aumentando a produção de calor e que TRPA1 pode ser o termosensor tanto cutâneo, como no próprio coração e no BAT, propusemos utilizar camundongos nocautes *Trpa1* sob desafio de frio crônico, por 2 ou 4 semanas, a fim de investigar a participação do canal TRPA1 nas respostas de termogênese adaptativa.

OBJETIVOS

Avaliar *in vivo* a participação do canal TRPA1 na resposta a variação de temperatura, através da análise do relógio local e dos processos canônicos no tecido adiposo marrom em *Mus musculus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a zona de termoneutralidade dos animais de genótipo selvagem C57Bl/6J, WT e de nocautes para *Trpa1*.

- Avaliar a variação do peso corpóreo em animais WT e *Trpa1* KO desafiados por 22°C, em comparação com os mesmos genótipos mantidos em termoneutralidade de 30°C \pm 1 após duas e quatro semanas.

- Quantificar os níveis de ANP e BNP plasmáticos em animais WT e KO para *Trpa1* desafiados por 22°C, em comparação com os mesmos genótipos mantidos em termoneutralidade de 30°C \pm 1.

- Analisar a variação entre dia e noite da expressão de genes de relógio e de receptores *Npra*, *Nprb* e *Nprc* no BAT de animais WT e KO para *Trpa1* desafiados por 22°C, em comparação com os mesmos genótipos mantidos em termoneutralidade de 30°C \pm 1.

- Avaliar a resposta de genes da via termogênica *Pgc1 α* , *Prdm16*, *Cidea*, *Cpt1 α* , *Ucp1* e *Lcad* no BAT de animais WT e KO para *Trpa1* desafiados por 22°C, em comparação com os mesmos genótipos mantidos em termoneutralidade de 30°C \pm 1.

1. Animais

Foram utilizados camundongos machos de genótipos C57Bl/6J (WT, n=45) e *Trpa1* KO (n=42) com idade de 3-4 meses oriundos do biotério do departamento de Fisiologia (IB-USP).

Todos foram individualizados e aclimatados por duas semanas demonstrado por (Clayton & McCurdy, 2018), como suficiente para a adaptação. Os animais foram mantidos em temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1$, sob regime de fotoperíodo claro/escuro LD 12:12 (800-1000 lux). A luz foi acesa às 7 h e apagada às 19 h (Figura 4).



Figura 4. Estante de animais em experimentação.

2. Genotipagem

Amostras de fígado (inicialmente) ou de cauda foram extraídas de animais selvagens e nocautes e armazenadas em -80°C até o processamento. A lise do tecido foi feita em 500 μL de uma solução de Tris 1 M pH 8 (Sigma, EUA), EDTA 0,5 M (Sigma), SDS

10% p/v (Merck, EUA), NaCl 5 M (Synth, Brasil), água *nuclease free* (Thermofisher, EUA)), contendo 10 µL de RNase 20 mg/mL (Thermofisher) e 10 µL de proteinase K 20 mg/mL (Thermofisher). Após agitação em banho maria a 55°C *overnight*, foram adicionados 500 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (Thermofisher), e as amostras centrifugadas a 12000 x g por 10 min a 4°C. Removeu-se, então, a fase superior para novos tubos, sendo acrescentados 400 µL de isopropanol (Sigma) seguindo-se inversões repetidas até que a precipitação do DNA fosse observada. As amostras foram novamente centrifugadas a 12000 x g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e, em seguida, 200 µL de etanol 75% (Sigma) foram adicionados.

Após nova centrifugação a 12000 x g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado por inversão e as amostras mantidas abertas em temperatura ambiente para evaporação dos resíduos de álcool. Após seco, o *pellet* foi ressuscitado em água *nuclease free* (Thermofisher). A concentração de DNA foi determinada por leitura a OD260 e a qualidade pela razão OD260/OD280 em espectrofotômetro, sendo aceitos valores > 1.6 (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop, EUA).

Para amplificação de DNA em reação em cadeia de polimerase foram utilizados 200 ng de DNA total, água *nuclease free*, 0,25 µL de oligonucleotídeos específicos para a amplificação do gene *Trpa1* selvagem (500 nM) e também para amplificação do cassette presente no animal *Trpa1* nocaute (500 nM) (Tabela 1) e 45 µL de Mix Platinum DreamTaq (Thermofisher), totalizando 50 µL de reação.

As soluções foram colocadas em um termociclador (iCycler, BioRad, EUA) e submetidas às seguintes condições: 94°C por 2 min, 10 ciclos de 94°C por 20 seg, 65°C por 15 seg e 68 °C por 10 seg (a cada ciclo diminuiu-se 0,5°C, protocolo *touchdown*), seguindo 28 ciclos de 94°C por 15 seg, 60°C por 15 seg e 72°C por 10 seg e extensão final a 72°C por 2 min (protocolo recomendado por Jackson Laboratories, EUA). Uma vez terminada a reação, alíquotas foram utilizadas para caracterização em gel de agarose 2% em TBE 0,5X (Thermofisher), contendo 10 mg/mL de brometo de etídio (Invitrogen). As amostras foram submetidas a eletroforese de 130V durante 1 h. Em seguida, o gel foi levado ao fotodocumentador para captura de imagem das bandas (Figura 5)

Tabela 1. *Primers* e referências para genotipagem.

Primers para <i>Mus musculus</i>	
Genótipo	Primers
<i>Trpa1</i> WT (Kwan et al., 2006)	Forward: TCCTGCAAGGGTGATTGCGTTGTCTA Reverse: TCATCTGGGCAACAATGTCACCTGCT
Cassete <i>Trpa1</i> KO (Kwan et al., 2006)	Forward: CCTCGAATCGTGGATCCACTAGTTCTAGAT Reverse: GAGCATTACTTACTAGCATCCTGCCGTGCC

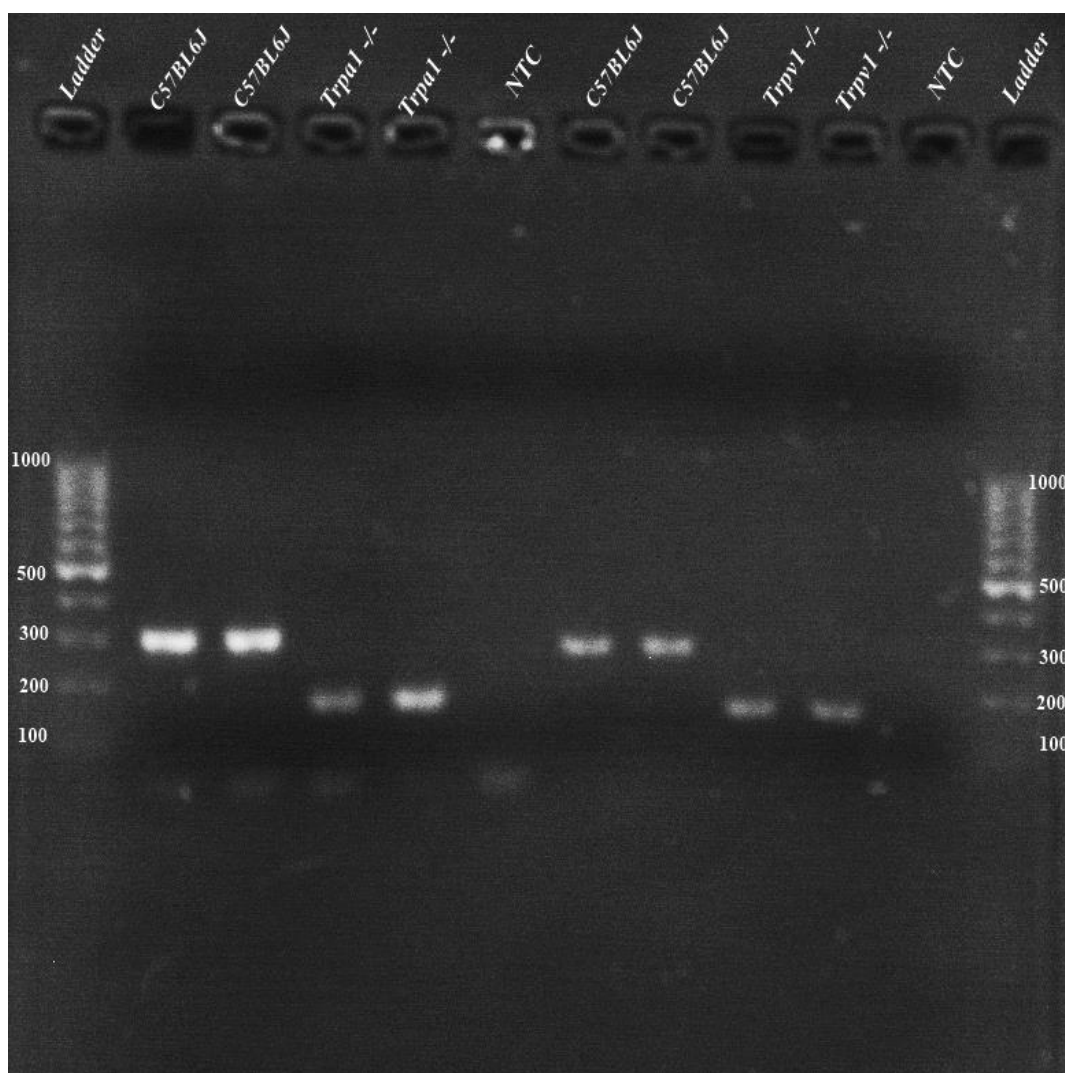


Figura 5. Imagem representativa das bandas obtidas para os genótipos C57Bl/6J e *Trpa1* KO

3. Determinação da zona de termoneutralidade

A determinação da termoneutralidade foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Alexandre A. Steiner, de Neuroimunologia da Sepse do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, através de um sistema completo de monitoramento de animais de laboratório (Comprehensive Lab Animal Monitoring System; CLAMS, Columbus Instruments, EUA).

Após um período de adaptação de 24 h em caixas metabólicas, os volumes de consumo de oxigênio e de CO₂ expirado foram medidos a temperaturas de 16 a 36°C, com intervalos de 2,5 graus, durante períodos de 3 h durante a fotofase por 3 dias consecutivos. A coordenação na medição dos diferentes dispositivos periféricos foi gerenciada por meio de módulos Visual Basic personalizados desenvolvidos por G. Heldmaier (1975). As leituras de oxigênio foram convertidas para Taxa Metabólica (TM), de acordo com a seguinte equação: $TM [mL O_2 / h] = \Delta vol\% O_2, \text{ fluxo } [L / h]10$. A taxa de fluxo foi ajustada para ~ 35 L/h. Para ajustar as diferenças nas taxas de fluxo do ar na saída e entrada nas gaiolas metabólicas, o quociente respiratório (RQ) (volume de CO₂ produzido/volumes de O₂ consumido) foi usado. A produção efetiva de calor [HP, mW] e condutância térmica C [mW / °C] foram calculadas de acordo com Heldmaier (1975) como Eq. 1: $HP = (4,44 + 1,43 RQ) TM$ e Eq. 2: $C = HP (T_b - T_a) - 1$, em que TM é a taxa metabólica (mL/h), T_b é a temperatura corporal (°C) e T_a é a temperatura ambiente (°C).

Para analisar o aumento ou diminuição da taxa metabólica entre os genótipos no range de temperatura (10-36°C) utilizou-se o teste *One-way* ANOVA (GraphPad Prism Version 7.0).

4. Protocolos experimentais

Após as 2 semanas de aclimação em termoneutralidade, os animais foram separados em 2 grupos no dia 0, sendo um mantido a 30°C e o outro a 22°C por 2 ou 4 semanas adicionais (Figura 6).

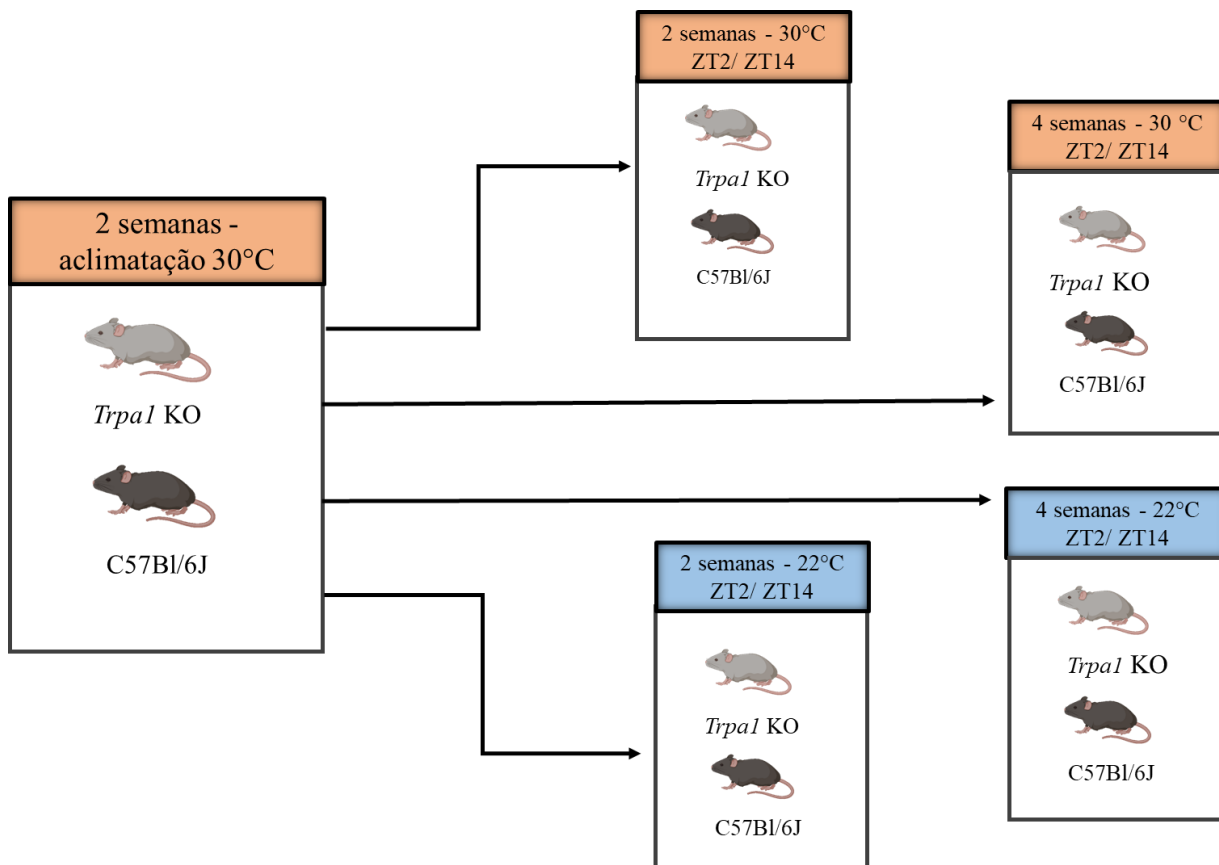


Figura 6. Esquema representativo de exposição ao desafio de temperatura por duas e quatro semanas e horários (ZT) de eutanásia.

Após duas ou quatro semanas, os animais foram eutanasiados às 9 h (2 horas após o acender das luzes, ZT2) e às 21 h, (2 horas após o apagar das luzes), sendo excisado o BAT que foi armazenado em -80°C , para posteriores análises (Figura 6). Os pontos temporais foram escolhidos por anteciparem temporalização metabólica para manutenção da glicemia. O sangue foi coletado e imediatamente centrifugado ($1700 \times g$, 4°C , 10 min) para obtenção do plasma segundo Kalra e colaboradores (2013).

Para determinação adicional dos níveis de BNP, também foram usados animais submetidos a condição de 10°C por 6 horas, após aclimatação a 30°C por 2 semanas. Para o desafio, os animais foram transferidos para estufa a 30°C , e a temperatura da estufa ajustada para 10°C (tempo de 30 min). A partir da obtenção de 10°C , foram definidas as 6 horas de desafio a 10°C , o que se encerrou às 9 h (2 h após o acender das luzes, ZT2), quando foi realizada eutanásia e coleta de sangue.

A manipulação e eutanásia no escuro foram feitas com o auxílio de óculos militares de visão noturna (infra-vermelho). Os procedimentos estão de acordo com o comitê de ética (CEUA), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo protocolo N° 350/2019.

5. Métodos

5.1. Determinação de peso corporal

Os animais receberam ração comercial (Nuvilab, CR-1 irradiada) e água *ad libitum* durante todo o período de aclimatação e experimentação (30 ± 1 e 22 ± 1 °C). Os pesos foram obtidos com uma mini-balança digital (0,1- 2000 g) (I-2000, Brasil) a cada 7 dias, obtendo o peso inicial no dia 0, e após 7 e 14 dias (duas semanas) e após 7, 14 e 21 e 28 dias (quatro semanas). O ganho ou perda de peso foram avaliados através do cálculo do delta do peso (Dia 0- dia14 para duas semanas ou (Dia 0- dia 28) para 4 semanas.

Foi usado o teste *One-way* ANOVA para determinar as diferenças significativas entre o delta de peso obtidos em animais submetidos à 30 ± 1 e 22 ± 1 °C após duas e quatro semanas (GraphPad 7.0).

5.2. Determinação quantitativa de níveis plasmáticos de ANP e BNP por ELISA

Foram utilizados plasmas de camundongos de genótipos C57Bl-6J e *Trpa1* KO para mensuração de níveis de ANP e BNP. O sangue foi coletado em microtubo contendo EDTA (Vacuplast, K2 500 µl), logo após centrifugado a $1.000 \times g$ a 4°C por 10 min (protocolo adaptado de Brescia, 2006). Os procedimentos de quantificação de ANP e BNP seguiram os protocolos do fabricante (RayBio[®] Mouse / Rat Brain Natriuretic Peptide EIA Kit, EUA). Ao final a placa foi levada a um leitor de ELISA e a absorbância medida a 450 nm.

Os níveis de ANP e BNP plasmáticos de animais submetidos a 30 ± 1 e 22 ± 1 °C e BNP de animais submetidos à 30 ± 1 , 22 ± 1 e 10 ± 1 °C foram comparados através de *Two-way* ANOVA seguido por Bonferroni, e as diferenças consideradas significativas para $p < 0.05$ (GraphPad 7.0).

5.3 Extração de RNA e RT-PCR

Inicialmente foram colocados 300 μL de Tri-Reagent-LS (Ambion, EUA) aos tubos *ependorffs* contendo o tecido congelado, homogeneizando-se, e adicionando em seguida mais 700 μL de Tri-Reagent-LS. A amostra foi centrifugada a 500 x g a 4°C, por 5 min. Cerca de 700 μL do sobrenadante foram removidos para novos tubos, adicionando-se 200 μL de 1-bromo-3-cloropropano (BCP) seguindo-se agitação em vórtex e descanso por 10 min. Após centrifugação a 12.000 x g, durante 15 min, a 4°C, foram retirados 400 μL da fase superior contendo o RNA.

