



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ANTIDEPRESSIVO EM RATOS COM INSUFICIÊNCIA AÓRTICA PODE
MODIFICAR A EXPRESSÃO GÊNICA DE OCITOCINA E VASOPRESSINA
CENTRAIS?**

Ana Carolina Mieko Omoto

BOTUCATU – SP

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ANTIDEPRESSIVO EM RATOS COM INSUFICIÊNCIA AÓRTICA PODE
MODIFICAR A EXPRESSÃO GÊNICA DE OCITOCINA E VASOPRESSINA
CENTRAIS?**

Ana Carolina Mieko Omoto

Orientadora: Juliana Irani Fratucci De Gobbi

Co-orientador: Robson Francisco Carvalho

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Omoto, Ana Carolina Mieko.

Antidepressivo em ratos com insuficiência aórtica pode modificar a expressão gênica de ocitocina e vasopressina centrais? / Ana Carolina Mieko Omoto. – Botucatu ; [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Juliana Irani Fratucci De Gobbi

Coorientador: Robson Francisco Carvalho

Capes: 2070200

1. Genética – Expressão. 2. Insuficiência aórtica. 3. Ocitocina. 4. Vasopressina. 5. Antidepressivos. 6. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Expressão gênica; Insuficiência aórtica; Ocitocina; Paroxetina; Vasopressina.

Dedico esta monografia aos meus amados pais, Mario Omoto e Irene Baggio Omoto, por todo o sacrifício realizado para que eu pudesse chegar até aqui e pelo amor incondicional que me torna capaz de superar todo e qualquer obstáculo.

Agradecimentos

Durante os últimos sete anos da minha vida, inúmeras pessoas contribuíram de diferentes maneiras, para a realização de um grande sonho. Sonho este que carrego comigo desde muito pequena e que hoje com a minha formação profissional serei capaz de por em prática. Porém nada disso seria possível sem antes ter conquistado um amadurecimento pessoal e a conscientização da importância de diferentes profissionais trabalhando em prol de um mesmo objetivo. Para realização deste projeto contei com a ajuda de muitos profissionais das mais diversas formações.

Agradeço à Lillian Morceli, Luciana A. S. Borgatto, Janete C. Teixeira., Antônio C. B. Tardivo, Meliza G. Roscani, Leonardo N. de Moraes, João Paulo Cunha e Jason J. Fernandez por terem contribuído direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Foi um grande prazer conviver e trabalhar com cada um de vocês.

À Juliana Irani Fratucci De Gobbi, minha mentora e amiga, faltam palavras para descrever a admiração e gratidão que sinto por você. Agradeço, imensamente, por me mostrar a importância e a beleza do trabalho que nós, pesquisadores, exercemos. Obrigada por acreditar em cada sonho meu e por contribuir para que eles se tornassem realidade. Será sempre uma grande referência em minha vida profissional e pessoal.

Ao professor Robson Francisco Carvalho, agradeço por ter aceitado colaborar com seu conhecimento e alegria para a realização deste projeto. Raros são aqueles que acreditam nas pessoas que pouco conhece. Trive o privilégio de tê-lo encontrado em meu caminho e agradeço por ter me dado a chance de conhecer uma área fascinante e totalmente nova para mim.

Atribuo minhas conquistas a todas as pessoas que, de maneira singular, me ensinaram a olhar para as dificuldades encontradas durante minha trajetória, de uma forma especial. Não há qualquer dúvida de que sem a ajuda de vocês eu não teria chegado até aqui. Assim, agradeço aos meus pais, Mario Omoto e Irene Baggio Omoto, peças fundamentais na concretização de cada sonho. Sem vocês meu mundo cairia.

À querida Adriana S. Omoto, a quem tenho a honra de chamar de irmã, agradeço por cada lição de perseverança e garra.

Ao meu companheiro e amigo Everton J.G. Estevam, obrigada por ser meu apoio, minha alegria e minha força durante os últimos cinco anos. Sua compreensão e sacrifício pessoal são presentes que recebo todos os dias, nada do que conquistei até hoje teria o mesmo significado sem você ao meu lado. Seu amor é fundamental em minha vida.

Aos queridos tios Tereza M. Omoto, Emerson Ludovico, Maria S. Shimizu e Toshio Shimizu, que me acolheram como filha em um dos momentos mais difíceis da minha trajetória, expresso minha eterna gratidão.

À Camila M. Shimizu, muito mais que prima a considero minha irmã, obrigada por todos os conselhos, puxões de orelha e carinho.

Às irmãs de coração, Natalia Claro e Adriane D. Viana, que há muitos anos me ensinaram o real significado da amizade e que com pequenos gestos o torna realidade, deixo meu mais sincero obrigado.