A cada amostra, foram adicionados 600 μL de isopropanol para a precipitação do RNA, deixando descansar por 10 min em temperatura ambiente, seguindo-se centrifugação a 12.000 x g, durante 35 min, a 4°C. Após essa etapa, descartou-se o sobrenadante e ao *pellet* foi adicionado 1,3ml de álcool 75% gelado, vortexando a amostra, e centrifugando a 12.000 x g, durante 15 min, a 4°C. A lavagem do pellet com álcool 75% foi feita duas vezes, após o que a fase líquida foi descartada e o *pellet* submetido a secagem em bancada por cerca de 5-10 min. O RNA contido no fundo do tubo foi ressuspendido em 20 μL de H₂O DEPC, adicionando-se 2 μL de 10x Turbo DNase buffer (Zymo Research, EUA), 1 μL de Turbo DNase (Zymo Research, EUA) e levando a incubação a 37°C por 30 min. Em seguida adicionaram-se 3 μL do reagente de inativação da DNase (Zymo Research, EUA), vortexando a amostra que, após descanso em temperatura ambiente por 2 min, foi centrifugada a 10.000 x g por 2 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a concentração de RNA foi determinada por leitura a OD₂₆₀ e a qualidade pela razão OD₂₆₀/OD₂₈₀ em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop, EUA).

Para a síntese de cDNA, foi feita uma reação de transcriptase reversa (RT-PCR) utilizando 1 μg de RNA total, para 1 μL de oligonucleotídeos hexâmeros randômicos 50 ng/ μL , 1 μL de dNTPs 10 mM, 4,75 μL de tampão de PCR 5X, 1 μL de DTT 10 mM, 1 μL de inibidor de ribonuclease 40 U/ μL , e 0,25 μL de Superscript III 200 U/ μL , para volume final de 20 μL por amostra. O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações de PCR quantitativo.

5.4. Reações de PCR quantitativo (qPCR)

Para as reações de PCR quantitativo em ensaios de multiplex (TaqMan®) para os genes *Per1* e *Bmall*, as soluções tiveram primers contendo 300 ηM e probes 200 ηM (Tabela 2), Kapa Probe 2X (Kapa Biosystems, EUA). Cada solução foi aliquoteada (suficiente para 3 poços) em tubos eppendorf e o cDNA de cada amostra foi adicionado (3 uL/3 poços). As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa experimental (10 uL/poço). Os ensaios foram realizados em um termociclador i5 (BioRad, EUA) nas seguintes condições: 3 min a 95°C, seguido por 45 ciclos de 15 seg a 95°C e 30 seg a 55°C.

Para as reações em ensaio usando SybrGreen, para o gene normalizador *Rpl0*, e genes de receptores *Npra*, *Nprb*, *Nprc* foram preparadas soluções independentes contendo 300 ηM de cada primer (Tabela 2) e Kapa SYBR® Fast qPCR Master Mix (2x) (Kapa Biosystems, EUA). Cada solução foi aliquoteada em tubos *eppendorf* e o cDNA de cada amostra adicionado (50 ng). As soluções já com cDNA foram então distribuídas em duplicatas nos poços da placa experimental (10 μL/poço). Os ensaios SYBR® GreenER™ foram realizados em um termociclador iQ5 (BioRad, EUA) nas seguintes condições: 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

Para os genes *Ucp1*, *Pgclα*, *Cidea*, *Prdm16*, *Lcad*, *Cpt1α*, e para o gene normalizador *Rpl0* foram preparadas soluções contendo os *primers* nas concentrações de 300 ηM (Tabela 2) e Power SYBER Green Mix (2x) (Applied Biosystems, EUA) em um volume final de 5 μL. As soluções foram distribuídas em duplicatas nos 384 poços da placa experimental já contendo 1 μL cDNA (12,5 ng). Os ciclos de amplificação no equipamento Quantum Studio 6 Flex PCR System (Applied Biosystems, EUA) foram: 50°C por 1 min, 95°C por 10 min, 50 ciclos de 15 seg a 95°C seguido de 1 min a 60°C; 70 ciclos de 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min com aumento gradual de 0,5°C até atingir 95°C.

Os resultados de PCR quantitativo foram analisados através do método de $\Delta\Delta C_T$ (Livak & Schmittgen, 2001). O valor de C_T é o número de ciclos obtido passando-se uma reta definida como limiar que cruza as porções de crescimento geométrico das curvas de amplificação. Sabendo-se o C_T , é encontrado ΔC_T que é a diferença entre esse valor para o gene de interesse e o valor para *Rpl0* da mesma amostra de cDNA (ambos

correspondendo à média de poços triplicados ou duplicados do mesmo cDNA). A seguir, obtém-se o $\Delta\Delta C_T$ subtraindo a média do grupo controle dos valores encontrados para cada amostra dos grupos controle e experimentais. O exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) foi utilizado nas análises estatísticas. As possíveis diferenças entre os animais selvagens e nocautes expostos às diferentes temperaturas (e no caso dos genes de relógio de dia e de noite) foram analisadas por *Two Way* ANOVA seguida por Bonferroni, aceitando-se nível de significância para $p < 0,05$.

A Tabela 2 abaixo apresenta as sequências dos *primers* desenhados e sintetizados para genes do relógio (*Per1* e *Bmal1*), receptores *Npra*, *Nprb*, *Nprc* e genes da via termogênica (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Cidea*, *Prdm16*, *Lcad*, *Cpt1a*) e o normalizador (*Rpl0*).

Tabela 2. Sequências e concentrações finais dos *primers* e *probes* utilizados.

Templates número de acesso	Primers e Probes para <i>Mus musculus</i>
<i>mPer1</i> NM_0011065.5	Forward:AGCAGG TTCAGGCTAACCAGGAAT Reverse: AGGTGTCCTGGTTTCGAAGTGTGT Probe:5'–/6FAM/AGCCTTGTGCCATGGACATGTCTACT/3BHQ_1/–3'
<i>mBmal1</i> NM_001243048	Forward-AAGCTTCTGCACAATCCACAGCAC Reverse-TGTCTGGCTCATTGTCTTCGTCCA Probe:5'–/5HEX/AAAGCTGGCCACCCACGAAGATGGG/3BHQ_1/–3'
<i>Ucp1</i> NM_009463.3	Foward:CGTCCCCTGCCATTTACTGT Reverse:GACCCGAGTCGCAGAAAAGA
<i>Npra(1)</i> NM_008727.5	Forward:CCACTTTTCCACACTGGAGGT Reverse: AGCAGGGAGCCATAATTGGAG
<i>Nprb(2)</i> NM_173788.4	Forward:CGGGAGTCACCTTCATCATGT Reverse: TGTCATGAGCGAGCCGTAA
<i>Nprc(3)</i> NM_008728.2	Forward:GATGCTCGCTCTGTTTCGC Reverse: GTCACCACTGGCACACATGA
<i>Rpl0</i> NM_007475.5	Foward: TTTGACAACGGCAGCATTTA Reverse: CCATTGATGATGGAGTGTGG
<i>Pgc1a</i> NM_008904.2	Foward: CCAGAGTCACCAAATGACCCC Reverse: GAGGACTTGCTGAGTTGTGC

<i>Cidea</i> NM_007702.2	Foward: AGGCCGTGTTAAGGAATCTGC Reverse: TAGACCAGGAACTGTCCCGT
<i>Prdm16</i> NM_001291026.1	Foward: ACAGGGTAGAAAAGCGGAAGG Reverse: TATGGCTGACATCTGGGGGT
<i>Lcad</i> NM_007381.4	Foward: TCTTTTCCTCGGAGCATGACA Reverse: GACCTCTCTACTCACTTCTCCAG
<i>Cpt1a</i> NM_013495.2	Foward: CTCCGCCTGAGCCATGAAG Reverse: CACCAGTGATGATGCCATTCT



Este trabalho buscou evidenciar o papel do canal TRPA1 nas respostas termogênicas de camundongos a desafio de 22°C crônico em comparação com animais mantidos em termoneutralidade, 30°C.

1. Termoneutralidade

A compreensão do estado metabólico do animal em resposta a temperatura do ambiente é importante. Pois através dela podemos identificar indiretamente a energia despendida em prol de ajustes fisiológicos, como exemplo respostas a diferentes desafios de temperatura ambiental. Dessa forma, iniciamos por determinar a zona termoneutra ambiental dos animais WT e *Trpa1* KO, para estabelecimento de temperatura na qual não haja gasto energético para manutenção de temperatura corpórea.

Ao avaliar a zona termoneutra dos animais utilizados neste estudo verifica-se que enquanto a termoneutralidade se inicia ao redor de 23,5°C para animais WT e se prolonga até 33,5°C, os camundongos nocautes para o canal exibem consumo de O₂ constante entre 26 e 36°C (Figura 7). Assim, optamos por usar a temperatura 30 ± 1°C como controle, já que ambos os genótipos compartilham essa temperatura em suas faixas termoneutras. Skop e colaboradores (2020), avaliando animais triplo KO dos canais *Trpv1*, *Trpa1* e *Trpm8*, definiu 29°C, como temperatura termoneutra. Compreender a fisiologia térmica de camundongos permite melhores respostas ao trabalhar com animais na zona de termoneutralidade evitando indução de frio e possíveis efeitos aditivos a atividade termogênica (Skop et al., 2020).

Thermoneutrality Range

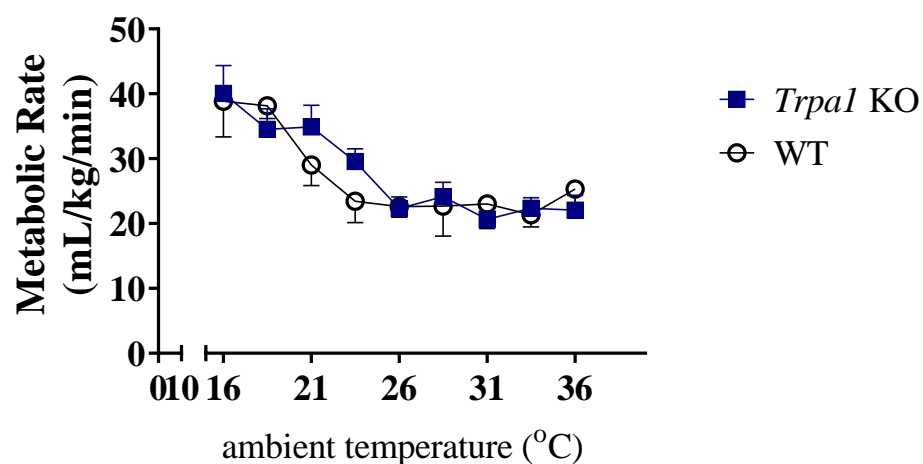


Figura 7. Determinação de zona de termoneutralidade de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a diferentes temperaturas (10 a 36°C) durante a fase clara. Os valores são a média do consumo de O₂ ± EPM em cada temperatura. n=6.

2. Peso corporal

A participação de canais TRP no ganho de peso tem sido demonstrada por diferentes grupos (Ma et al., 2012; Duan et al., 2015; Lee et al., 2015; Mahajan et al., 2020). Uma vez que o canal TRPA1 é um clássico sensor de temperaturas baixas (Winter et al., 2017; Sinica et al., 2020) e que estímulos de frio podem induzir aumento da atividade do BAT (Yu et al., 2015; Chouchani, et al., 2016; Iwen et al., 2017), acompanhamos a variação do peso corpóreo de ambos os genótipos após 2 ou 4 semanas a 22°C, comparado a 30°C. Através da análise de delta de peso podemos observar que após duas semanas, os animais WT não apresentaram diferença de ganho de peso entre 30 e 22°C (Figura 8A). Ademais, em 30°C WT e *Trpa1* apresentaram o mesmo peso corporal, indicando que a ausência do canal *Trpa1* em condição de termoneutralidade não exerce efeito sobre o ganho de peso. Por outro lado, animais nocautes para o canal *Trpa1* submetidos ao desafio de frio apresentaram menor ganho de peso em comparação aos animais *Trpa1* KO mantidos em 30°C ou WT desafiados a 22°C (Figura 8A). Nos estudos onde foi avaliado o ganho de peso em animais WT e nocautes para um dos canais TRP submetidos a dieta padrão não foi observada nenhuma alteração deste parâmetro; entretanto é importante destacar que as análises não foram realizadas em condições de termoneutralidade. Por outro lado, quando os animais são submetidos a dieta hiperlipídica é observado um maior ganho de

peso em animais que não expressam canais TRP em relação aos animais WT (Ma et al., 2012; Duan et al., 2015; Lee et al., 2015). Dentre os canais que têm sido envolvidos no ganho de peso induzido por dieta destacam-se os canais TRPV1, TRPV2, TRPM8 e TRPA1 (Ma et al., 2012; Duan et al., 2015; Lee et al., 2015).

Quando comparamos as respostas obtidas nos protocolos de 2 e 4 semanas podemos destacar os seguintes pontos: 1) somente no protocolo de 4 semanas de exposição ao frio foi observada uma redução de ganho de peso em comparação aos animais em termoneutralidade; 2) no protocolo de 4 semanas observamos redução no ganho de peso entre os animais WT e *Trpa1* nocautes mantidos em 30°C, resposta que não foi observada no protocolo de 2 semanas; 3) a diferença de ganho de peso observada entre os animais WT e *Trpa1* KO mantidos por 2 semanas em 22°C não foi observada no protocolo de 4 semanas (Figura 8A e B). Assim podemos concluir que: 1) é necessário um maior tempo de exposição ao frio dos animais WT para se observar alteração de ganho de peso; 2) em termoneutralidade, a redução do ganho de peso é dependente do tempo de permanência dos animais em zona termoneutra; 3) os animais nocautes para o canal TRPA1 parecem sofrer algum mecanismo de compensação quando desafiados ao frio, fato que explicaria a ausência de diferença de ganho de peso no protocolo de 4 semanas.

Por fim é importante destacar que animais WT entram na zona termoneutra em uma temperatura muito próxima à temperatura deste desafio térmico sendo, portanto, necessário um maior tempo em zona termoneutra e/ou em 22°C para se observar alteração deste parâmetro.

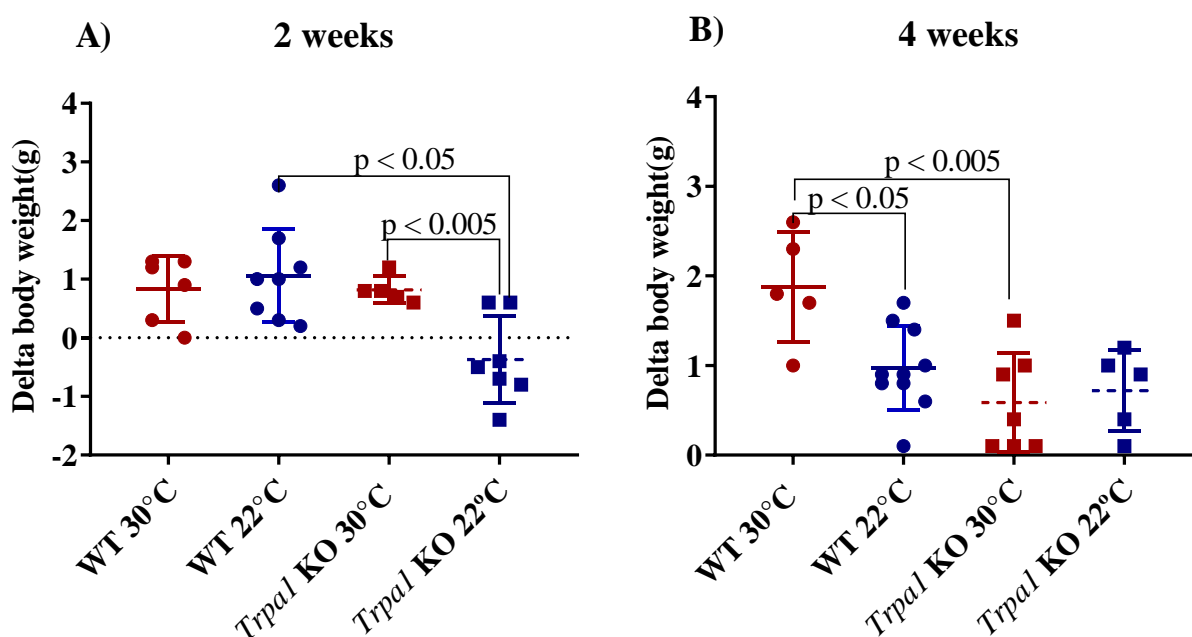


Figura 8. Delta de peso corporal de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a temperatura de 22°C em comparação com animais expostos a 30°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas. Two-Way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. n=5-8.

Em função dos resultados obtidos, avaliamos a via termogênica nesses animais para saber se a redução no ganho de peso pode estar relacionada com aumento da atividade termogênica do BAT.

3. Expressão gênica de receptores *Npra*, *Nprb* e *Nprc*

Sabendo da importância dos NPs na promoção de ajustes do metabolismo lipídico no BAT frente a diminuição de temperatura, passamos a avaliar qual seria o comportamento da expressão gênica de seus receptores frente ao desafio de 22°C. Avaliamos os genes *Npra*, *Nprb*, *Nprc* no BAT de animais selvagens e nocautes para *Trpa1* expostos por duas ou quatro semanas a 30 e 22°C.

Os níveis de expressão de *Npra* em animais WT e nocautes não oscilaram entre dia e noite, porém a expressão de *Npra* em animais nocautes na fase escura (ZT14) após duas semanas foi menor quando comparada com selvagens na mesma condição (Figura 9A). Após quatro semanas de exposição ao frio essa diferença não foi observada entre os genótipos, ou entre dia e noite (Figura 9B)

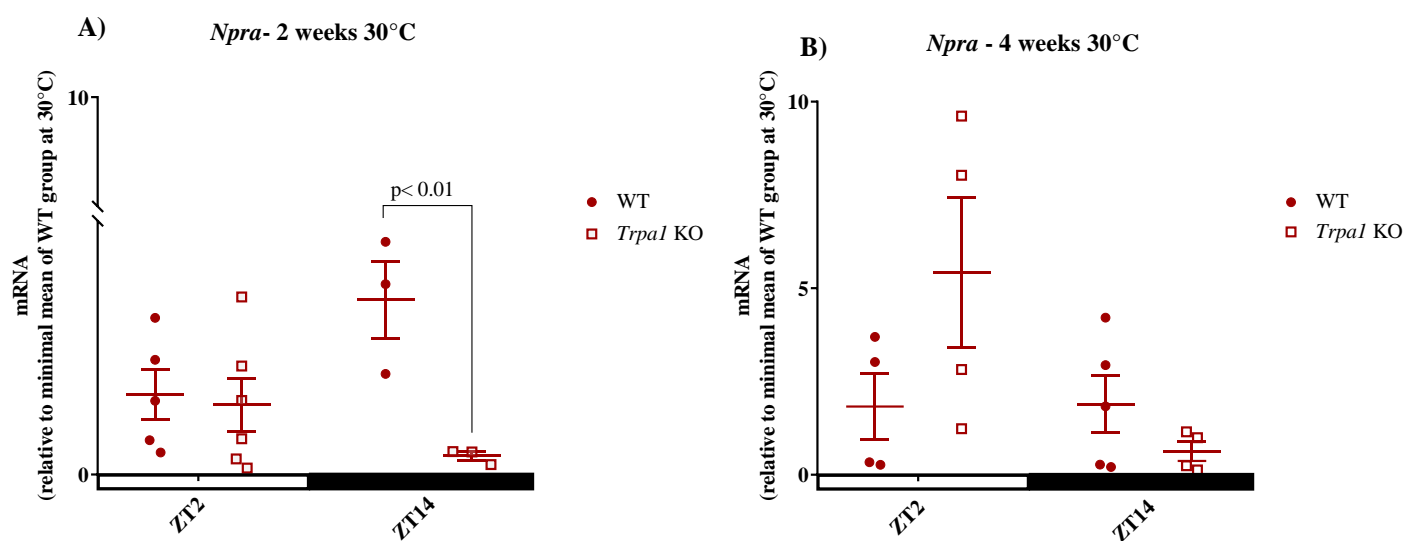


Figura 9. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de *Npra* no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a temperatura de 30°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas. Valores estão apresentados como a expressão média (n=3-6) ± SEM, relativos à menor média encontrada no grupo controle (WT a 30°C), respectivamente após duas e quatro semanas. O valor de p foi obtido através de *Two-Way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Colchetes mostram as diferenças entre genótipos no mesmo ZT.