Às queridas amigas, Gabriela Garcia, Marília Império, Raísa Bombardelli e Arina Tavares, obrigada por me acolherem durante anos difíceis.

À família ENBM, agradeço por todo aprendizado e por partilharem comigo momentos inesquecíveis. A graduação não seria a mesma sem vocês.

Às queridas amigas, Priscila Y. Kiyota e Camila M. Tamaki que nunca mediram esforços para oferecer o que existe de mais bonito em uma amizade, a solidariedade, obrigada por estarem ao meu lado e se preocuparem comigo durante esses quatro anos.

Às minha amadas avós, Yaeko Omoto e Lídia B. Baggio, que me ensinaram com gestos o real significado das palavras humildade e compaixão, muito obrigada por serem a base dos meus ideais humanísticos.

São tantos “obrigada” que não seria capaz de reproduzi-los em um espaço tão pequeno. Assim, expresso minha eterna gratidão a todos aqueles que passaram por minha vida e que contribuíram e contribuem para a realização dos inúmeros sonhos que carrego comigo. Se a felicidade se baseia nos amigos que conquistamos mundo afora, sou imensamente feliz.

A mente é tudo. O que você pensa, você se torna.
Sidarta Gautama "Buda"

Antidepressivo em ratos com insuficiência aórtica pode modificar a expressão gênica de ocitocina e vasopressina centrais?

RESUMO

A insuficiência aórtica (IAo) desenvolve uma das maiores respostas de hipertrofia miocárdica observadas nas doenças cardíacas. No Brasil, a doença cardíaca valvar ainda é prevalente, sendo a principal causa da IAo a febre reumática. Usualmente, o paciente com IAo se mantém assintomático por um longo período, até que na fase crônica da doença, já com o ventrículo dilatado, o paciente busca pelo tratamento médico. Uma co-morbidade muito comum associada à doenças cardiovasculares é a depressão. Entre os antidepressivos mais prescritos em todo o mundo encontram-se os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS). Estes inibidores melhoram a função cardíaca de animais submetidos à estressores externos, e sabe-se que uma via serotoninérgica importante entre mesencéfalo e ponte contribui para inibir a ingestão de sódio e água. A administração crônica de ISRS parece alterar os níveis de vasopressina circulantes. Nosso laboratório mostrou que o tratamento por 4 semanas com um ISRS, a paroxetina, reduziu a ingestão de NaCl 0,3M diária em ratos com IAo subcrônica, já com dilatação ventricular, e preveniu a maior dilatação ventricular esquerda preservando a fração de encurtamento. Um possível mecanismo envolvido nesta melhora pode ser o aumento da atividade central ocitocinérgica. Assim, torna-se necessário investigar melhor os efeitos do tratamento com paroxetina em ratos com IAo já estabelecida. Portanto, os objetivos do presente projeto são avaliar os efeitos do tratamento com um antidepressivo ISRS, a paroxetina, por 4 semanas em ratos com IAo subcrônica sobre a expressão gênica de ocitocina e vasopressina no hipotálamo destes animais.

Palavras-Chave: Expressão gênica; Insuficiência aórtica; Ocitocina; Paroxetina; Vasopressina.

Would antidepressant treatment in rats with aortic regurgitation modify central gene expression of oxytocin and vasopressin?

ABSTRACT

Aortic regurgitation (AR) leads to a left ventricle dilation and hypertrophy in response to a chronic volume overload. It is still very frequent in developing countries, for instance Brazil, and often as secondary to rheumatic fever. Usually, chronic AR is generally well tolerated for many years, when with the heart dilated the patient searches for treatment. Bidirectional association with depression and cardiovascular disease has been described. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) are widely prescribed to treat several affective disorders, especially for cardiovascular patients since they decrease arrhythmia probability. These SSRI improves cardiac function in rats submitted to stress protocols. Preliminary study from our laboratory showed that following 4 weeks of treatment with one SSRI (paroxetine) in subchronic AR rats there was a decreased in daily sodium intake and an improvement in systolic function. An increase in the central oxytocinergic transmission may be involved in this peripheral improvement to the heart. The investigations about the mechanisms underlying this improvement are necessary. Therefore the aims of this project is investigate the effects of 4 weeks of treatment of paroxetine, a SSRI, in rats with a subchronic AR over the central central gene expression of oxytocin and vasopressin using a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Keywords: Gene Expression; Aortic Regurgitation; Oxytocin; Paroxetin; Vasopressin.

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	4
II OBJETIVOS	9
III MATERIAIS E MÉTODOS	10
<i>Animais</i>	<i>10</i>
<i>Indução da Insuficiência Aórtica (IAo).....</i>	<i>10</i>
<i>Ecocardiograma.....</i>	<i>11</i>
<i>Administração do antidepressivo.....</i>	<i>13</i>
<i>Livre ingestão de água e NaCl 0,3M</i>	<i>13</i>
<i>Perfusão transcardíaca e coleta do tecido.....</i>	<i>13</i>
<i>Microdissecção para coleta do hipotálamo</i>	<i>14</i>
<i>Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR).</i>	<i>15</i>
<i>Extração de RNA total.....</i>	<i>15</i>
<i>Análise da qualidade do RNA.....</i>	<i>15</i>
<i>Reação de Transcrição Reversa (mRNA)</i>	<i>15</i>
<i>RTq-PCR.....</i>	<i>16</i>
<i>Análise Estatística dos Dados</i>	<i>18</i>
IV RESULTADOS	19
<i>Análise Morfométrica das parâmetros cardiovasculares – ecocardiogramas.....</i>	<i>19</i>
<i>Ingestão diária</i>	<i>21</i>
<i>Análise da expressão gênica a partir do RTq-PCR.....</i>	<i>22</i>
<i>Análise do peso das câmaras cardíacas</i>	<i>24</i>
V DIFICULDADES ENCONTRADAS.....	25
VI DISCUSSÃO	26
VII REFERÊNCIAS	30

I INTRODUÇÃO

A insuficiência aórtica (IAo), uma situação de sobrecarga hemodinâmica, é caracterizada pelo refluxo diastólico do sangue da aorta refluindo para o ventrículo esquerdo (VE) devido ao mal fechamento das cúspides aórticas. As causas da IAo são múltiplas, dentre elas, endocardite, degeneração valvar, anormalidades congênitas, dilatação aórtica idiopática, uso de drogas anoréticas e a cardiopatia reumática crônica (BORER et al., 1998; OLSON et al., 1984; WALLER et al., 1990; TARASOUTCHI et al., 2003). A febre e a cardiopatia reumática crônica ainda são um grande problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento como o nosso (WHO, 2001). O paciente mantém-se assintomático por um longo período e, conforme o momento da história natural e do grau de hipertrofia, pode desenvolver quadro de insuficiência cardíaca congestiva e/ou disfunção ventricular esquerda. Entretanto, os mecanismos responsáveis que norteiam essas evoluções permanecem desconhecidos (TARASOUTCHI et al., 2003). O desenvolvimento desta hipertrofia, excêntrica, é significativo e a remodelação parece ser em resposta à sobrecarga de volume-pressão (BORER et al., 2002; BONOW et al., 1998). A resposta do coração a esta sobrecarga hemodinâmica tem sido bem estudada com relação ao remodelamento cardíaco, mas não sobre outros aspectos, como o comportamento de ingestão e excreção de água e sódio, sensibilidade cardíaca reflexa, e áreas centrais relacionadas a estas alterações. Inicialmente a resposta de hipertrofia tenta compensar a sobrecarga, mas ela torna-se deteriorante, resultando em disfunção cardíaca (BORER et al., 2002; HASEFUS, 1998).

No Brasil, a doença cardíaca valvar ainda é prevalente acometendo em especial pacientes jovens (BONOW et al., 1998; TARASOUTCHI et al., 2003). A IAo pode permanecer como assintomática por longos anos, e na maioria das vezes termina com o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (IC), um problema de saúde pública que vêm crescendo em prevalência em todo o mundo. A IC é uma síndrome complexa que pode

resultar de qualquer desordem funcional ou estrutural que prejudique a capacidade do ventrículo preencher-se com ou ejetar sangue. Etiologicamente a IC é classificada como qualquer anormalidade mecânica (sobrecarga de pressão/volume, doença pericárdica, doença restritiva), falência miocárdica ou arritmias (bradiarritmias, taquiarritmias). Entre os pacientes com mais de 60 anos a IC é a principal causa de internação, respondendo por 19,6% das internações por doenças cardiovasculares, equivalendo a 11,7% do total de admissões hospitalares (ALBANESI FILHO, 2005).

Vários fatores neurohumorais estão aumentados na IC, entre eles, o de maior destaque é o sistema renina-angiotensina II-aldosterona (DIBONA et al., 1995; FELDER et al., 2003; ZUCKER et al., 1995; ZUCKER, 2004); sendo este sistema o principal alvo para tratamentos medicamentosos na IC (PACKER et al., 1999; GILES, 1990; POOL, 1998). Nesta síndrome também é observado um aumento da atividade simpática (FRANCIS et al., 2001; ZUCKER et al., 1995), e esse aumento parece ser modulado por receptores subtipo AT1 da angiotensina II (ANG II, ZHU et al., 2004), assim como mineralocorticóides centrais (FRANCIS et al., 2001). Tanto a ANG II quanto a aldosterona são conhecidas por atuar em mecanismos cerebrais que conduzem à ingestão de sódio e água, tanto em animais quanto em humanos (FITZSIMONS, 1998; JOHNSON e THUNHORST, 1994; SAKAI et al., 1987; WEISINGER et al., 1996; TAKAMATA et al., 1994). Estudos preliminares de nosso laboratório mostraram que com 4 semanas após a IAo, caracterizada como uma situação subcrônica da doença, ocorre um aumento da ingestão de sódio ingerido pelos ratos submetidos ao tratamento combinando injeções do diurético furosemida associado a baixas doses do inibidor da enzima conversora da angiotensina II, o captopril.