Após caracterizarmos o perfil de expressão de *Npra* no BAT em termoneutralidade buscamos avaliar como esse gene estaria se comportando em desafio a temperatura de 22°C. Após duas semanas, não houve oscilação entre os horários do dia escolhidos (Figura 10A), porém os animais nocautes tiveram menores níveis de transcritos quando comparados aos selvagens nos dois horários. No protocolo de 4 semanas a temperatura de 22°C constatamos redução na expressão de *Npra* apenas no ZT14 quando comparado animais WT aos *Trpa1* KO (Figura 10B).

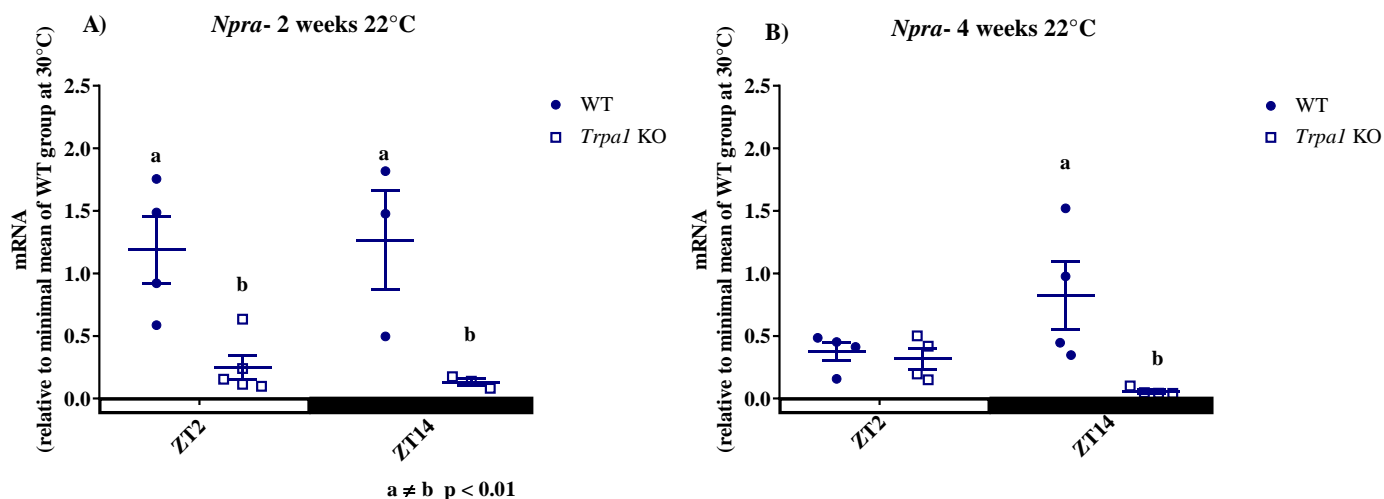


Figura 10. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de *Npra* no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a temperatura de 22°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas. Valores estão apresentados como a expressão média (n=3-5) ± SEM, relativos à menor média encontrada no grupo controle (WT a 30°C), respectivamente após duas e quatro semanas. O valor de p foi obtido através de *Two-Way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Letras representam as diferenças na expressão gênica entre os genótipos no mesmo horário.

A Figura 11 mostra os mesmos resultados acima, mas comparando agora os valores entre as duas temperaturas após duas e quatro semanas. Pode-se notar que após duas semanas a temperatura de 22°C não interferiu na expressão de *Npra* no BAT de animais selvagens e nocautes; já no BAT de animais *Trpa1* KO após 4 semanas os níveis de transcritos do tratamento a 22°C no ZT2 foram reduzidos (Figura 11B).

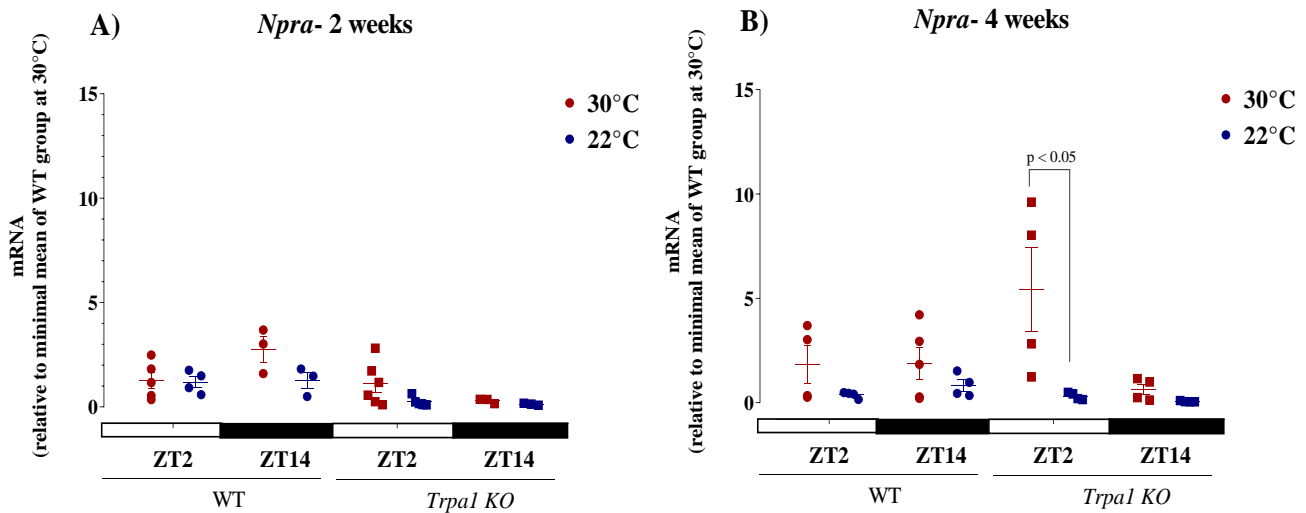


Figura 11. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de *Npra* no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a temperatura de 22°C em comparação com 30°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas. Valores estão apresentados como a expressão média (n=3-6) ± SEM, relativos à menor média encontrada no grupo controle (WT a 30°C), respectivamente após duas e quatro semanas. O valor de p foi obtido através de *Two-Way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Colchetes mostram as diferenças no mesmo genótipo entre as temperaturas.

O segundo gene de receptores de NPs avaliado foi o *Nprb*. Os resultados mostraram que no BAT de animais selvagens ou *Trpa1* KO, após 2 ou 4 semanas a 30°C, não houve diferença evidente entre dia e noite ou entre os genótipos (Figura 12A, B).

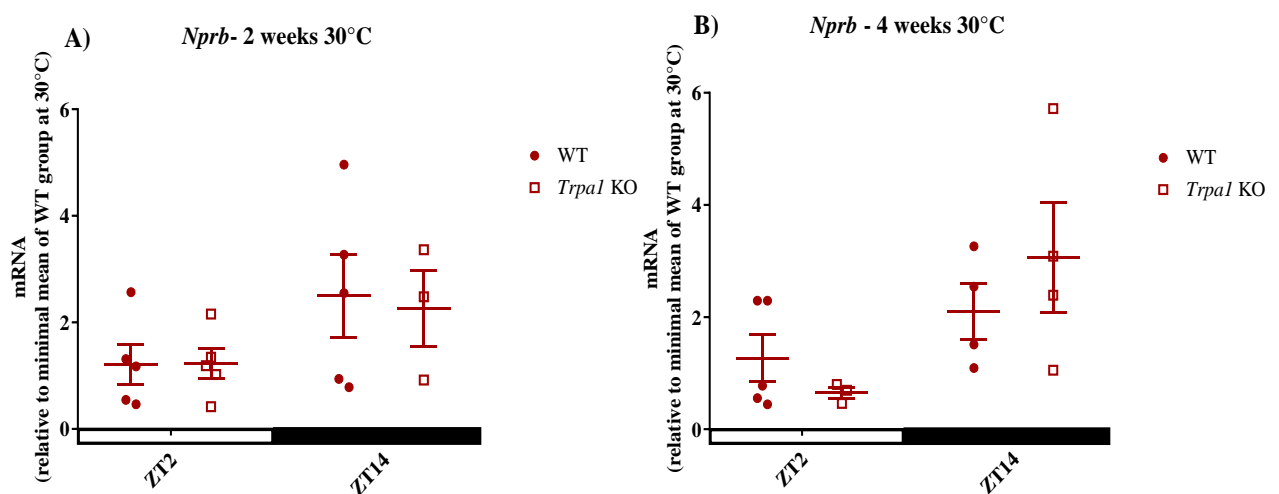


Figura 12. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de *Nprb* no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a temperatura de 30°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas. Valores estão apresentados como a expressão média (n=4-5) ± SEM relativos à menor média encontrada no grupo controle (WT a 30°C), respectivamente após duas e quatro semanas. *Two-Way* ANOVA.

Após submetermos ambos os genótipos ao desafio de 22°C, podemos observar que o gene *Nprb* passa a oscilar no selvagem apresentando menor expressão no escuro, enquanto o nocaute não apresentou mudanças (Figura 13A). Após 4 semanas, os transcritos de *Nprb* não mais oscilam entre dia e noite nos animais WT, e passam a oscilar nos nocautes, com maior expressão à noite (Figura 13B).

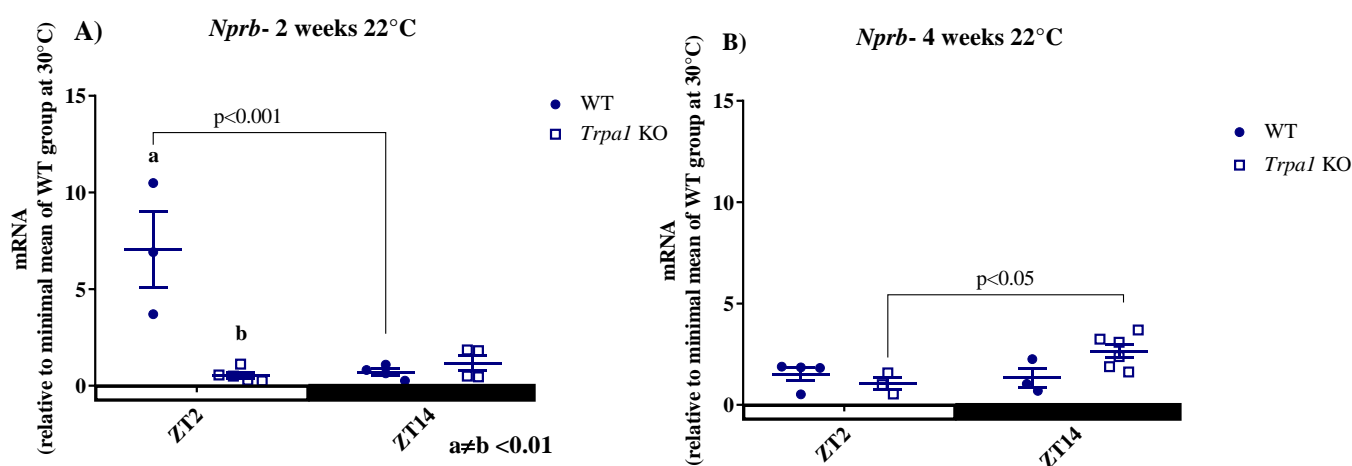


Figura 13. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de *Nprb* no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a temperatura de 22°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas. Valores estão apresentados como a expressão média (n=3-6) ± SEM relativos à menor média encontrada no grupo controle (WT a 30°C), respectivamente após duas e quatro semanas. O valor de p foi obtido através de *Two-Way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Letras representam as diferenças na expressão gênica entre os genótipos no mesmo horário e colchetes mostram as diferenças no mesmo genótipo entre os ZTs.

A Figura 14 mostra os valores de expressão do gene *Nprb* no BAT em cada genótipo no ZT2 e ZT14 após duas e quatro semanas a 22 e 30°C. Fica evidente que o gene *Nprb* é positivamente regulado no ZT2 a 22°C em animais selvagens após 2 semanas (Figura 14A). Porém esse efeito após 4 semanas não foi observado (Figura 14B). O que

nos faz acreditar que animais selvagens, submetidos a condição de 22°C por duas semanas vindo de 30°C, passam a ter um incremento nos números de transcritos a favor de um possível ajuste termogênico no ZT2, porém esse efeito não é visto após 4 semanas (Figura 14B) provavelmente devido ao suporte de outras vias de controle de temperatura corpórea acionadas, fazendo com que esse efeito sobre o gene seja reduzido. Novamente no animal nocaute avaliado, não houve resposta temporal ou às diferentes durações do estímulo de temperatura.

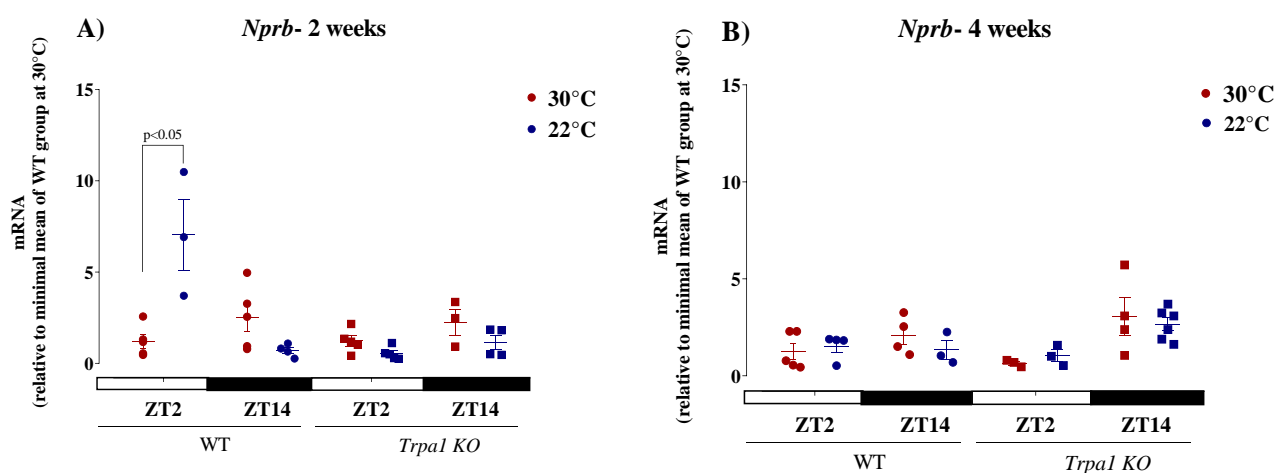


Figura 14. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de *Nprb* no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a temperatura de 22°C em comparação com 30°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas. Valores estão apresentados como a expressão média (n=3-6) ± SEM, relativos à menor média encontrada no grupo controle (WT a 30°C), respectivamente após duas e quatro semanas. O valor de p foi obtido através de *Two-Way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Colchetes mostram as diferenças no mesmo genótipo entre as temperaturas.

Por fim investigamos a expressão do *Nprc* no BAT de camundongos selvagens e nocautes para *Trpa1* KO, nas mesmas condições descritas anteriormente. Observamos que, após duas semanas a 30°C, o gene *Nprc* em camundongos selvagens apresentou maiores valores de transcritos quando comparados aos nocautes nos mesmos horários, e ambos não apresentaram oscilações entre dia e noite (Figura 15A). Após 4 semanas foi observado o retorno aos níveis basais de transcritos, sem diferenças significativas entre horários ou entre genótipos (Figura 15B).

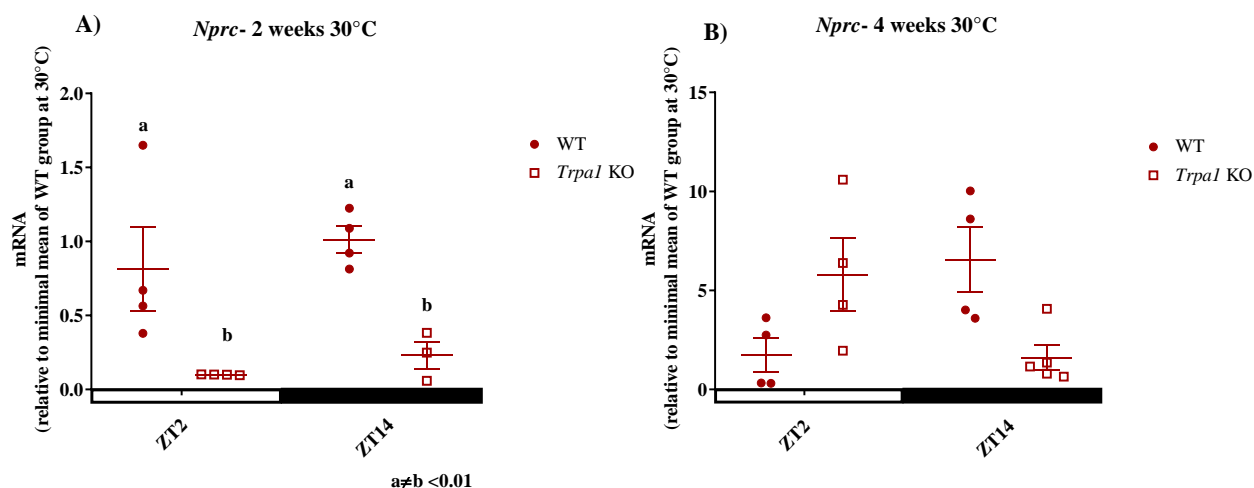


Figura 15. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de *Nprc* no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a temperatura de 30°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas. Valores estão apresentados como a expressão média (n=3-5) ± SEM relativos à menor média encontrada no grupo controle (WT a 30°C), respectivamente após duas e quatro semanas. O valor de p foi obtido através de *Two-Way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Letras representam as diferenças na expressão gênica entre os genótipos no mesmo horário.

Após duas e quatro semanas a 22°C, observamos que animais selvagens, apesar da grande dispersão de valores, tiveram maior expressão de *Nprc* de dia, semelhante ao observado a 30°C, mas os nocautes perderam a oscilação de transcritos mediante a exposição ao desafio de temperatura (Figura 16A). E após 4 semanas, também de forma similar a 30°C, não foram observadas diferenças na expressão desse gene no BAT, entre dia e noite ou entre genótipos (Figura 16B).