Uma das co-morbidades associadas à doenças cardiovasculares é a depressão, conjunto de transtornos do humor relacionado a estados de ansiedade (GRIPPO e JOHNSON, 2009; PENNINX et al., 2001; VAN DER KOOY et al., 2007). É interessante que a associação

entre transtornos do humor e doença cardiovascular são independentes dos fatores de risco tradicionais para as doenças cardiovasculares, como: hipertensão, sobrepeso, hipercolesterolemia, ou histórico de doenças cardíacas (GRIPPO e JOHNSON, 2009; PENNINX et al., 2001). Vários sistemas de neurotransmissores estão desregulados em doenças cardiovasculares e estados depressivos, o que culmina com alterações comportamentais e de respostas fisiológicas. Uma das implicações na patofisiologia da depressão são alterações no metabolismo dos neurotransmissores de monoaminas e seus receptores, particularmente a norepinefrina e a serotonina (5-HT, BRUTON e PARKER, 2010). O tratamento em ratos por 4 semanas com fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação da 5-HT (ISRS), atenua as mudanças cardiovasculares associadas a um modelo de estresse crônico moderado (GRIPPO et al., 2006).

Entre os antidepressivos mais prescritos em todo o mundo encontram-se os ISRS, que apresentam vantagens sobre os antidepressivos clássicos, pela segurança na posologia e boa tolerabilidade, sendo muito mais seguros em pacientes com doença cardíaca por diminuir a probabilidade de arritmias (STAHL, 1997; BRUTON e PARKER, 2010). O mecanismo de ação hipotetizado para os ISRS está baseado em ações sobre auto-receptores pré-sinápticos e receptores pós-sinápticos. Inicialmente os ISRS aumentam a 5-HT na região somatodendrítica por agirem em auto-receptores somatodendríticos 5-HT_{1A}, regulando-os para baixo. Assim, o fluxo de impulsos neuronais consegue ativar a liberação de 5-HT pelo terminal axônico (STAHL, 1997). A desinibição serotoninérgica ativa a liberação de 5-HT dos núcleos da rafe, no mesencéfalo, para gânglios da base, córtex límbico e hipocampo, além de uma via descendente da rafe para ponte, bulbo e medula espinhal (STAHL, 1997).

O envolvimento da 5-HT mediando o comportamento da ingestão e excreção de sódio é bem documentado. Administração intracerebroventricular de agonistas serotoninérgicos subtipo 5-HT₂ em ratos aumenta a excreção renal de sódio (REIS et al.

1991). Tratamento intraperitoneal de p-clorofenilalanina, um competidor do triptofano e inibidor também competitivo da triptofano hidroxilase, aumentou as respostas natriorexigênicas e dipsogênicas em ratos induzidas pela administração de furosemida associada a uma dieta pobre em sódio (LIMA et al., 2004). Em adição, lesões dos núcleos da rafe (com ácido ibotênico) conduzem a um aumento da ingestão de sódio (CAVALCANTE-LIMA et al., 2005), corroborando com outros estudos que postulam que neurônios serotoninérgicos da rafe recebendo informações viscerossensoriais sobre o volume circulante colaboram para manter a homeostasia da ingestão de sódio (FRANCHINI et al., 2002). Em adição, estudos mostraram que em uma estrutura que se comunica reciprocamente com os núcleos da rafe, o núcleo parabraquial lateral, a participação de receptores serotoninérgicos é de suma importância para inibir o comportamento de ingestão de sódio para diferentes protocolos experimentais (DE GOBBI et al., 2000, 2007; DE LUCA et al., 2003; MENANI e JOHNSON, 1995; MENANI et al., 2002). O tratamento de animais saudáveis com um ISRS, sertralina, aumentou os níveis plasmáticos de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT), o que pode ser responsável pela hiponatremia presente no tratamento com ISRS (DE MAGALHÃES-NUNES et al., 2007). Nosso laboratório demonstrou em estudos preliminares que nos ratos com IAO subcrônica e que receberam tratamento com paroxetina (um ISRS) por 4 semanas ocorreu redução do consumo diário de NaCl 0,3M, bem como impedimento da dilatação cardíaca do ventrículo esquerdo. O uso de ISRS para controle de síndrome do pânico em humanos demonstrou efeito benéfico sobre o coração, aumentando a variabilidade da frequência cardíaca (TUCKER et al., 1997). Em adição, já foi demonstrado que a ativação proencefálica de receptores subtipo 5-HT₃ exerce ação inibitória sobre o componente pressor do barorreflexo (URZEDO-RODRIGUES et al., 2011). Assim, a 5-HT central parece favorecer a função cardíaca.

Os hormônios hipofisários AVP e OT são sintetizados em núcleos hipotalâmicos e transportados via axônios para a neurohipófise, sendo liberados para a circulação periférica. Administração de agonistas da 5-HT induz secreção de AVP e OT (ANDERSON et al., 1992, VAN DER KAR, 1991). Terminais ocitocinérgicos dentro do complexo vagal do núcleo do trato solitário modulam reflexos cardíacos, facilitando a atividade vagal para o coração (HIGA et al., 2002). Estudos com treinamento físico mostram aumentos na expressão de OT em núcleos hipotalâmicos, e sugerem que este aumento seja o responsável pelos efeitos benéficos de um treinamento sobre o sistema cardiovascular (CAVALLERI et al., 2011). Portanto, com o conjunto destas informações é razoável postularmos que a expressão gênica de AVP e OT seja alterada durante o tratamento com um antidepressivo e essa alteração reflita as mudanças sobre a resposta comportamental e morfofuncional do coração. Desta forma neste projeto nosso objetivo será avaliar os efeitos do tratamento com um antidepressivo ISRS em ratos com IAo subcrônica sobre a expressão gênica de OT e AVP no hipotálamo destes animais. Este projeto também colaborou para a implantação de uma nova metodologia em nosso laboratório.

II OBJETIVOS

Portanto, os objetivos do presente projeto são avaliar os efeitos do tratamento com um antidepressivo ISRS, a paroxetina, por 4 semanas em ratos com IAo subcrônica sobre a expressão gênica de OT e AVP no hipotálamo destes animais.

III MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

O estudo foi realizado utilizando-se ratos Wistar machos fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu. Os animais foram mantidos gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12-12 h). As ofertas de ração e água foram *ad libitum*. Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foram aprovados com o protocolo número 386-CEUA.

Indução da Insuficiência Aórtica (IAo)

O modelo de insuficiência aórtica (IAo) foi realizado através de uma modificação da técnica descrita por Arsenault e colaboradores (ARSENAULT et al., 2002). Inicialmente, sob anestesia com cloridrato de cetamina (200 mg/kg, Dopalen®, Vetbrands) associada a cloridrato de xilazina (100 mg/kg, Anasedan®, Vetbrands) a artéria carótida comum direita foi dissecada e cateterizada. Um fio guia de aço (próprio do cateter de anestesia epidural - 0,34mm) foi introduzido através do cateter carotídeo de modo a lesar a valva aórtica com várias perfurações e o processo foi finalizado quando não houve mais resistência com as perfurações (PLANTE et al., 2004a, 2004b).

O grupo de cirurgia fictícia foi constituído de animais submetidos aos mesmos procedimentos, porém sem a perfuração da valva aórtica. A presença e quantificação da gravidade da insuficiência aórtica (IAo) foi confirmada por ecocardiograma, ao final de uma semana após a indução da IAo.

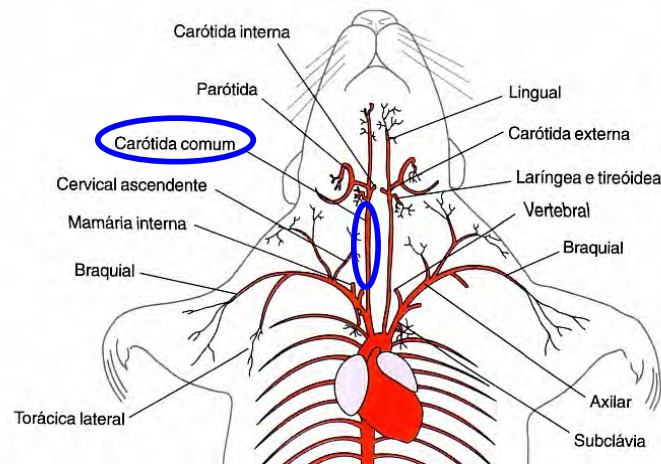


Figura 1. Ilustração do local de dissecação da carótida comum direita e introdução do cateter e fio guia (elipses em azul). Figura modificada do livro: “*Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação*”, UNIFESP, departamento de Psicobiologia, 2004.