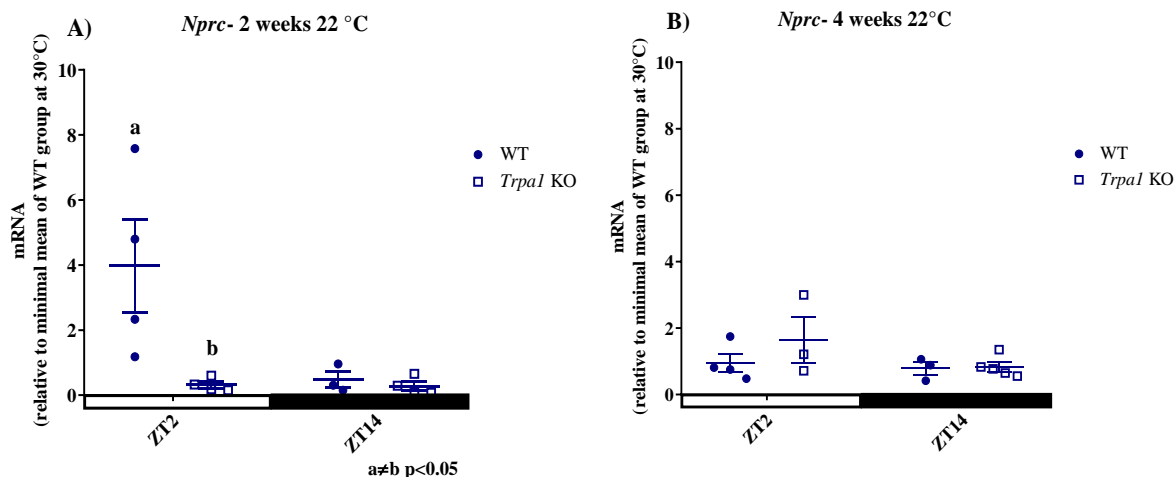


Figura 16. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de *Nprc* no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a temperatura de 22°C após (A) duas semanas e (B) quatro semanas. Valores estão apresentados como a expressão média (n=3-5) ± SEM relativos à menor média encontrada no grupo controle (WT a 30°C), respectivamente após duas e quatro semanas. O valor de p foi obtido através de *Two-Way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Letras representam as diferenças na expressão gênica entre os genótipos no mesmo horário.

Plotando todos os resultados para o gene *Nprc* no BAT, não foi verificada variação em sua expressão entre temperaturas ou genótipos após 2 semanas (Figura 17A). Após quatro semanas, os resultados mostraram uma regulação negativa dos níveis de expressão de *Nprc* no BAT de camundongos selvagens expostos a temperatura de 22°C à noite quando comparados a selvagens no mesmo horário expostos a 30°C. Não foi observado efeito das diferentes temperaturas em camundongos *Trpa1* KO, em nenhum dos períodos ou horários do dia (Figura 17B).

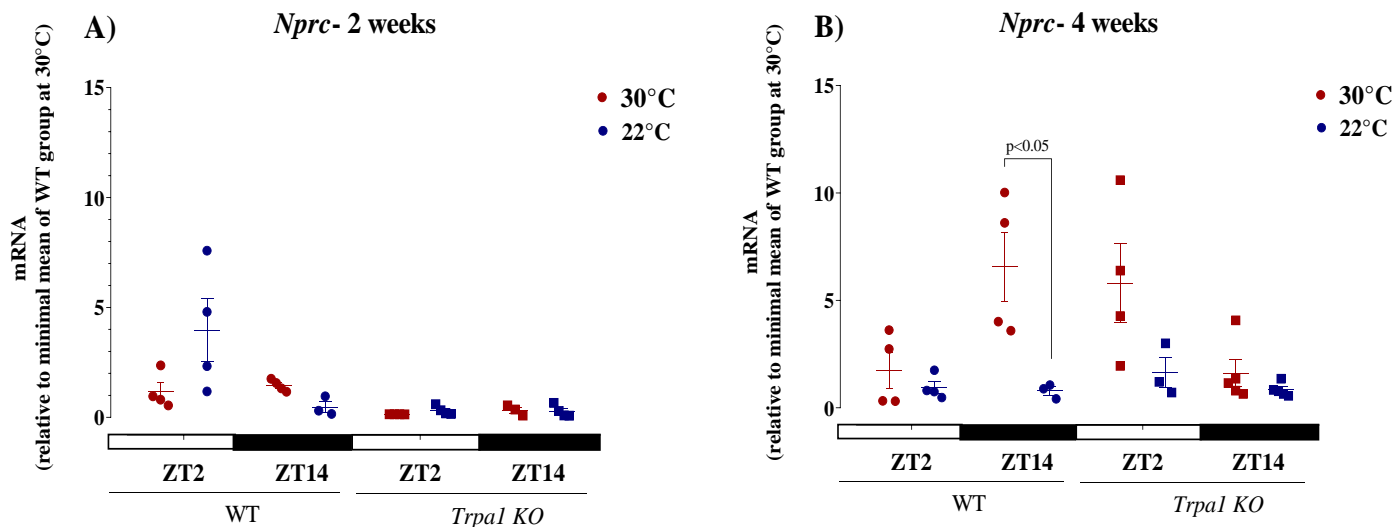


Figura 17. Expressão de *Nprc* no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a temperatura de 30 ou 22°C em após (A) duas semanas e (B) quatro semanas. Valores estão apresentados como a média (n=2-4) da expressão \pm SEM relativos a menor média encontrada no grupo controle (WT a 30°C), respectivamente após duas e quatro semanas. O valor de p foi obtido através de *Two-Way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Colchetes mostram as diferenças no mesmo genótipo entre as temperaturas.

Estudar os efeitos causados pelos peptídeos natriuréticos (NPs), enfatizando a sua importância como hormônios atuando na regulação da energia corpórea e do metabolismo lipídico, tem sido essencial para compreender a ação desses sobre a fisiologia dos mais diversos órgãos (Lafontan et al., 2008; Bordicchia et al., 2012; Coué & Moro, 2016).

Os resultados apresentados até aqui mostraram que, após duas semanas, não houve oscilação na expressão dos receptores *Npra*, *Nprb* e *Nprc* no BAT entre as fases claro e escuro, em ambos os genótipos. Porém em animais selvagens submetidos a 22°C a oscilação entre dia e noite foi observada nos genes *Nprb* e *Nprc*, com maior pico no período de luz.

Um estudo de Smith e colaboradores (2015) evidenciou que os genes *Npra* e *Nprc* regulam a atividade metabólica durante a fase de repouso (fotofase). Considerando que em baixa temperatura o animal necessita de um suporte fisiológico para regular a taxa metabólica e a manutenção da temperatura corpórea, o aumento da expressão desses genes no BAT em resposta ao frio é esperado.

Em quatro semanas o efeito do desafio de temperatura pode ter ocasionado uma nova aclimação do animal ao ambiente, fazendo com que os transcritos tenham retornado a níveis basais. Nossos experimentos mostraram que animais nocautes e selvagens submetidos a temperatura de 22°C não apresentaram resposta evidente no incremento do número transcritos após esse período mais longo.

Buscamos uma nova análise avaliando os níveis de transcritos após duas e quatro semanas onde a expressão gênica total (ZT2+ZT14) dos receptores de NPs, *Npra*, *Nprb* e *Nprc*, foi considerada (Tabelas 3 a 5 a seguir).

Verificamos que houve uma diminuição significativa dos transcritos do receptor *Npra* nos animais WT ou *Trpa1* KO (Tabela 3) após 4 semanas a 22°C quando comparados a 2 semanas a 22°C, quando não havia diferença entre 30° e 22°C. O que vemos é a ausência de efeito aditivo após duas semanas do desafio de temperatura 22°C sobre a expressão global de *Npra* no BAT de animais selvagens e nocautes, porém após 4 semanas curiosamente os níveis de *Npra* mostraram-se reduzidos em animais selvagens e ainda menores quando avaliamos no animal *Trpa1* KO.

Tabela 3. Efeito da duração do desafio a frio sobre a expressão do gene *Npra* em camundongos WT e *Trpa1* KO.

Total <i>Npra</i> mRNA			
WT			
	30°C	22°C	p*
2 weeks	1.83 ± 0.4	1.22 ± 0.2	0.2294
4 weeks	1.86 ± 0.5	0.20 ± 0.06	<0.05
p**	0.3914	<0.0001	
<i>Trpa1</i> KO			
	30°C	22°C	p*
2 weeks	0.83 ± 0.3	0.59 ± 0.15	0.5196
4 weeks	3.02 ± 1.3	0.18 ± 0.06	<0.05
p**	0.104	<0.05	

*p para diferenças entre 22 e 30°C após duas e quatro semanas. Os valores foram normalizados pela menor média encontrada no grupo controle a 30°C.

**p para diferenças entre 2 e 4 semanas a 30°C ou 22°C Os valores foram normalizados pela menor média encontrada no grupo controle a 30°C.

Já para o gene *Nprb*, os transcritos não se alteraram significativamente em animais WT ou *Trpa1* KO (Tabela 4) após 4 semanas a 22°C quando comparados a 2 semanas a 22°C, ou entre 30° e 22°C, após 2 ou 4 semanas.

Tabela 4. Efeito da duração do desafio a frio sobre a expressão do gene *Nprb* em camundongos WT ou *Trpa1* KO

Total <i>Nprb</i> Mrna			
WT			
	30°C	22°C	p*
2 weeks	1.85 ± 0.4	3.41 ± 1.4	0.263
4 weeks	1.64 ± 0.3	1.43 ± 0.2	0.6554
p**	0.7136	0.2129	
<i>Trpa1</i> KO			
	30°C	22°C	p*
2 weeks	1.61 ± 0.3	0.81 ± 0.2	0.0607
4 weeks	2.02 ± 0.7	2.11 ± 0.3	0.9105
p**	0.5933	<0.005	

*p para diferenças entre 22 e 30°C após duas e quatro semanas. Os valores foram normalizados pela menor média encontrada no grupo controle a 30°C.

**p para diferenças entre 2 e 4 semanas a 30°C ou 22°C Os valores foram normalizados pela menor média encontrada no grupo controle a 30°C.

Esperava-se que o RNAm do receptor NPRC estivesse aumentado após desafios de frio, diminuindo assim a *clearance* dos NPs plasmáticos, aumentando sua disponibilidade aos outros receptores (Potter, 2011; Bordicchia et al., 2012; Collins, 2014). De fato, houve uma diminuição significativa dos transcritos nos animais WT a 22°C após 4 semanas comparados com 30°C e entre 2 e 4 semanas a 22°C (Tabela 5), confirmando os dados da literatura para esse receptor. Dada essa premissa, os níveis de NPs plasmáticos por nós mensurados (Figuras 18 e 19) deveriam ter aumentado, o que como veremos a seguir, não foi observado.

Já os animais nocautes para o canal TRPA1 apresentaram decréscimo de RNAm após 4 semanas a 30 ou a 22°C quando comparados a 2 semanas nessas temperaturas (Tabela 5), evidenciando comportamento diferente do apresentado pelos animais selvagens.

Tabela 5. Efeito da duração do desafio a frio sobre a expressão do gene *Nprc* em camundongos WT ou *Trpa1* KO

Total <i>Nprc</i> Mrna			
WT			
	30°C	22°C	p*
2 weeks	0.91 ± 0.1	2.47 ± 1.4	0.1358
4 weeks	4.15 ± 4.3	0.87 ± 0.1	0.0298
p**	<0.05	0.1564	
<i>Trpa1</i> KO			
	30°C	22°C	p*
2 weeks	0.15 ± 0.04	0.29 ± 0.07	0.1542
4 weeks	3.46 ± 1.1	1.13 ± 0.2	0.0715
p**	<0.05	<0.05	

*p para diferenças entre 22 e 30°C após duas e quatro semanas. Os valores foram normalizados pela menor média encontrada no grupo controle a 30°C.

**p para diferenças entre 2 e 4 semanas a 30°C ou 22°C Os valores foram normalizados pela menor média encontrada no grupo controle a 30°C.

Tendo em vista que: 1) os transcritos de *Npra*, *Nprb* e *Nprc* diminuíram de 2 para 4 semanas a 22°C; 2). Após 4 semanas *Npra* e *Nprc* tiveram também menor expressão a 22°C quando comparada a 30°C; 3) RNAm de *Nprc* foi menor após 4 semanas a 22°C quando comparado a 30°C, decidimos focar os próximos experimentos nas respostas evocadas após 2 semanas a 22°C.

4. NPs plasmáticos

Inicialmente avaliamos os níveis de ANP e BNP plasmáticos em animais mantidos por 2 semanas a 22°C em comparação com os controles a 30°C. Observamos que animais WT mantidos a 22°C em comparativo com animais mantidos na termoneutralidade apresentaram menores concentrações de ambos os hormônios (ANP - 44,0 pg/ml; BNP - 2,6 pg/ml) (Figuras 18 e 19). Em animais nocautes não foram achadas diferenças nos níveis plasmáticos entre animais expostos às duas temperaturas.

A ausência de resposta ou até mesmo níveis menores a 22°C que o basal, poderiam ser explicados pelo fato dessa temperatura não ser estímulo suficiente para induzir a resposta de aumento de secreção de NPs pelos cardiomiócitos, e eventual resposta termogênica adaptativa dar-se-ia exclusivamente pela ativação simpática no BAT.

Outra alternativa, seria que estímulos de abaixamento de temperatura ambiental agudos causariam uma resposta dramática de produção e secreção dos NPs cujo nível, após um período longo, retornaria aos valores basais, enquanto a manutenção prolongada da termogênese ficaria a cargo da via β -adrenérgica. Para esclarecer essa questão, realizamos estímulos de 10°C por 6 horas. E o que observamos foi um incremento de 50 vezes ou mais nas concentrações plasmáticas de BNP (Figura 19), corroborando os dados encontrados em outros estudos de Bordicchia e colaboradores (Bordicchia et al., 2012; 2016; Collins & Bordicchia, 2013).

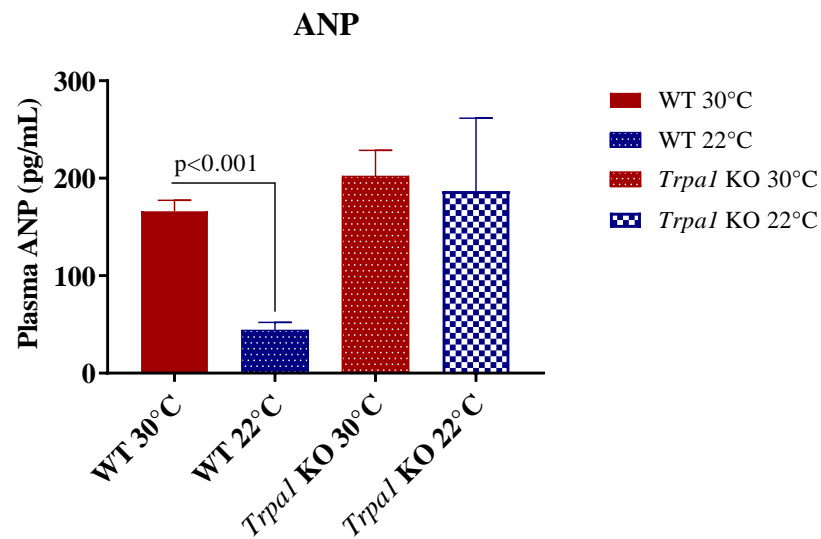


Figura 18. Níveis plasmáticos de ANP em camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a 22°C após duas semanas em comparação com animais mantidos a 30°C. *Two-Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. n=5.

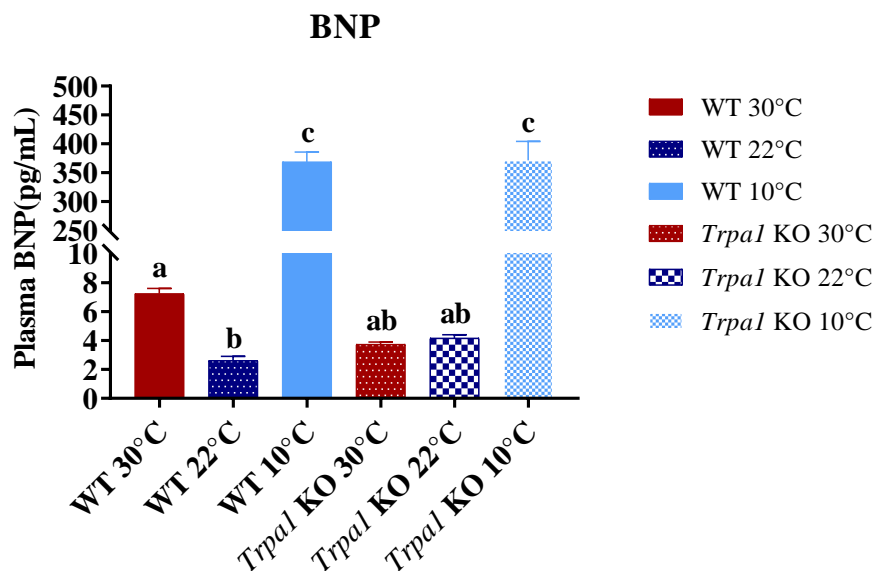


Figura 19. Níveis plasmáticos de BNP em camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a 22°C após duas semanas em comparação com animais mantidos a 30°C ou expostos a 10°C por 6 horas). *Two-Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni (n=5). Letras mostram diferenças entre as concentrações plasmáticas de BNP nos vários tratamentos. a ± b ± c p<0,05; ab ± c, p<0,0001.

Notamos também que os níveis de ANP e BNP não diferiram entre os animais WT e KO para *Trpa1* a 22°C (Figuras 18 e 19) ou, no caso de WT até decresceram, evidenciando que o canal TRPA1 não parece ter um papel essencial na resposta a essa temperatura.

Bordicchia e colaboradores (2012) revelaram o mecanismo da estimulação de adipócitos por NPs, de forma semelhante à das catecolaminas, através de vias paralelas envolvendo, respectivamente PKG e PKA. Por outro lado, esses sinais convergem na ativação de p38MAPK, potencializando positivamente o programa termogênico em tecidos adiposos marrom e branco (*browning*) estimulando biogênese mitocondrial em resposta a expressão elevada de PGC1 α e UCP1 (Wang, 2012; Collins, 2014).

Recentemente Kimura e colegas (2017) demonstraram o efeito do ANP sobre o ajuste de temperatura intracelular de adipócitos marrons, usando uma termosonda de fluorescência, consolidando ainda mais o papel desse hormônio no metabolismo e termogênese do BAT.

Como sabemos, a estimulação da atividade termogênica por baixas temperaturas ambientais não se dá apenas por ação de NPs, mas também por catecolaminas, hormônios da tireoide, irisina e outros. Avaliando a resposta dos níveis de NPs plasmáticos e de RNAm de receptores de NPs ao desafio de temperatura, é muito provável que a regulação fisiológica da termogênese mediada por NPs esteja relacionada a maiores desafios de frio, abaixo de 20°C, ou a respostas agudas (Bordicchia et al., 2012; Carper et al., 2020; Martin et al., 2020). Essa seria uma das explicações que embasariam a ausência de alterações da expressão de genes de receptores *Npra*, *Nprb* e *Nprc* bem como da secreção de ANP e BNP, em animais expostos a 22°C.

5. Expressão gênica de *Per1* e *Bmal1*

O *link* entre canais TRP e genes de relógio foi proposto recentemente por nosso grupo, tendo sido demonstrado que animais nocautes para canais TRPV1 e TRPM8 apresentaram uma redução dos componentes moleculares do relógio do BAT (Moraes et al., 2017a, b). Considerando que os canais TRPA1 são clássicos sensores de temperaturas baixas (Mahajan et al., 2020) e o papel dos genes de relógio na resposta ao frio e no controle dos componentes moleculares da via termogênica (Chappuis et al., 2014; Machado et al., 2018) passamos a avaliar a participação do canal TRPA1 no controle da expressão entre dia/noite em animais nocaute para o canal TRPA1 mantidos em zona termoneutra e desafiados ao frio de 22°C.