Ecocardiograma

O estudo *in vivo* dos animais foi efetuado por meio de Doppler-ecocardiografia transtorácica convencional. O equipamento utilizado foi o Phillips (TDI 5500) dotado de transdutor eletrônico setorial multifrequêncial (7,5 a 12 MHz), seguindo-se a padronização descrita na literatura (SANH et al., 1978). Os exames de ecocardiograma foram realizados na 1^a, 4^a e 8^a semana após a indução de IAO, no sentido de acompanhar a progressão da IAO. Estes exames foram realizados por uma médica experiente na análise das imagens e colaboradora do nosso laboratório, e foram acompanhados pela aluna, que fez as anotações dos parâmetros necessários aos cálculos do débito cardíaco e fração de ejeção destes animais, figura 2.

Animais controles ou com IAO foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, Dopalen®, Vetbrands) associada a cloridrato de xilazina (1mg/kg, Dopalen®, Vetbrands) por via intraperitoneal. Após tricotomia da região anterior do tórax, os ratos foram posicionados em decúbito dorsal, em suporte próprio de madeira para permitir discreto decúbito lateral esquerdo. Foram analisadas imagens monodimensionais obtidas com o feixe

de ultra-som orientado pela imagem bidimensional, obtida com o transdutor na posição paraesternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor com o cursor do modo-M passando pela valva aórtica. As medidas, em milímetros, do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE), espessura da parede posterior (PP), diâmetro do átrio esquerdo (AE) e diâmetro da aorta (AO) foram realizadas diretamente no monitor, por meio do cursor do próprio equipamento, durante o exame. Três a cinco ciclos consecutivos foram utilizados para a realização das medidas, utilizando-se a média aritmética dessas medidas. As imagens dos registros das câmaras ventriculares, modo M, foram arquivadas para eventuais consultas posteriores.

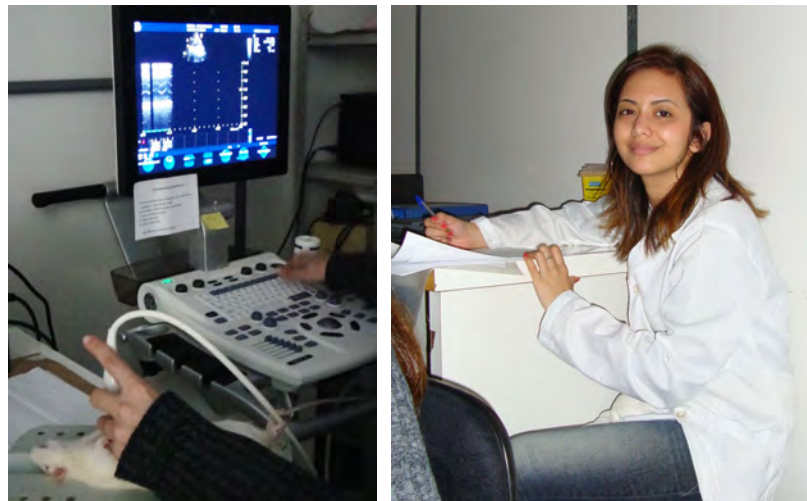


Figura 2. Foto representativa de um animal do grupo durante a coleta de dados morfofuncionais (esquerda). Anotações das variáveis pela aluna envolvida no projeto (direita).

O estudo “in vivo” possibilita avaliação da função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo além de permitir acesso aos indicadores de remodelação cardíaca como massa miocárdica e dimensão das câmaras (SANH et al., 1978).

Administração do antidepressivo

Cloridrato de paroxetina hemihidratado (parox, revendedora PharmaNostra, Rio de Janeiro) foi dissolvida em salina, que serviu de controle, imediatamente antes do uso na dose de 10 mg/kg e foi injetada intraperitonealmente diariamente, pelo período de 4 semanas. A paroxetina diluída em água estéril foi colocada em um banho de ultrasson por aproximadamente 10 minutos antes do uso. Para o adequado controle da temperatura ou qualquer outra intercorrência, a salina dos animais controle também foi colocada pelo mesmo tempo no banho de ultrasson. O estudo foi dividido entre 4 grupos experimentais: IAo + parox, IAo + controle, controle + parox e controle + controle.

Livre ingestão de água e NaCl 0,3M

Os animais de cada grupo foram mantidos em gaiolas metálicas com livre acesso à água, solução de NaCl 0,3M e ração. A ingestão de água e NaCl 0,3M diárias foram medidas da 4^a até a 8^o semana após a indução da IAo, enquanto os ratos estiverem sobre tratamento com paroxetina.

Perfusão transcardíaca e coleta do tecido

Terminado o tratamento, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (50-75 mg/rato) e perfundidos transcardiacamente com salina em tampão fosfato 0,1 M (PBS - pH = 7,4, ~ 250 ml). Os encéfalos foram removidos com uma espátula previamente mergulhada em solução salina estéril com enzima degradadora de RNA para evitar contaminações (ver abaixo, RNase Zap, Invitrogen). Após a retirada do encéfalo, o mesmo foi colocado sobre um papel filtro estéril em cima de uma placa de Petri preenchida

com gelo seco. Tendo o quiasma óptico como referência, foi feito um corte coronal de encéfalo nesta porção para posterior coleta do das amostras de tecido, figura 3.