Nossos resultados mostraram que no BAT de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} submetidos a temperatura de 30°C após 2 semanas o gene *Per1*, expresso circadianamente em mamíferos, teve maior expressão na fase escura (ZT14), oscilação que foi ausente nos animais nocautes (Figura 20A). Como já descrito na literatura, a expressão de *Bmal1* é maior na fase de claro, em antifase com *Per1*, cujo pico se dá na fase de escuro. Para *Bmal1* observamos que a oscilação do gene no BAT do animal selvagem a 30°C foi mantida entre as fases claro-escuro, maior expressão na fotofase (Figura 20A, B).

Curiosamente, animais nocautes não apresentaram oscilação na expressão dos genes analisados após duas semanas (Figura 20A, B)

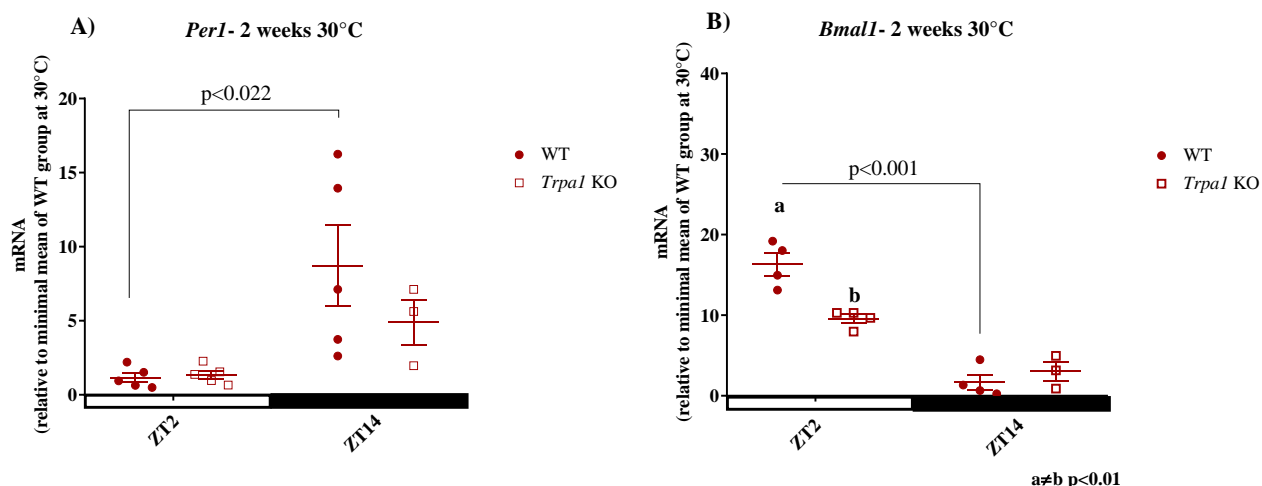


Figura 20. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de (A) *Per1* e (B) *Bmal1* no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a temperatura de 30°C após duas semanas. Valores estão apresentados como a expressão média (n=3-5), ± SEM, relativos à menor média encontrada no grupo controle (WT a 30°C). Letras representam as diferenças na expressão gênica entre os genótipos no mesmo horário e os colchetes mostram as diferenças no mesmo genótipo entre os ZTs. O valor de p foi obtido através de *Two-Way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

Observamos que nos animais WT submetidos a 22°C, a oscilação de *Per1* entre dia e noite foi mantida com maior pico de expressão na fase escura em oposição à a fase clara após duas semanas (Figura 21A). Observou-se que animais selvagens tiveram oscilações de *Bmal1* entre as fases de claro e escuro, oscilação essa não evidente nos animais nocautes (Figura 21 A, B) semelhante ao que foi visto a 30°C (Figura 20A).

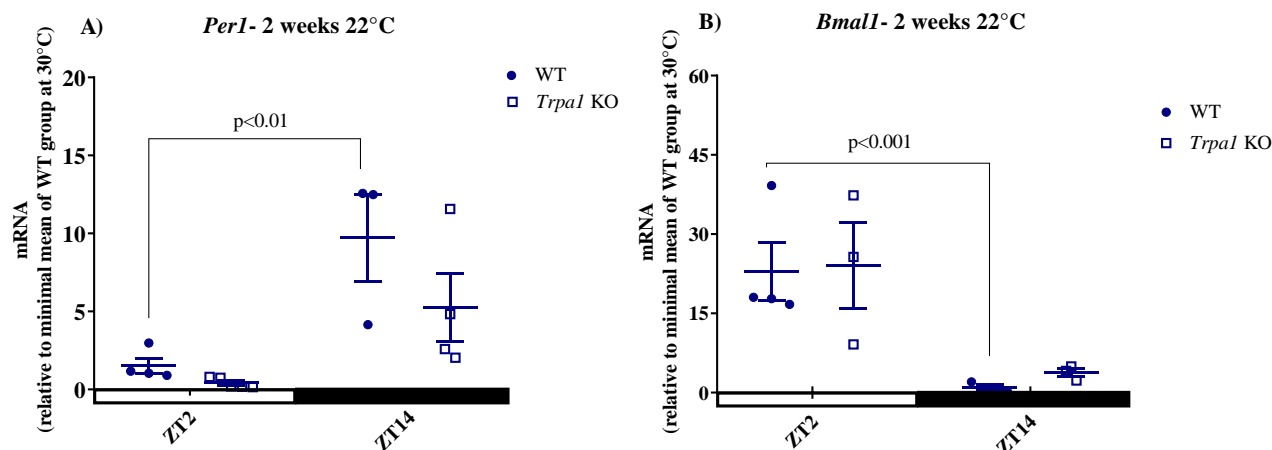


Figura 21. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de (A) *Per1* e (B) *Bmal1* no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a temperatura de 22°C após duas semanas. Valores estão apresentados como a expressão média (n=3-5) ± SEM, relativos à menor média encontrada no grupo controle (WT a 30°C). Colchetes mostram as diferenças no mesmo genótipo entre os ZTs. O valor de p foi obtido através de *Two-Way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

Após comparar a expressão de *Per1* entre os genótipos em temperaturas diferentes em duas semanas, colocamos esses dados nos mesmos gráficos de forma a facilitar a comparação entre os valores de 30 e 22°C. Vimos que a expressão de *Per1* no BAT de camundongos selvagens não foi afetada pela variação de temperatura após duas semanas; porém animais nocautes apresentaram níveis de transcritos reduzidos a 22°C no período de luz, quando comparado com animais em termoneutralidade. (Figura. 22A). Após duas semanas os animais selvagens mantiveram os níveis de transcritos semelhantes entre as temperaturas avaliadas, porém em nocautes a temperatura de 22°C atenuou a expressão do gene (Figura 22A). A Figura 22B compara os padrões de expressão de *Bmal1* em cada genótipo para dia e noite após duas semanas a 30 e 22°C, não tendo sido encontradas diferenças significativas nos níveis de transcritos de *Bmal1* no BAT (Figura 22B).

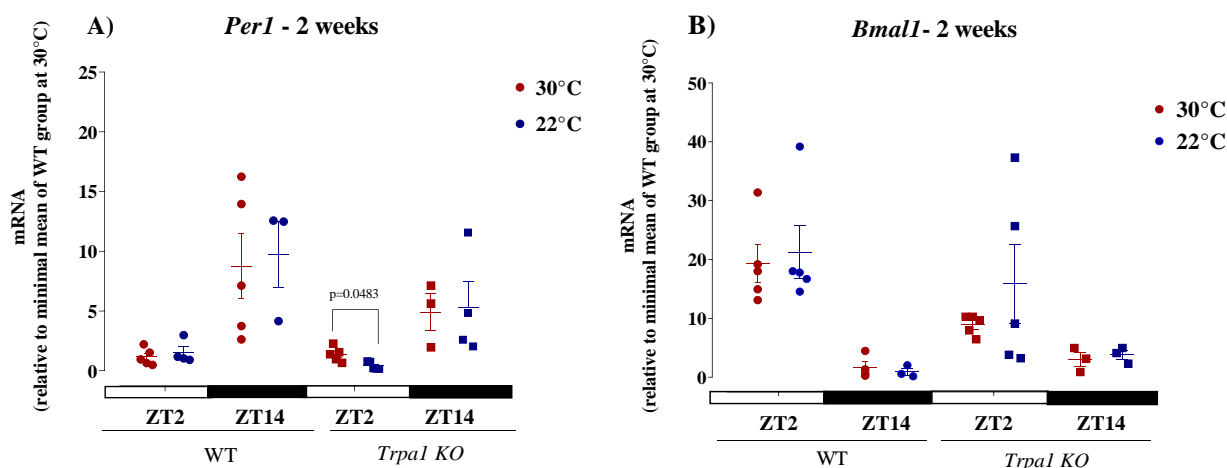


Figura 22. Expressão diurna (ZT2) e noturna (ZT14) de (A) *Per1* e (B) *Bmal1* no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e *Trpa1*^{-/-} expostos a temperatura de 22°C em comparação com 30°C após duas semanas. Valores estão apresentados como a expressão média (n=3-5) ± SEM, relativos à menor média encontrada no grupo controle (WT a 30°C), respectivamente após duas e quatro semanas. Colchetes mostram as diferenças no mesmo genótipo entre as temperaturas. O valor de p foi obtido através de *Two-Way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

É observado para os genes *Per1* e *Bmal1* uma relação em anti-fase, *Bmal1* sendo mais expresso durante a fase clara e *Per1* sendo mais expresso opostamente na fase escura, tal característica é descrita classicamente no NSQ quando a maquinaria do relógio está sincronizada (Buhr & Takahashi, 2013), bem como no BAT e no WAT (Ando, 2005; Yang et al., 2006; Zvonic et al., 2006).

Li e colaboradores (2013) demonstraram que os componentes da maquinaria do relógio como *Cry2*, *Per1*, *Per2* e *CK1ε* no BAT de camundongos não tiveram suas expressões alteradas mesmo após serem expostos ao frio de 4°C por 5 horas, comparados a 24°C. Em nosso protocolo, por se tratar de tratamento crônico a 22°C, pode estar ocorrendo uma redução na expressão de *Per1*, e levando ao comprometimento da regulação fisiológica frente a esse desafio de temperatura.

A expressão do gene *Bmal1* no BAT não foi afetado quando submetidos ao desafio de temperatura proposto por nós. Mas em estímulos agudos, o aumento da expressão de *Bmal1* é essencial, atuando sobre a regulação termogênica, garantindo a expressão de genes envolvidos na termogênese e no metabolismo lipídico *in vivo*, bem como em cultura de adipócitos marrons (Li et al., 2013).

Em camundongos, componentes moleculares do relógio expressos circadianamente são importantes na sinalização simpática e diretamente relacionados com a regulação da expressão de adrenorreceptores $\beta 3$ participantes no controle de temperatura (Guilding & Piggins, 2007; Kalsbeek et al., 2011).

Outros trabalhos enfatizaram a influência de baixas temperaturas sobre o arrastamento de osciladores circadianos (Schibler et al., 2003; Prolo et al., 2005; Buhr et al., 2010) demonstrando assim que os ajustes metabólicos exercidos por genes do relógio são essenciais na garantia do funcionamento ideal de tecidos associados ao controle de temperatura corporal.

Observamos que a ausência do canal TRPA1 comprometeu a resposta oscilatória dos componentes *Per1* e *Bmal1* tanto em animais mantidos em termoneutralidade, como desafiados a 22°C. Em estudos anteriores Moraes e colaboradores (2017a, b) demonstraram que animais nocautes para canais TRPV1 e TRPM8 apresentaram alterações na oscilação de *Per1*, *Per2* e *Bmal1* bem como redução dos componentes moleculares do relógio do BAT. Deve-se mencionar que TRPA1 e TRPM8 são mais sensíveis a temperaturas abaixo de 25°C, enquanto TRPV1 responde a extremos acima de 43°C. O efeito da temperatura de 22°C sobre *Per1* foi mais marcante na ausência do canal, demonstrando uma redução na sua expressão. Acreditamos que essas alterações possam comprometer a temporização do animal com o meio externo, resultando em desarranjos nos eixos fisiológicos envolvidos no metabolismo local do BAT. Para uma melhor interpretação destes resultados, uma análise durante 24 ou 48 horas, com determinação da expressão gênica a cada 3 ou 4 horas é essencial.

5. Genes da via termogênica e metabolismo lipídico (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*, *Lcad*, *Cidea*, *Cpt1a*)

A seguir, investigamos a expressão de genes da via termogênica que, em última instância, levam a aumento da atividade da UCP1 e termogênese adaptativa nos animais WT e nocautes, uma vez que o canal TRPA1 tem sido associado a múltiplos mecanismos moleculares que modulam a via termogênica (Mahajan et al., 2020). Neste contexto, a via de termogênese descrita no banco de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mmu04714), a qual demonstra sucintamente os mecanismos desencadeados pelas vias noradrenérgica e de

NPs sobre a termogênese, foi avaliada para, dentre a grande variedade de componentes regulatórios, selecionarmos para análise genes que poderiam ser modulados durante o desafio de frio.

Foram selecionados seis genes, incluindo aqueles envolvidos na regulação da lipólise, fatores de transcrição e metabolismo energético (fosforilação oxidativa e beta-oxidação mitocondrial), como *Pgc1 α* (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator α*), *Prdm16* (*PR domain containing 16*), *Cpt1 α* (*Carnitine palmitoyltransferase I*), *Cidea* (*cell death activator*), *Lcad* (*long chain acyl-CoA dehydrogenase*) e *Ucp1*, em BAT de animais WT e *Trpa1* KO eutanasiados às 9 h (ZT2), que foram aclimatados em 30°C (termoneutralidade) e 22°C (desafio de frio crônico). A quantificação de RNAm destes alvos, além do normalizador, em uma única placa, foi realizada no laboratório do Prof. José Cipolla-Neto, graças ao auxílio da Dra. Maria Nathalia Moraes.

Nossas análises mostraram que os transcritos de *Pgc1 α* não se alteraram no BAT de animais WT e *Trpa1* KO em função do desafio crônico de 22°C (Figura 23A). Por outro lado, os transcritos de *Prdm16* aumentaram nos animais nocautes a 22°C em comparação a 30°C, evento que resultou em aumento significativo também em relação a selvagens a 22°C (Figura 23B). Também para os genes *Cidea* (Figura 23C) e *Cpt1 α* (Figura 23D), o efeito da exposição crônica a 22°C só foi observado em animais nocautes, evidenciado no aumento de níveis de mRNA. Observou-se que em ambos os genótipos, os níveis de transcrito de *Ucp1* aumentaram significativamente a 22°C, comparados a 30°C; e que em animais nocautes esse efeito foi ainda mais marcante quando comparados aos animais WT também a 22°C (Figura 23E). Semelhante a este efeito, foi observado o aumento de transcritos de *Lcad* em ambos os genótipos também em resposta a 22°C (Figura 23F).

Em resumo, em resposta a 2 semanas de exposição a 22°C, mRNA de *Pgc1 α* não foi afetado em WT ou nocautes; apenas transcritos de *Ucp1* e *Lcad* aumentaram em ambos os genótipos, enquanto os transcritos de *Prdm16*, *Cpt1 α* e *Cidea* só foram aumentados nos animais *Trpa1* KO, ficando evidente a ativação maior da termogênese na ausência do canal.

Não houve diferenças significativas em nenhum dos genes selecionados entre os animais WT e *Trpa1* KO na termoneutralidade. Interessantemente, ao comparar cada genótipo sob as 2 condições de temperatura, os animais WT apresentaram aumento

significativo apenas na expressão da *Lcad* e *Ucp1* no desafio de frio crônico; enquanto os animais *Trpa1* KO demonstraram aumento significativo em todos os genes avaliados no desafio de frio crônico, exceto para *Pgc1α*. Adicionalmente, destacamos que o aumento da expressão destes genes observado nos animais *Trpa1* KO na condição de desafio de frio também pôde ser notado ao compará-los com a expressão gênica dos animais WT neste desafio térmico, incluindo para gene *Ucp1* alterado nos 2 genótipos, onde a ausência do canal proporcionou um aumento significativo comparado aos animais WT. Desta forma, é possível constatar que há um aumento da atividade termogênica em 22°C, que se encontra abaixo da faixa de termoneutralidade de ambos os genótipos, evidenciada pelo aumento da *Ucp1*. No entanto, a ausência do canal sugere um aumento mais acentuado deste processo em uma temperatura na qual ele é ativado (Figura 23).

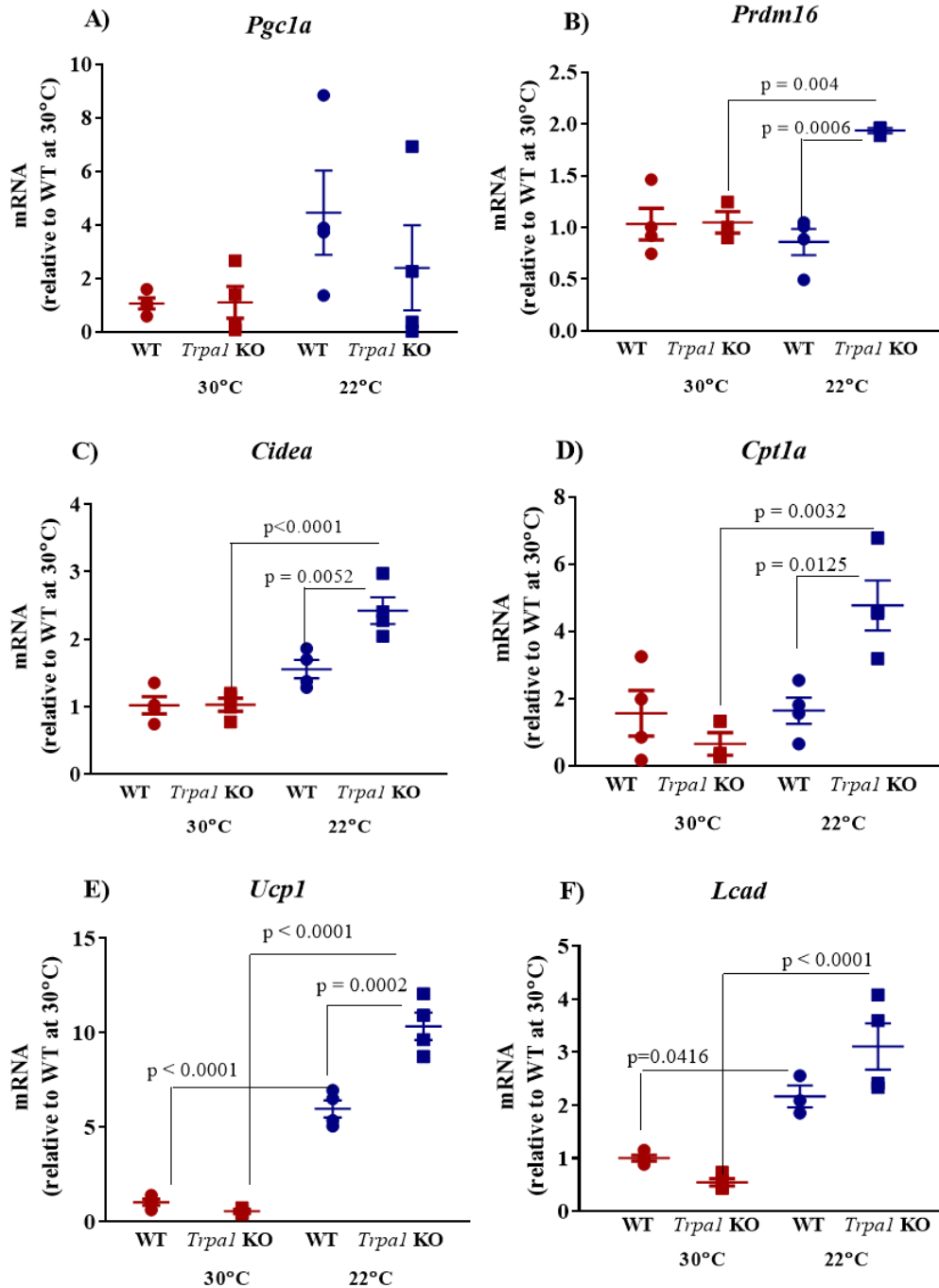


Figura 23. Expressão de A) *Pgc1a*; B) *Prdm16*; C) *Cidea*; D) *Cpt1a*; E) *Ucp1*; F) *Lcad* no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos C57Bl/6J e *Trpal*^{-/-} expostos a temperatura de 30 ou 22°C após duas semanas. Valores estão apresentados como a média (n=3-4) da expressão ± SEM relativos a menor média encontrada no grupo controle (WT a 30°C), respectivamente após duas e quatro semanas. O valor de p foi obtido através de *Two-Way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Colchetes mostram as diferenças no mesmo genótipo entre as temperaturas.

Em resumo, como função desses genes, podemos destacar: *Pgc-1 α* estimula biogênese mitocondrial promovendo um aumento no metabolismo de energia e glicose (Summermatter, 2010); *Prdm16* controla o desenvolvimento de adipócitos marrons, mas também é expresso no tecido adiposo branco subcutâneo (Seale et al., 2008; Kajimura et al., 2010; Ohno et al., 2012). *Cpt1 α* codifica uma enzima mitocondrial que catalisa a transferência de grupos acil da coenzima A carnitina para ácidos graxos de longa cadeia (Komatsu et al., 2010). *Lcad* codifica também uma enzima mitocondrial responsável pela β -oxidação de ácidos graxos insaturados e de cadeia ramificada (Hainline, et al., 1993; Disch, et al., 1996; Daikoku et al., 2000). *Cidea* é um ativador de morte celular, inibe lipólise favorecendo armazenamento de gordura (Inohara et al., 1998; Nordström et al., 2005; Shimizu & Yokotani, 2009).

A ativação desses genes em resposta ao frio ambiental culmina no aumento da expressão de *Ucp1*, bem como regula o metabolismo lipídico. Esses genes disponibilizam substratos para a beta oxidação e mitocôndriogênese ampliando a capacidade respiratória e oxidativa no tecido adiposo marrom. É amplamente discutida na literatura, a integração desses genes para regular a atividade termogênica no BAT (Cannon & Nedergaard, 2004; de Jong et al., 2017; Liang et al., 2019).

Curiosamente o desafio de temperatura em ambos os genótipos não provocou um aumento nos níveis de *Pgca1* no BAT como podemos observar na Figura 23A, demonstrando assim que a biogênese mitocondrial por esse mecanismo não foi estimulada após esses animais terem sido expostos ao desafio de temperatura. Nossos achados corroboram a resposta encontrada por Sun e colaboradores (2016) onde o efeito de desafio de frio moderado (25°C) não induziu o aumento na expressão de *Pgc1 α* no BAT de camundongos selvagens e nocautes para o canal TRPV2. No entanto, segundo nossos resultados, a termoneutralidade de animais WT inicia-se em 23,5°C, e não está clara a faixa de termoneutralidade de *Trpv2* KO.

Estudos mostraram o efeito do frio agudo (5°C versus 28°C) promovendo um aumento transcricional de *Pgc1 α* e *Ucp1* com respectivo aumento na expressão de suas proteínas (Cao et al., 2004). Talvez por termos trabalhado com estímulo de 2 semanas e a 22°C não observamos alteração nos transcritos de *Pgc1 α* .

É evidente que a atividade termogênica em animais WT submetidos ao desafio de frio está estimulada, haja visto o aumento da expressão da *Ucp1* e *Lcad*, indicando que a β -oxidação de ácidos graxos e termogênese estão otimizados. Inúmeros estudos

demonstraram a importância da proteína UCP1 no BAT controlando o metabolismo e termogênese, evidenciando a importância para a eutermia, regulando a temperatura corporal através da produção de calor, frente a diminuição da temperatura ambiente (dentre eles, Janský, 1973; Foster & Frydman, 1978; Bukowiecki, 1982; Klingenspor, 2003; Cannon & Nedergaard, 2004; Lin et al., 2005; Finck & Kelly, 2006; Murano et al., 2009; Nguyen et al., 2011; Ouellet, et al., 2012; Harms & Seale, 2013). O efeito do estímulo de frio sobre a expressão de *Ucp1* foi abordado por Rosell e colaboradores (2014), que relataram um aumento na expressão de *Ucp1* nos diferentes tecidos adiposos de camundongos submetidos a 6 e 22°C, quando comparado aos camundongos submetidos a 28°C.

Nossos resultados mostram que a exposição crônica a 22°C em camundongos WT parece não induzir aumento de genes participantes das vias paralelas que dão suporte a atividade termogênica no BAT, exceto na beta oxidação mediada através do aumento da expressão de *Lcad*. De fato, genes envolvidos no aumento da densidade mitocondrial e adipogênese não foram estimulados em selvagens submetidos a 22°C.

Em contrapartida, genes de alças regulatórias do metabolismo lipídico (lipólise e lipogênese), como *Cidea*, e da mitocondriogênese, como *Ucp1* e *Lcad*, apresentaram aumento significativo em animais nocautes para o canal TRPA1 após a exposição ao frio. Nestes, a resposta termogênica ao desafio de frio crônico foi muito mais robusta sobre todos os genes avaliados (*Prdm16*, *Cidea*, *Cpt1a*; *Lcad* e *Ucp1*), exceto *Pgc1a*. O desafio de frio crônico ou agudo pode desencadear respostas fisiológicas diversas, seja via catecolaminas, NPs, T3/T4, atuando em prol da homeostase da temperatura corpórea (Laurberg et al., 2005; Bertrand-Gadayet et al., 2016; Kimura et al., 2017). As respostas por nós encontradas de aumento na expressão dos genes *Prdm16*, *Cidea*, *Cpt1a*; *Lcad* e *Ucp1* nos animais *Trpa1* KO, expostos ao desafio crônico de frio 22°C, demonstram um incremento substancial de marcadores envolvidos no metabolismo lipídico e mitocondriogênese, promovendo um aumento da atividade termogênica.

Outros autores evidenciaram a participação desses genes na regulação do metabolismo corpóreo, particularmente no metabolismo lipolítico e mitocondrial em resposta ao frio, bem como na expressão de *Ucp1* e otimização da atividade de UCP1 durante o desacoplamento mitocondrial (Shabalina et al., 2013; Sharma, et al., 2016; Kazak et al., 2016; Altshuler-Keylin et al., 2016).

A deleção de *Pgc1 α* em camundongos desencadeia um comprometimento da atividade termogênica de forma significativa (Lin et al., 2004), onde a diferenciação de pré-adipócitos marrons não é afetada (Uldry et al., 2006). É possível que a participação desse gene seja mais requisitada em resposta a desafios de frio mais extremo, ou a uma exposição aguda. De fato, o aumento da expressão de *Pgc1 α* em resposta ao desafio de frio agudo foi demonstrado em adipócitos brancos causando escurecimento, com indução de vários genes envolvidos na biogênese mitocondrial e termogênese, incluindo *Ucp1* (Puigserver et al., 1998; Tiraby & Langin, 2003)

Cohen e colaboradores (2014) demonstraram a importância de *Prdm16* no BAT de camundongos, observando que animais *Prdm16* KO apresentaram um comprometimento na atividade termogênica. Park e colaboradores (2019) destacaram o efeito da temperatura de 4°C induzindo o aumento na expressão gênica de *Prdm16* no BAT, tecido adiposo branco inguinal (iWAT) e gonadal (gWAT) de camundongos WT. Portanto, acreditamos que o desafio de temperatura de 22°C em animais WT, evidenciado em nosso trabalho, não seja um desafio térmico intenso o suficiente para promover o aumento significativo de sua expressão gênica e, possivelmente, a ação mediada pela expressão de *Prdm16* seja observado em animais expostos a desafio de frio mais intenso ou a exposição aguda. Por outro lado, observamos um aumento dos níveis de *Prdm16* em resposta ao desafio de frio a 22°C em animais *Trpa1* KO, reforçando o papel fundamental deste canal nas respostas termogênicas

Além disso, também foi evidenciada a ativação da alça reguladora de lipogênese mediada por *Cidea* em animais *Trpa1* KO, cuja expressão se mostrou aumentada após a exposição ao frio. O aumento desse gene induz incorporação de gotículas de lipídeos, garantindo a manutenção do estoque de ácidos graxos dentro dos adipócitos. A importância da ação de *Cidea* no tecido adiposo é destacada por Zhou e colaboradores (2003) que enfatizaram que, em nocautes de *Cidea*, há aumento da atividade de UCP1, podendo contribuir para o efeito de 'mascaramento' da sua ação em condições fisiológicas. Assim, é possível sugerir que a regulação positiva sobre o gene *Cidea* observada nos animais *Trpa1* KO no desafio de frio está associada ao aumento da atividade de desacoplamento mediado por UCP1, a fim de moderar a ação desta última.

Assim como *Cidea*, os genes *Lcad* e *Cpt1 α* são importantes reguladores da via β -oxidativa de lipídeos, promovendo um suporte à atividade termogênica e atividade da UCP1. O aumento de *Cpt1 α* indica que há um maior metabolismo lipídico em adipócitos

para proporcionar ácidos graxos livres como substratos da β -oxidação na mitocôndria, suprimindo a demanda energética que é essencial durante a manutenção térmica do tecido adiposo marrom. Sabe-se que os ácidos graxos são os principais substratos usados na atividade termogênica no BAT (Cannon & Nedergaard, 2004), devido a vias que resultam na lipólise intracelular e a oxidação de ácidos graxos (Bargut et al., 2016; Schilperoort et al., 2016). Dessa forma é importante a manutenção positiva desses genes durante uma exposição ao frio por um longo período, disponibilizando substratos essenciais para manutenção da atividade termogênica (Komatsu et al., 2010).

Finalmente, baseado nos resultados obtidos com aumento significativo dos genes *Prdm16*, *Cidea*, *Cpt1a*, *Lcad* e *Ucp1* nos animais *Trpa1* KO em 22°C (desafio de frio crônico), temperatura esta que ativa o canal avaliado, aumento esse mais significativo nos animais *Trpa1* KO do que nos animais; não alteração nas concentrações de ANP e BNP plasmáticos em animais *Trpa1* KO em termoneutralidade e desafio de frio crônico; mas aumento marcante de BNP nos animais WT e *Trpa1* KO ao desafio agudo de 10°C, nós hipotetizamos que, a 22°C, a via noradrenérgica foi ativada no BAT. A ativação dos receptores β -adrenérgicos evoca aumento dos níveis de AMPc e da atividade de PKA que, mediante fosforilação, ativa o canal TRPA1 (Brackley et al., 2017; Meents, et al., 2017). A abertura do canal TRPA1 promove o aumento do influxo de cálcio e, conseqüentemente, aumento do cálcio intracelular que regula a via de sinalização da termogênese no BAT para garantir a parcimônia do processo, uma vez que a falta deste canal foi responsável pelo aumento da expressão de genes que atuam sobre esta via.

Interessantemente, foi observado que os estrogênios 2-hidroxiestradiol e 4-hidroxiestradiol usados para promover a secreção de insulina em resposta ao aumento de glicose via ativação de canal de TRPA1 e influxo de cálcio, conforme reportado em estudo prévio (Ma et al., 2019), também foram usados anteriormente para inibir atividade de adenilil ciclases solúveis (sAC) (Bitterman et al., 2013). Parker e colaboradores (2019) demonstraram que estes hormônios reduzem AMPc e CREB fosforilada por inibição de sAC.

Para racionalização desta hipótese, baseamo-nos na literatura que estabeleceu a inibição das adenilil ciclases 5 e 6 pelo íon Ca^{2+} (Halls & Cooper, 2011), enzimas que promovem a conversão de ATP em AMPc, sendo este nucleotídeo usado como co-fator para atividade da PKA. Esta quinase medeia a fosforilação da proteína 1 ligante do elemento responsivo ao AMPc (*Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1*,

CREB), um fator de transcrição que atua em inúmeros processos biológicos (Shaywitz & Greenberg, 1999), incluindo a termogênese, descrita na via KEGG mencionada anteriormente. Portanto, um menor influxo de cálcio no BAT promovido pela ausência do canal TRPA1 poderia ser associado a uma menor inibição das adenilciclases, que por sua vez ativariam o eixo AMPc/PKA/CREB, conforme ilustrado na Figura 24.

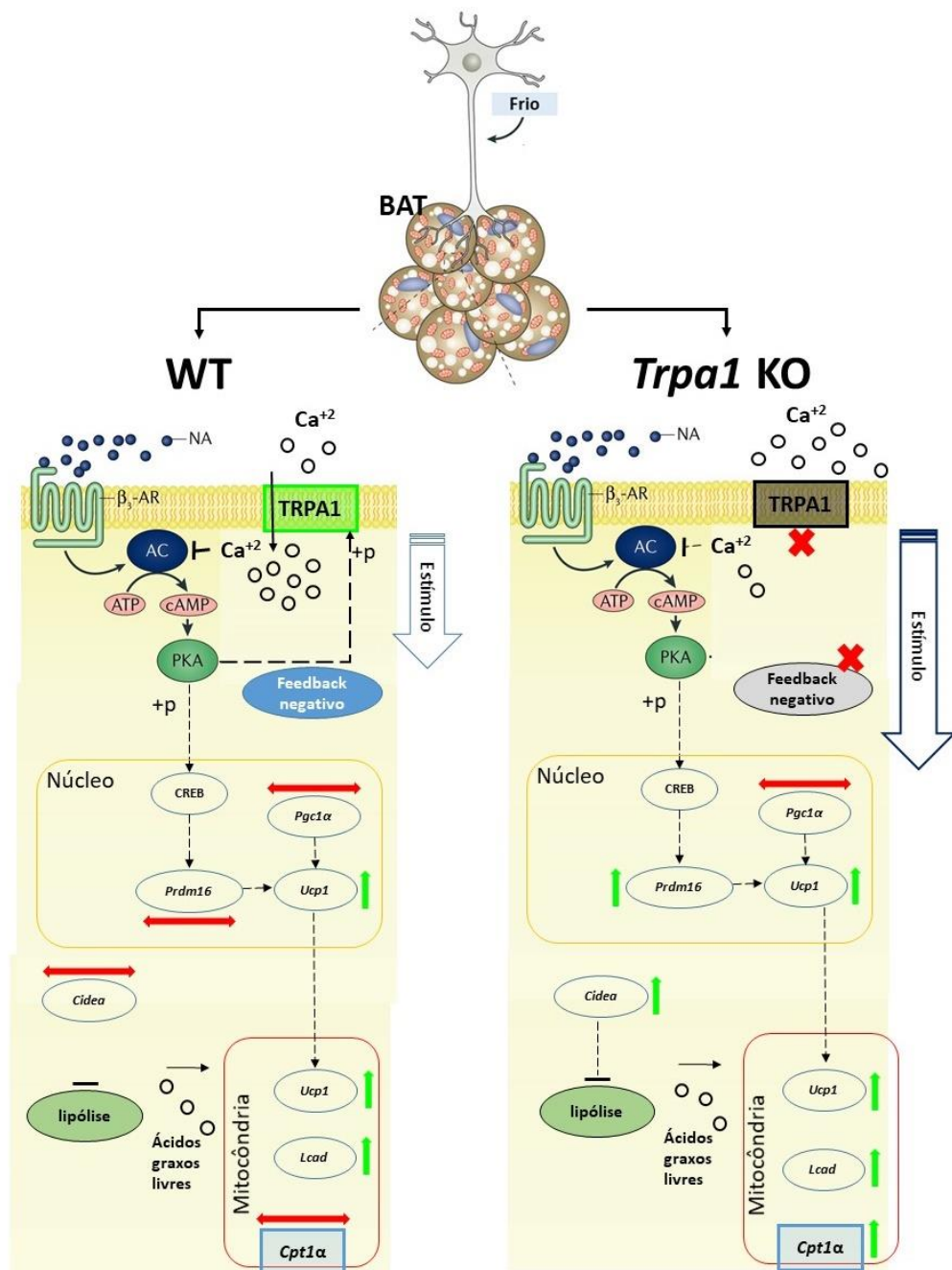


Figura 24. Ilustração do possível mecanismo do canal TRPA1 na via termogênica do BAT no desafio de frio crônico. A sinalização noradrenérgica estimula a atividade de adenilciclase (AC) para produção de AMPc e ativação do eixo PKA/CREB. O PKA fosforila o canal TRPA1, promovendo sua ativação e influxo de cálcio, e o aumento do cálcio intracelular inibe a AC em um mecanismo de feedback negativo para regulação do processo. A ausência do canal TRPA1 na condição de desafio térmico crônico potencializa o eixo AMPc/PKA/CREB, possivelmente responsáveis pelas alterações evidenciadas na análise de expressão gênica. Autoria: José Thalles Lacerda, adaptado de Caron et al., 2018).



CONCLUSÃO



A termoregulação frente ao desafio de frio é um ajuste muito importante na garantia da sobrevivência. Nesse estudo, evidenciamos que o tratamento crônico de exposição ao frio a 22°C desencadeou um aumento na expressão de genes importantes no ajuste termoregulatório, mas, por outro lado, os hormônios natriuréticos parecem não contribuir com esse fenômeno. Tendo em vista que a ativação da via termogênica se mostrou mais exacerbada na ausência do canal. O canal TRPA1 e o cálcio citoplasmático provavelmente estejam envolvidos na termogênese adaptativa. Uma possibilidade é que a via do AMPc que leva a aumento de UCP1 esteja basalmente mais ativa quando os níveis de cálcio são menores, ou seja na ausência do canal TRPA1, a adenilil ciclase esteja sendo liberada da inibição pelo cátion. Dessa forma faz-se necessário um maior aprofundamento na investigação mecanística desse fenômeno.



REFERÊNCIAS



- Ando H, Yanagihara H, Hayashi Y, Obi Y, Tsuruoka S, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A. 2005. Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. **Endocrinology** 146(12):5631-5636.
- Altshuler-Keylin S, Shinoda K, Hasegawa Y, Ikeda K, Hong H, Kang Q, Yang Y, Perera RM, Debnath J, Kajimura S. 2016. Beige adipocyte maintenance is regulated by autophagy-induced mitochondrial clearance. **Cell metab** 24(3):402-419.
- Asher G, Sassone-Corsi P. 2015. Time for food: the intimate interplay between nutrition, metabolism, and circadian clock. **Cell** 161(1):84-92.
- Asher G, Schibler U. 2011. Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals. **Cell Metab** 13(2):125-137.
- Astrup A, Bülow J, Madsen J, Christensen NJ. 1985. Contribution of BAT and skeletal muscle to thermogenesis induced by ephedrine in man. **Am J Physiol.** 248(5 Pt 1):E507-515.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell** 120(4):483-495.
- Bargut TCL, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. 2016. Brown adipose tissue: updates in cellular and molecular biology. **Tissue Cell** 48(5):452-460.
- Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C, Eychmüller A, Gordts PLSM, Rinninger F, Bruegelmann K, Freund B, Nielsen P, Merkel M, Heeren J. 2011. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. **Nature Med** 7(2):200.
- Bass J, Takahashi JS. 2010. Circadian integration of metabolism and energetics. **Science.** 330(6009):1349-1354. 2014.
- Berwick ZC, Dick GM, Tune JD. 2012. Heart of the matter: coronary dysfunction in metabolic syndrome. **J Mol Cell Cardiol** 52(4):848-856.
- Bertrand-Gaday C, Pessemesse L, Cabello G, Wrutniak-Cabello C, Casas F. 2016. Temperature homeostasis in mice lacking the p43 mitochondrial T3 receptor. **FEBS Lett** 590(7):982-991.
- Bevan S, Quallo T, Andersson DA. TRPV1. **Handb Exp Pharmacol** 222:207-245.