Figura 3. Fotos representativas de um animal do grupo durante a perfusão transcardíaca com solução de tampão fosfato (esquerda), retirada do encéfalo (centro) e preparo do tecido para coleta da amostra de interesse (direita). A linha tracejada ilustra o local do corte coronal para extração da amostra de tecido.

Microdissecção para coleta do hipotálamo

As amostras do hipotálamo foram coletadas por meio de uma agulha estéril de 1,5 mm de diâmetro, transferidas para um tubo criogênico estéril, figura 4, e foram armazenadas em freezer -80°C. Em cada tubo foi colocado o núcleo hipotalâmico (direito e esquerdo) de apenas um animal. Todos os procedimentos foram realizados em condições livres de RNase (RNase Zap, Invitrogen).

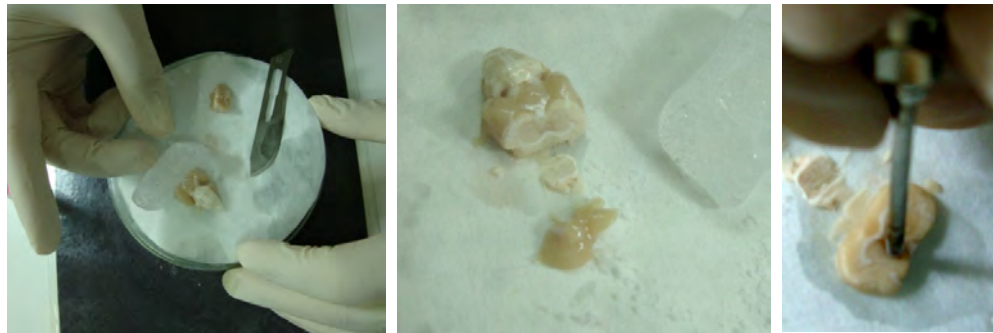


Figura 4. Foto representativa de um animal do grupo durante a perfusão transcardíaca com solução de tampão fosfato, retirada do encéfalo e preparo do tecido para coleta da amostra de interesse. A linha tracejada ilustra o local do corte coronal para extração da amostra de tecido.

Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR).

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment (BUSTIN et al., 2009).

Extração de RNA total

A extração do ácido ribonucleotídeo (RNA) foi realizada com o Trizol (Ambion, EUA) segundo as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNase (Ambion, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico. Na fase de precipitação do RNA foi adicionado 2,5 ul de glicogênio de ostra (Sigma) para formação de um pellet açucarado ajudando a impedir que o RNA se perda durante as próximas etapas do método de extração utilizado. O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanovue (GE Healthcare, EUA).

Análise da qualidade do RNA

A qualidade do RNA foi obtida pelo número da integridade do RNA (RNA Integrity Number, RIN), a partir da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microfluidos, utilizando-se o sistema 2100 Bioanalyzer (Agilent, EUA; FELIGE e PFAFFL, 2006).

Reação de Transcrição Reversa (mRNA)

A transcrição reversa dos RNA mensageiros (mRNAs) foi realizada utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Para a reação foram utilizados 4 µL de Master Mix para a

transcrição reversa ao qual foi adicionado 1 µg de RNA e o volume completado para 20 µL com água livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 25 °C por 5 min., 42 °C por 30 min seguido da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min.

RTq-PCR

Cada amostra de cDNA foi analisada com ensaios TaqMan (Life Technologies, EUA), contendo primers e sondas de hidrólise específicos para os mRNA de ocitocina (OT) e vasopressina (AVP), Tabela 1. Para cada reação, foram utilizados 10 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X) (Life Technologies, EUA), 4 µL do produto da reação de transcrição reversa e o volume final ajustado para 20 µL com água livre de nucleases. Foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 10 min., seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15s e 60 °C por 1 min. As reações foram realizadas no Sistema de PCR em Tempo Real 7300 (Life Technologies, EUA). Na Tabela 2 pode-se observar a sequência dos pares de bases para cada um dos primers. A análise do perfil de expressão dos mRNAs foi realizada através do método do Cq comparativo utilizando-se o software DataAssist V3.01 fornecido gratuitamente pela empresa de insumos de laboratório Life Technology, cuja configuração automática de linha de base é um limiar de 0,2.