- Bitterman JL, Ramos-Espiritu L, Diaz A, Levin LR, Buck J. 2013. Pharmacological distinction between soluble and transmembrane adenylyl cyclases. **J Pharmacol Exp Ther** 347(3):589-598.
- Block G. 2005. Keep time, stay healthy. **Sci Aging Knowl Environ** 19, pe13.
- Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. 1981. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **J Am Soc Nephrol** 12(2):403-409.
- Bordicchia M, Liu D, Amri E-Z, Ailhaud G, Dessì-Fulgheri P, Zhang C, Takahashi N, Sarzani R, Collins S. 2012. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. **J Clin Invest** 122:1022–1036.
- Bordicchia M, Ceresiani M, Pavani M, Minardi D, Polito M, Wabitsch M, Cannone V, Burnett JC Jr, Dessì-Fulgheri P, Sarzani R. 2016. Insulin/glucose induces natriuretic peptide clearance receptor in human adipocytes: a metabolic link with the cardiac natriuretic pathway. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 311(1):R104-114.
- Brackley AD, Gomez R, Guerrero KA, Akopian AN, Glucksman MJ, Du J, Carlton SM, Jeske NA. 2017. A-kinase anchoring protein 79/150 scaffolds transient receptor potential A 1 phosphorylation and sensitization by metabotropic glutamate receptor activation. **Sci Rep** 7(1):1842.
- Brown SA. 2016. Circadian metabolism: From mechanisms to metabolomics and medicine. **Trends Endocrinol Metab** 2016 (6):415-426
- Brown SA, Azzi A. 2013 Peripheral circadian oscillators in mammals. **Handb Exp Pharmacol** (217):45-66.
- Buhr ED, Takahashi JS. 2013. Molecular components of the mammalian circadian clock. **Handb Exp Pharmacol** 217:3-27.
- Buhr ED, Yoo S-H, Takahashi JS. 2010. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. **Science** 330(6002):379-385.
- Bukowiecki L, Collet AJ, Folllea N, Guay G, Jahjah L. 1982. Brown adipose tissue hyperplasia: a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia. **Am J Physiol** 242:353–359.
- Cadenas S, Buckingham J A, Samec S, Seydoux J, Din N, Dulloo AG, Brand MD. 1999. UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. **FEBS letters**, 462(3): 257-260.

- Cannon B, Nedergaard J. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev** 84:277–359.
- Cannon B, Nedergaard J. 2011. Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. **J Exp Biol** 214(2):242-253.
- Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, Bai X, Floering LM, Spiegelman BM, Collins, S. 2004. p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. **Mol cell biol** 24(7):3057-3067.
- Carobbio S, Rosen B Vidal-Puig A. 2013. Adipogenesis: new insights into brown adipose tissue differentiation. **J Mol Endocrinol** 51(3):T75-T85.
- Carper D, Coue M, Nascimento EB, Barquissau V, Lagarde D, Pestourie C, Laurens C, Petit JV, Soty M, Monbrun L, Marques M-A, Jeanson Y, Sainte-Marie Y, Mairal A, Dejean S, Tavernier G, Viguerie N, Bourlier V, Lezoualc'h F, Carrie`re A, Saris WHM, Astrup A, Casteilla L, Mithieux G, Lichtenbelt WVM, Langin D, Schrauwen P, Moro C. 2020. Atrial natriuretic peptide orchestrates a coordinated physiological response to fuel non-shivering thermogenesis. **Cell Rep** 32(8):108075.
- Caron A, Lee S, Elmquist JK, Gautron L. Leptin and brain-adipose crosstalks. 2018. **Nat Rev Neurosci** 19(3):153-165.
- Caspani O, Heppenstall PA. 2009. TRPA1 and cold transduction: An unresolved issue? **J Gen Physiol** 133(3):245-249.
- Caspani O, Zurborg S, Labuz D, Heppenstall PA. 2009. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. **PLoS One** 4(10):7383.
- Chappuis S, Ripperger JA, 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(3):184-193.
- Chatzigeorgiou M, Yoo S, Watson JD, Lee W H, Spencer WC, Kindt KS, Hwang SW, Miller 3rd DM, Treinin M, Driscoll M, Schafer WR. 2010. Specific roles for DEG/ENaC and TRP channels in touch and thermosensation in *C. elegans* nociceptors. **Nature neurosci** 13(7): 861-868.
- Chen J, Kang D, Xu J, Lake M, Hogan JO, Sun C, Kim D. 2013. Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. **Nature commun** 4(1):1-7.

- Cheung SY, Huang Y, Kwan HY, Chung HY, Yao X. 2015. Activation of transient receptor potential vanilloid 3 channel suppresses adipogenesis. **Endocrinology** 156(6):2074-2086.
- Chouchani ET, Kazak L, Jedrychowski MP, Lu GZ, Erickson BK, Szpyt J, Pierce KA, Laznik-Bogoslavski D, Vetrivelan R, Clish CB, Robinson AJ, Gygi SP, Spiegelman BM. 2016. Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. **Nature** 532(7597):112.
- Clayton ZS, McCurdy CE. 2018. Short-term thermoneutral housing alters glucose metabolism and markers of adipose tissue browning in response to a high-fat diet in lean mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 315(4):R627-R637.
- Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ, Lo JC, Zeng X, Ye L, Khandekar MJ, Wu J, Gunawardana SC, Banks AS, Camporez JP, Jurczak MJ, Kajimura S, Piston DW, Mathis D, Cinti S, Shulman GI, Seale P, Spiegelman BM. 2016. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. **Cell**. 156(1-2):304-316.
- Collins S. 2014. A heart–adipose tissue connection in the regulation of energy metabolism. **Nature R End**, 10(3): 157.
- Collins S, Yehuda-Shnaidman E, Wang H. 2010. Positive and negative control of Ucp1 gene transcription and the role of β -adrenergic signaling networks. **Int J Obes**. 1: S28-33.
- Collins S, Bordicchia M. 2013. Heart hormones fueling a fire in fat. **Adipocyte** 2(2):104-108.
- Coué M, Moro C. 2016. Natriuretic peptide control of energy balance and glucose homeostasis. **Biochimie** 124:84-91.
- Daikoku T, Shinohara Y, Shima A, Yamazaki N, Terada H. 2000. Specific elevation of transcript levels of particular protein subtypes induced in brown adipose tissue by cold exposure. **Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics** 1457(3): 263-272.
- de Assis LVM, Moraes MN, Castrucci AML. 2019. The molecular clock in the skin, its functionality, and how it is disrupted in cutaneous melanoma: a new pharmacological target?. **Cellular and Molecular Life Sciences** 76(19):3801-3826.
- de Jong JMA, Wouters RTF, Boulet N, Cannon B, Nedergaard J, Petrovic N. 2017. The β 3-adrenergic receptor is dispensable for browning of adipose tissues. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 312(6):E508-E518.

- Derbenev AV, Zsombok A. 2016. Potential therapeutic value of TRPV1 and TRPA1 in diabetes mellitus and obesity. **Semin Immunopathol** 38(3):397-406.
- Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A. 2007. TRPM8 is required for cold sensation in mice. **Neuron Rep** 54:371-378.
- Disch DL, Rader TA, Cresci S, Leone TC, Barger PM, Vega R, Wood PA, Kelly DP. 1996. Transcriptional control of a nuclear gene encoding a mitochondrial fatty acid oxidation enzyme in transgenic mice: role for nuclear receptors in cardiac and brown adipose expression. **Mol cell biol** 16(8):4043-4051.
- Duan DM, Wu S, Hsu LA, Teng MS, Lin JF, Sun YC, Cheng CF, Ko YL. 2015 Associations between TRPV4 genotypes and body mass index in Taiwanese subjects. **Mol Genet Genomics** 290(4):1357-1365.
- Farmer SR. 2009. Obesity: Be cool, lose weight. **Nature**. 458(7240):839-840.
- Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. 2009. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. **Cell Metab** 9(2):203-209.
- Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. 2012. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. **Brit J Pharmacol** 166:510–521.
- Finck BN, Kelly DP. 2006. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Investig* 116(3):615-622.
- Flynn TG, de Bold ML, de Bold AJ. 1983. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. **Biochem Biophys Res Commun** 117:859–865.
- Foster DO, Frydman ML. 1978. Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline. **Can J Physiol Pharmacol** 56:110–122.
- Fowler MA, Montell C. 2013. Drosophila TRP channels and animal behavior. **Life Sci** 92:394–403.
- Friedman JM. 2019. Leptin and the endocrine control of energy balance. **Nature Metab.** 1(8):754-764.
- Froy O. 2010. Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity. **Endocrinol Rev** 31(1):1-24.
- Garami M, Gardner DG. 1996. An E-box motif conveys inhibitory activity on the atrial natriuretic peptide gene. **Hypertension** 28(2):315-319.

- Gates DM. 2012 Biophysical ecology. **Courier Corp**Garcia-Anoveros J, Nagata K. 2007. Trpa1. **Handb Exp Pharmacol** (179):347-362.
- Gerhart-Hines Z, Feng D, Emmett MJ, Everett LJ, Loro E, Briggs ER, Bugge A, Hou C, Ferrara C, Seale P, Pryma DA, Khurana TS, Lazar MA. 2013. The nuclear receptor Rev-erb alpha controls circadian thermogenic plasticity. **Nature** 503:410-413.
- Gerstner JR, Yin JC. 2010. Circadian rhythms and memory formation. **Nat Rev Neurosci** 11(8):577-588.
- Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell** 131(2):242-256.
- Goetze JP, Hansen LH, Terzic D, Zois NE, Albrethsen J, Timm A, Smith J, Soltysinska E, Lippert SK, Hunter I. 2005. Atrial natriuretic peptides in plasma. **Clin Chim Acta** 443:25-28.
- Gracheva EO, Ingolia NT, Kelly YM, Cordero-Morales JF, Hollopeter G, Chesler AT, Sánchez EE, Perez JC, Weissman JS, Julius D. 2010. Molecular basis of infrared detection by snakes. **Nature** 464(7291):1006-1011.
- Green CB. Circadian Post-transcriptional Control of Metabolism. 2016. In: Sassone-Corsi P, Christen Y, editors. A Time for Metabolism and Hormones [Internet]. **Cham (CH): Springer** PMID: 28892339.
- Guilding C, Piggins HD. 2007. Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? **Eur J Neurosci** 25(11):3195-3216.
- Gupta DK, Wang TJ. 2015. Natriuretic peptides and cardiometabolic health. **Circ J** 79(8):1647-1655.
- Hainline BE, Kahlenbeck DJ, Grant J, Strauss AW. 1993. Tissue specific and developmental expression of rat long-and medium-chain acyl-CoA dehydrogenases. **Biochim Biophys Acta (BBA)-Gene Struct Expr** 1216(3):460-468.
- Halls ML, Cooper DM. 2011. Regulation by Ca²⁺-signaling pathways of adenylyl cyclases. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 3(1):a004143.
- Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. 2011. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Prog Neurobiol** 93(3):350-384.
- Harms M, Seale P. 2013. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nat Med** 19:1252-1263.

- Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. 2001. The biology of white adipocyte proliferation. **Obesity Rev** 2(4):239-254.
- Hilse KE, Rupprecht A, Egerbacher M, Bardakji S, Zimmermann L, Wulczyn AE, Pohl EE. 2018. The expression of uncoupling protein 3 coincides with the fatty acid oxidation type of metabolism in adult murine heart. **Frontiers physiol** 9:747.
- Hoffmann T, Kistner K, Miermeister F, Winkelmann R, Wittmann J, Fischer MJM, Weidner C, Reeh PW. 2013. TRPA1 and TRPV1 are differentially involved in heat nociception of mice. **Eur J Pain** 17(10):1472-1482.
- Hogenesch JB, Ueda HR. 2011. Understanding systems-level properties: timely stories from the study of clocks. **Nat Rev Genet.**12(6):407-416.
- Husse J, Eichele G, Oster H. 2015. Synchronization of the mammalian circadian timing system: Light can control peripheral clocks independently of the SCN clock. Alternate routes of entrainment optimize the alignment of the body's circadian clock network with external time. **Bioessays** 37(10):1119-1128.
- Inohara N, Koseki T, Chen S, Wu X, Nunez G 1998. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. **EMBO j** (17):92526-2533.
- Iwen KA, Backhaus J, Cassens M, Walzl M, Hedesan OC, Merkel M, Heeren J, Sina C, Rademacher L, Windjäger A, Haug AR, Kiefer FW, Lehnert H, Schmid SM. 2017. Cold-induced brown adipose tissue activity alters plasma fatty acids and improves glucose metabolism in men. **J Clin Endocrinol Metab** 1;102(11):4226-4234.
- Jabba S, Goyal R, Sosa-Pagán JO, Moldenhauer H, Wu J, Kalmeta B, Bandell M, Latorre R, Patapoutian A, Grandl J. 2014. Directionality of temperature activation in mouse TRPA1 ion channel can be inverted by single-point mutations in ankyrin repeat six. **Neuron** 82(5):1017-1031.
- Janský L. 1973. Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. **Biol Rev** 48(1):85-132.
- Jezeck P, Engstová H, Záčková M, Vercesi AE, Costa AD, Arruda P, Garlid KD. 1998. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. **Biochim Biophys Acta** 1365(1-2):319-327.
- Kajimura S, Seale P, Spiegelman BM. 2010. Transcriptional control of brown fat development. **Cell metab** 11(4):257-262

- Kalra H, Adda CG, Liem M, Ang C-S, Mechler A, Simpson RJ, Hulett MD, Mathivanan S. 2013. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. **Proteomics** 13(22):3354-3364.
- Kalsbeek A, Yi C-Y, Cailotto C, la Fleur SE, Fliers E, Buijs RM. 2011. Mammalian clock output mechanisms. **Essays Biochem** 49:137-151.
- Kang J-H, Tsuyoshi G, Ngoc HL, Kim H-M, Tu TH, Noh H-J, Kim C-S, Choe S-Y, Kawada T, Yoo H, Yu R. 2011. Dietary capsaicin attenuates metabolic dysregulation in genetically obese diabetic mice. **J Med Food** 14(3):310-315.
- Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, Nilius B, Voets T. 2009. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA** 106(4):1273-1278.
- Kazak L, Chouchani ET, Jedrychowski MP, Erickson BK, Shinoda K, Cohen P, Vetrivelan R, Lu GZ, Laznik-Bogoslavski D, Hasenfuss SC, Kajimura S, Gygi S, Spiegelman BM. 2015. A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. **Cell** 163(3):643-655.
- Kida R, Yoshida H, Murakami M, Shirai M, Hashimoto O, Kawada T, Matsui T, Funaba M. 2016. Direct action of capsaicin in brown adipogenesis and activation of brown adipocytes. **Cell Biochem Funct** 34(1):34-41.
- Kindt KS, Viswanath V, Macpherson L, Quast K, Hu H, Patapoutian A, Schafer WR. 2007. *Caenorhabditis elegans* TRPA1 functions in mechanosensation. **Nat Neurosci** 10(5):568-577.
- Kimura H, Nagoshi T, Yoshii A, Kashiwagi Y, Tanaka Y, Ito K, Yoshino T, Tanaka TD, Yoshimura M. 2017. The thermogenic actions of natriuretic peptide in brown adipocytes: The direct measurement of the intracellular temperature using a fluorescent thermoprobe. **Sci Rep** 7(1):12978.
- Klingenspor M. 2003. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. **Exp Physiol** 88(1):141-148.
- Komatsu M, Tong Y, Li Y, Nakajima T, Li G, Rui Hu, Sugiyama E, Kamijo Y, Tanaka N, Hara A, Aoyama T. 2010. Multiple roles of PPAR α in brown adipose tissue under constitutive and cold conditions. **Genes Cells** 15(2):91-100.
- Kruse M, Hammond GRV, Hille B. 2012. Regulation of voltage gated potassium channels by PI (4,5) P2. **J Gen Physiol** 140:189–205.

- Kurganov E, Zhou Y, Saito S, Tominaga M. 2014. Heat and AITC activate green anole TRPA1 in a membrane-delimited manner. **Pflügers Archiv-Eur J Physiol** 466(10):1873-1884.
- Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang D-S, Woolf CJ, Corey DP. 2006. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. **Neuron**, 50(2):277-289.
- Kyriacou CP, Hastings MH. 2010. Circadian clocks: genes, sleep, and cognition. **Trends Cogn Sci** 14(6):259-267.
- Lafontan M, Moro C, Berlan M, Crampes F, Sengenès C, Galitzk J. 2008. Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP. **Trends Endocrinol Metab** 19(4):130-137.
- Landsberg JW, Yuan JXJ. 2004. Calcium and TRP channels in pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation. **Physiology** 19(2):44-50.
- Laurberg P, Andersen S, Karmisholt J. 2005. Cold adaptation and thyroid hormone metabolism. **Horm Metab Res** 37(9):545-549.
- Lee E, Jung DY, Kim JH, Patel PR, Hu X, Lee Y, Azuma Y, Wang H-F, Tsitsilianos N, Shafiq U, Kwon JY, Lee HJ, Lee KW, Kim JK. 2015. Transient receptor potential vanilloid type-1 channel regulates diet-induced obesity, insulin resistance, and leptin resistance. **FASEB J** 29(8):3182-3192.
- Levine JD, Alessandri-Haber N. 2007. TRP channels: Targets for the relief of pain. **Biochim Biophys Acta** 1772:989-1003.
- Li S, Yu Q, Wang GX, Lin JD. 2013. The biological clock is regulated by adrenergic signaling in brown fat but is dispensable for cold-induced thermogenesis. **PLoS One** 8(8):e70109.
- Liang X, Pan J, Cao C, Zhang L, Zhao Y, Fan Y, Li K, Tao C, Wang Y. 2019. Transcriptional response of subcutaneous white adipose tissue to acute cold exposure in mice. **Intl j mol sci** 20(16):39-68.
- Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. 2013. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. **Nature** 504:107-112.
- Lightman S, Terry JR. 2014. The importance of dynamic signalling for endocrine regulation and drug development: relevance for glucocorticoid hormones. **Lancet Diabetes Endocrinol** 2(7):593-599.

- Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. 2005. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell metabol** 1(6):361-370.
- Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang CY, Mootha VK, Jäger S, Vianna CR, Reznick RM, Cui L, Manieri M, Donovan MX, Wu Z, Cooper MP, Fan MC, Rohas LM, Zavacki AM, Cinti S, Shulman GI, Lowell BB, Krainc D, Spiegelman BM. 2004. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice. **Cell** 119(1):121-135.
- Liu D, Bordicchia M, Zhang C, Fang H, Wei W, Li JL, Guilherme A, Guntur K, Czech MP, Collins S. 2016. Activation of mTORC1 is essential for β -adrenergic stimulation of adipose browning. **J Clin Invest** 126(5):1704-1716.
- Liu D, Chan SL, de Souza-Pinto NC, Slevin JR, Wersto RP, Zhan M, Mustafa K, Cabo RD, Mattson MP. 2006. Mitochondrial UCP4 mediates an adaptive shift in energy metabolism and increases the resistance of neurons to metabolic and oxidative stress. **Neuromol med** 8(3):389-413.
- Liu D, Zhu Z, Tepel M. 2008. The role of transient receptor potential channels in metabolic syndrome. **Hypertension Res** 31(11):1989-1995.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. **Methods** 25(4):402-408.
- Longo VD, Panda S. 2016. Fasting, circadian rhythms, and time-restricted feeding in healthy lifespan. **Cell metabol** 23(6):1048-1059.
- Luijten IHN, Feldmann HM, von Essen G, Cannon B, Nedergaard J. 2019. In the absence of UCP1-mediated diet-induced thermogenesis, obesity is augmented even in the obesity-resistant 129S mouse strain. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 316(5):E729-E740.
- Ma S, Yu H, Zhao Z, Luo Z, Chen J, Ni Y, Jin R, Ma L, Wang P, Zhu Z, Li L, Zhong J, Liu D, Nilius B, Zhu Z. 2012. Activation of the cold-sensing TRPM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents obesity. **J Mol Cell Biol** 4(2):88-96.
- Ma W, Chen X, Cerne R, Syed SK, Ficorilli JV, Cabrera O, Obukhov AG, Efanov AM. 2019. Catechol estrogens stimulate insulin secretion in pancreatic β -cells via activation of the transient receptor potential A1 (TRPA1) channel. **J Biol Chem** 294(8):2935-2946.
- Machado FSM, Zhang Z, Su Y, de Goede P, Jansen R, Foppen E, Coimbra CC, Kalsbeek A. 2018. Time-of-day effects on metabolic and clock-related adjustments to cold. **Front Endocrinol** 9:199.

- Mahajan N, Khare P, Kondepudi K, Bishnoi M. 2020. TRPA1 in obesity and insulin resistance. **Authorea Preprints**.
- Martin AR, Chung S, Koehler K. 2020. Is exercise a match for cold exposure? Common molecular framework for adipose tissue browning. **Intl j sports med** 41(07):427-442.
- Marlatt KL, Ravussin E. 2017. Brown adipose tissue: An update on recent findings. **Curr Obes Rep** 6(4):389-396.
- Matsuda J, Hosoda K, Itoh H, Son C, Doi K, Tanaka T, Nakao K. 1997. Cloning of rat uncoupling protein-3 and uncoupling protein-2 cDNAs: their gene expression in rats fed high-fat diet. **FEBS letters** 418(1-2):200-204.
- Mazzocchi G, Pazienza V, Vinciguerra M. 2012. Clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms. **Chronobiol Int** 29(3):227–251.
- McKemy, D. D., Neuhauser, W. M., & Julius, D. 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, 416(6876):52-58.
- Meents JE, Fischer MJ, McNaughton PA. 2017. Sensitization of TRPA1 by protein kinase A. **PLoS One** 12(1):e0170097
- Millet L, Vidal H, Andreelli F, Larrouy D, Riou JP, Ricquier D, Laville M, Langin D. 1997. Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. **J Clin Invest**. 100(11):2665-2670.
- Moulin CM, Marguti I, Peron JP, Rizzo LV, Halpern A. 2009. Impact of adiposity on immunological parameters. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. 53(2):183-189.
- Moparthi L, Kichko TI, Eberhardt M, Högestätt ED, Kjellbom P, Johanson U, Reeh PW, Leffler A, Filipovic MR, Zygmunt PM. 2016. Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity. **Sci Rep** 6:28763.
- Moraes MN, de Assis LVM, Henriques FS, Batista M, Jr, Güler AD, Castrucci AML. 2017b. Cold-sensing TRPM8 channel participates in circadian control of the brown adipose tissue. **Biochem Biophys Acta -Mol Cell Res** 1864(12):2415-2427.
- Moraes MN, Mezzalana N, de Assis LV, Güler A, Menaker M, Castrucci AML. 2017a. TRPV1 participates in the activation of clock molecular machinery in the brown adipose tissue in response to light-dark cycle. **Biochem Biophys Acta -Mol Cell Res** 1864(2):324-335.
- Murano I, Barbatelli G, Giordano A, Cinti S. 2009. Noradrenergic parenchymal nerve fiber branching after cold acclimatization correlates with brown adipocyte density in mouse adipose organ. **J Anat** 214:171–178.

- Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K. 2019. Atrial and brain natriuretic peptides: Hormones secreted from the heart. **Peptides** 111:18-25.
- Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. 2007. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 293(2):E444-452.
- Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YPS, Mwangi J, David T, Mukundan L, Brombacher F, Locksley RM, Chawla A. 2011. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. **Nature** 480:104–108
- Nilius B, Flockerzi V. 2014. Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. **Hand Exp Pharmacol** 222:1-712.
- Nordström EA, Rydén M, Backlund EC, Dahlman I, Kaaman M, Blomqvist L, Cannon B, Nedergaard J, Arner P. 2005. A human-specific role of cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor- α)-like effector A (CIDEA) in adipocyte lipolysis and obesity. **Diabetes** 54(6):1726-1734.
- Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. 2012. PPAR γ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. **Cell metab** 15(3): 395-404.
- Ouellet V, Labbé SM, Blondin DP, Phoenix S, Guérin B, Haman F, Turcotte EE, Richard D, Carpentier AC. 2012. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. **J Clin Invest** 22(2):545-552.
- Palazzo E, Rossi F, de Novellis V, Maione S. 2013. Endogenous modulators of TRP channels. **Curr topics med chem** 13(3):398-407.
- Pandey KN 2014. Guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A signaling antagonizes phosphoinositide hydrolysis, Ca²⁺ release, and activation of protein kinase C. **Front mol neuro** 7:75.
- Park H, He A, Tan M, Johnson JM, Dean JM, Pietka TA, Lodhi IJ. 2019. Peroxisome-derived lipids regulate adipose thermogenesis by mediating cold-induced mitochondrial fission. **J clin invest** 129(2):694-711.
- Parker T, Wang KW, Manning D, Dart C. 2019. Soluble adenylyl cyclase links Ca²⁺ entry to Ca²⁺/cAMP-response element binding protein (CREB) activation in vascular smooth muscle. **Sci Rep** 9(1):7317.
- Pecqueur C, Alves-Guerra C, Ricquier D, Bouillaud F. 2009. UCP2, a metabolic sensor coupling glucose oxidation to mitochondrial metabolism? **IUBMB life**, 61(7): 762-767.

- Pertusa M, Madrid R, Morenilla-Palao C, Belmonte C, Viana F. 2012. N-glycosylation of TRPM8 ion channels modulates temperature sensitivity of cold thermoreceptor neurons. **J Biol Chem** 287(22):18218-18229.
- Petruzzelli M, Schweiger M, Schreiber R, Campos-Olivas R, Tsoli M, Allen J, Swarbrick M, Rose-John S, Rincon M, Robertson G, Zechner R, Wagner EF. 2014. A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. **Cell Metab** 20(3):433-447.
- Pittendrigh CS. 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. **Annu Rev Physiol** 55:17–54.
- Porter WP, Gates DM. 1969. Thermodynamic equilibria of animals with environment. **Ecol Monographs** 39(3):227-244.
- Potter LR. 2011. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. **FEBS J** 278(11):1808-1817.
- Prolo LM, Takahashi JS, Herzog ED. 2005. Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. **J Neurosci** 25(2):404-408.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell** 92(6):829-839.
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. 2006. An introduction to TRP channels. **Annu Rev Physiol** 68:619–647.
- Raspè E, Mautino G, Duval C, Fontaine C, Duez H, Barbier O, Monte D, Fruchart J, Fruchart JC, Staels B. 2002a. Transcriptional regulation of human Rev-erb α gene expression by the orphan nuclear receptor retinoic acid-related orphan receptor α . **J Biol Chem** 277(51):49275-49281.
- Raspè E, Duez H, Mansén A, Fontaine C, Fiévet C, Fruchart J-C, Vennström B, Staels B. 2002b. Identification of Rev-erb α as a physiological repressor of apoC-III gene transcription. **J Lipid Res** 43:2172–2179.
- Refinetti R, Menaker M. 1992. The circadian rhythm of body temperature. **Physiol Behav** 51(3):613-637.
- Renaud JP, Harris JM, Downes M, Burke LJ, Muscat GE. 2000. Structure-function analysis of the Rev α and RVR ligand-binding domains reveals a large hydrophobic surface that mediates corepressor binding and a ligand cavity occupied by side chains. **Mol Endocrinol** 14:700–717.

- Romanovsky AA. 2007. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. **Am J Physiol-Regul, Integr Comp Physiol** 292(1):R37-R46.
- Rose RA, Giles WR. 2008. Natriuretic peptide C receptor signaling in the heart and vasculature. **J Physiol** 586:353–366.
- Rosell M, Kaforou M, Frontini A, Okolo A, Chan YW, Nikolopoulou E, Millership S, Fenech ME, MacIntyre D, Turner JO, Moore JD, Blackburn E, Gullick WJ, Cinti S, Montana G, Parker MG, Christian M. 2014. Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 306(8): E945-E964.
- Rothwell NJ, Stock MJ. 1979. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. **Nature** 281(5726):31-35.
- Rupprecht A, Bräuer AU, Smorodchenko A, Goyn J, Hilse KE, Shabalina IG, Pohl EE. 2012. Quantification of uncoupling protein 2 reveals its main expression in immune cells and selective up-regulation during T-cell proliferation. **PLoS One** 7(8): e41406.
- Rupprecht A, Sittner D, Smorodchenko A, Hilse KE, Goyn J, Moldzio R, Pohl EE. 2014. Uncoupling protein 2 and 4 expression pattern during stem cell differentiation provides new insight into their putative function. **PloS one**,9(2): e88474.
- Sacks FM, Alaupovic P, Moye LA, Cole TG, Sussex B, Stampfer MJ, Pfeffer MA, Braunwald E. 2000. VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. **Circulation** 102:1886–1892.
- Saito S, Nakatsuka K, Takahashi K, Fukuta N, Imagawa T, Ohta T, Tominaga M. 2012. Analysis of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in frogs and lizards illuminates both nociceptive heat and chemical sensitivities and coexpression with TRP vanilloid 1 (TRPV1) in ancestral vertebrates. **J Biol Chem** 287(36): 30743-30754.
- Scheja L, Heerem J. 2016. Metabolic interplay between white, beige, brown adipocytes and the liver. **J Hepatol** 64(5):1176-1186.
- Schibler U, Ripperger J, Brown SA. 2003. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. **J Biol Rhythms**. 18(3):250-260.
- Schilperoort M, Hoeke G, Kooijman S, Rensen PC. 2016. Relevance of lipid metabolism for brown fat visualization and quantification. **Curr Opin Lipidol**.27(3):242-248.

- Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM. 2008. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. **Nature** 454(7207):961-967.
- Sengenès C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M, Galitzky J. 2000. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. **FASEB J** 14:1345-1351.
- Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J. 2013. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. **Cell rep** 5(5):1196-1203.
- Sharma BK, Patil M, Satyanarayana A. 2014. Negative regulators of brown adipose tissue (BAT)-mediated thermogenesis. **J cell physiol** 229(12):1901-1907.
- Shaywitz AJ, Greenberg ME. 1999. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. **Annu Rev Biochem.**68:821-61.
- Shimizu I, Yoshida Y, Minamino T. 2016. A role for circadian clock in metabolic disease. **Hypertens Res** 39(7):483-491.
- Shimizu T, Yokotani K. 2009. Acute cold exposure-induced down-regulation of CIDEA, cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A, in rat interscapular brown adipose tissue by sympathetically activated β 3-adrenoreceptors. **Biochem biophys res commun** 387(2):294-299.
- Sidossis LS, Porter C, Saraf MK, Børshheim E, Radhakrishnan RS, Chao T, Ali A, Chondronikola M, Mlcak R, Finnerty CC, Hawkins HK, Toliver-Kinsky T, Herndon DN. 2015. Browning of subcutaneous white adipose tissue in humans after severe adrenergic stress. **Cell Metab** 22(2):219-227.
- Sinica, V., Zimova, L., Barvikova, K., Macikova, L., Barvik, I., & Vlachova, V. 2020. Human and mouse TRPA1 are heat and cold sensors differentially tuned by voltage. **Cells** 9(1):57.
- Škop V, Guo J, Liu N, Xiao C, Hall KD, Gavrilova O, Reitman ML. 2020. Mouse thermoregulation: Introducing the concept of the thermoneutral point. **Cell Rep.** 31(2):107501.
- Smith J, Fahrenkrug J, Jørgensen HL, Christoffersen C, Goetze JP. 2015. Diurnal gene expression of lipolytic natriuretic peptide receptors in white adipose tissue. **Endocrine Conn** 4(4):206-214.
- Smorodchenko A, Rupprecht A, Fuchs J, Gross J, Pohl EE. 2011. Role of mitochondrial uncoupling protein 4 in rat inner ear. **Moll and Cell Neuro** 47(4):244-253.

- Smorodchenko A, Rupprecht A, Sarilova I, Ninnemann O, Bräuer AU, Franke K, Schumacher S, Techritz S, Nitsch R, Schuelke M, Pohl EE. 2009. Comparative analysis of uncoupling protein 4 distribution in various tissues under physiological conditions and during development. **Biochim Biophys Acta** 1788(10):2309-2319.
- Smorodchenko A, Schneider S, Rupprecht A, Hilde K, Sasgary S, Zeitz U, Pohl EE. 2017. UCP2 up-regulation within the course of autoimmune encephalomyelitis correlates with T-lymphocyte activation. **Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Basis Dis** 1863(4):1002-1012.
- Springer J, Tschirner A, Haghikia A, von Haehling, S, Lal H, Grzesiak A, Kaschina E, Palus S, Pötsch M, von Websky K, Hoher B, Latouche C, Jaisser F, Morawietz L, Coats AJS, Beadle J, Argiles JM, Thomas Thum T, Földes G, Doehner W, Hilfiker-Kleiner D, Force T, Anker SD. 2014. Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. **Eur Heart J** 35(14):932-941.
- Straat ME, Hogenboom R, Boon MR, Rensen PCN, Kooijman S. 2021. Circadian control of brown adipose tissue. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids** 1866(8):158961.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, 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(6):819-829.
- Stucky CL, Dubin AE, Jeske NA, Malin SA, McKemy DD, Story GM. 2009. Roles of transient receptor potential channels in pain. **Brain Res Rev** 60(1):2-23.
- Summermatter S, Baum O, Santos G, Hoppeler H, Handschin C. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) promotes skeletal muscle lipid refueling in vivo by activating de novo lipogenesis and the pentose phosphate pathway. **J bio chem** 285(43):32793-32800.
- Sun W, Uchida K, Suzuki Y, Zhou Y, Kim M, Takayama Y, Takahashi N, Goto T, Wakabayashi S, Kawada T, Iwata Y, Tominaga M. 2016. Lack of TRPV2 impairs thermogenesis in mouse brown adipose tissue. **EMBO Rep** 17(3):383-399.
- Suri A, Szallasi A. 2008. The emerging role of TRPV1 in diabetes and obesity. **Trends Pharmacol Sci** 29(1):29-36.
- Tarquini R, Mazzocchi G. 2017. Clock genes, metabolism, and cardiovascular risk. **Heart Fail Clin** 13(4):645-655.

- Terrien J, Perret M, Aujard F. 2011. Behavioral thermoregulation in mammals: a review. **Front Biosci** 16(4):1428-1444.
- Tiraby C, Langin, D. 2003. Conversion from white to brown adipocytes: a strategy for the control of fat mass? **Trends Endocrinol Metab** 14(10):439-441.
- Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. 2005. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. **Science** 308:1043–1045.
- Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. 2006. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. **Cell metab** 3(5): 333-341.
- Vandewauw I, De Clercq K, Mulier M, Held K, Pinto S, Van Ranst N, Segal A, Voet T, Vennekens R, Zimmermann K, Vriens J, Voets T. 2018. A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. **Nature** 555(7698):662-666.
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. 2009. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. **N Engl J Med** 360(15):1500-1508.
- Villarroya J, Cereijo R, Villarroya F. An endocrine role for brown adipose tissue? **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 305(5):E567-E572
- Voets T, Nilius B. 2007. Modulation of TRPs by PIPs. **J Physio** 582(3):939-944.
- Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B. 2005. Sensing with TRP channels. **Nat Chem Biol** 1:85–92.
- Wajchenberg BL, Nery M, Cunha MR, Silva ME. 2009. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. 53(2):145-150.
- Wang H, Siemens J. 2015. TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. **Temperature** 2(2):178-187.
- Wang TJ. (2012). The natriuretic peptides and fat metabolism. **N England J Med** 367(4):377-378.
- Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. 2008. TRP channel and cardiovascular disease. **Pharmacol Ther** 118(3):337-351.
- Weigle DS, Selfridge LE, Schwartz MW, Seeley RJ, Cummings DE, Havel PJ, Kuijper JL, BeltrandelRio H. 1998. Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: a potential explanation for the effect of fasting. **Diabetes** 47(2):298-302.

- West AC, Bechtold DA. 2015. The cost of circadian desynchrony: Evidence, insights and open questions. **Bioessays** (7):777-788.
- Westerterp-Plantenga MS, Lejeune MP, Kovacs EM. 2005. Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and green tea supplementation. **Obes Res** 13(7):1195-1204.
- Williams DL, Schwartz MW. 2005. Out of synch: Clock mutation causes obesity in mice. **Cell Metab** 1:355–356.
- Winter Z, Gruschwitz P, Eger S, Touska F, Zimmermann, K. 2017. Cold temperature encoding by cutaneous TRPA1 and TRPM8-carrying fibers in the mouse. **Front mol neurol** 10:209.
- Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, Mangelsdorf DJ, Evans RM. 2006. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. **Cell** 126:801–810.
- Ye L, Kleiner S, Wu J, Sah R, Gupta RK, Banks AS, Cohen P, Khandekar MJ, Boström P, Mepani RJ, Laznik D, Kamenecka TM, Song X, Liedtke W, Mootha VK, Puigserver P, Griffin PR, Clapham DE, Spiegelman BM. 2012. TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. **Cell** 151(1):96-110.
- Yin L, Wang J, Klein PS, Lazar MA. 2006. Nuclear receptor Rev-erb α is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. **Science** 311(5763):1002-1005.
- Yu J, Zhang S, Cui L, Wang W, Na H, Zhu X, Liu P. 2015. Lipid droplet remodeling and interaction with mitochondria in mouse brown adipose tissue during cold treatment. **Biochem Biophys Acta (BBA)-Mol Cell Res** 1853(5):918-928.
- Yu WM, Liu X, Shen J, Jovanovic O, Pohl EE, Gerson SL, Finkel T, Broxmeyer HE, Qu CK. 2013. Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. **Cell Stem Cell** 12(1):62-74.
- Zhou Z, Toh SY, Chen Z, Guo K, Ng CP, Ponniah S, Li P. 2003. Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. **Nature gen** 35(1):49-56.
- Zsombok A, Derbenev AV. 2016. TRP channels as therapeutic targets in diabetes and obesity. **Pharmaceuticals** 9(3):50
- Zsombok A. 2013. Vanilloid receptors--do they have a role in whole body metabolism? Evidence from TRPV1. **J Diabetes Complic** 27(3):287-292.

Zvonic S, Ptitsyn AA, Conrad SA, Scott LK, Floyd ZE, Kilroy G, Wu X, Goh BC, Mynatt RL, Gimble JM. 2006. Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. **Diabetes** 55:962–970.