O Cq (ciclo de quantificação) refere-se ao ponto de encontro entre a curva de amplificação corrigida pela linha de base e o limiar (de acordo com o RTq-PCR Data Markup Language, [HTTP://rdml.org](http://rdml.org)). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada através do método do Cq comparativo (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Utilizando-se o Ct (cycle treshold ou ciclo limiar) é possível calcular quantos ciclos a mais são necessários para que o gene alvo emita a mesma quantidade de fluorescência correspondente a quantidade de material genético duplicado que o gene de referência ou

endógeno. A partir da diferença dos Cts dos genes endógeno e alvo obtemos o ΔC_t , parâmetro utilizado nos cálculos aritméticos para atingir um resultado de quantificação relativa.

Tabela 1. Primers e sondas de hidrólise para os mRNA de vasopressina e ocitocina.

<i>Gene</i>	<i>RefSeq</i>	<i>Ensaio</i>
Ocitocina (OT)	NP_037128.1	Rn00564446_g1
Vasopressina (AVP)	NM_016992.2	Rn00690189_g1

Informações extraídas do: <http://goo.gl/rAsc2>, Applied Biosystems by Life Technologies.

Tabela 2. Sequência dos pares de bases para cada um dos primers, segundo os pontos para a amplificação do cDNA 5' e 3'.

<i>Ocitocina (OT)</i>	<i>Sequência 5' -3'</i>
Forward	CTGCTGTAGCCCGGATGGCTG
Reverse	AGCGCTCGGAGAAGGCAGACT
<i>Vasopressina (AVP)</i>	<i>Sequência 5' -3'</i>
Forward	ATCCGACATGGAGCTGAGAC
Reverse	AAAAACCCTCTCGACACTCG

Informações extraídas do: <http://goo.gl/rAsc2>, Applied Biosystems by Life Technologies: NM_012996.3 Rattus norvegicus oxytocin, prepropeptide (Oxt), mRNA e NM_016992.2 Rattus norvegicus arginine vasopressin (Avp), mRNA

Análise Estatística dos Dados

A comparação dos dados entre os grupos experimentais para os exames de ecocardiografia foi realizada utilizando-se teste-t, sendo diferença de 5% considerada estatisticamente significativa. Para a ingestão de líquidos foi utilizado análise de variância ANOVA de uma via. Quanto a análise para a expressão gênica, vide acima, RTq-PCR, que segue outro padrão de análise, fornecido pelo fabricante do aparelho. Em adição, os valores obtidos para cada Cq comparativo através do software fornecido pelo aparelho foram agrupados em uma planilha do Excel para obtermos os valores da média \pm erro padrão da média que foram utilizados para a confecção dos gráficos. Análise de variância ANOVA de uma via foi feita para comparação do Cq.

IV RESULTADOS

Análise Morfométrica das parâmetros cardiovasculares – ecocardiogramas

Na 4ª semana após a indução da IAO os animais apresentaram semelhanças entre os grupos IAO + parox e IAO + contr, bem como os grupos contr + parox e contr + contr, tabela 3. O que é importante para demonstrar que os grupos estavam em condições parecidas antes do início do tratamento com parox. Após 4 semanas do tratamento com parox ocorreu uma melhora da função cardíaca dos IAO + parox em relação aos IAO + controle, figura 5. Podemos observar que a fração de encurtamento dos IAO+ parox foi preservada, sendo semelhante ao grupo controle, figura 5.

Tabela 3. Variáveis morfofuncionais dos grupos estudados na 4ª semana após a indução da IAO, antes do início do tratamento com parox.

<i>Variáveis - 4 semanas</i>	<i>IAo + parox n = 9</i>	<i>IAo + controle n = 8</i>	<i>contr + parox n = 9</i>	<i>contr + contr n = 8</i>
DDVE (mm)	8.74 ± 0.31	9.07 ± 0.39	7.01 ± 0.35*	5.85 ± 0.28*
Fração de encurtamento %	41.46 ± 3.55	44.38 ± 4.36	50.90 ± 4.27	55.71 ± 2.82
VAE (cm ³)	0.180 ± 0.020	0.189 ± 0.033	0.075 ± 0.009*	0.080 ± 0.019*
Sphericity index	0.81 ± 0.01	0.87 ± 0.02	0.66 ± 0.02*	0.63 ± 0.01*
Relative wall thickness	0.39 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.43 ± 0.03	0.48 ± 0.01
DC (ml/min)	153.29 ± 11.79	163.54 ± 15.77	99.69 ± 3.87*	93.86 ± 12.01*
Peso corporal (g)	378.4 ± 12.9	369.3 ± 6.2	371.3 ± 14.3	362.8 ± 9.9

DDVE = diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (mm); fração de encurtamento % = DDVE - diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo/ DDVEx100; VAE = volume do átrio esquerdo (cm³); índice de esfericidade = comprimento do eixo menor/comprimento do eixo maior do ventrículo esquerdo; espessura relativa da parede posterior; DC = débito cardíaco (ml/min); e peso corporal (g). * diferente de IAO, p < 0.05, teste - t.

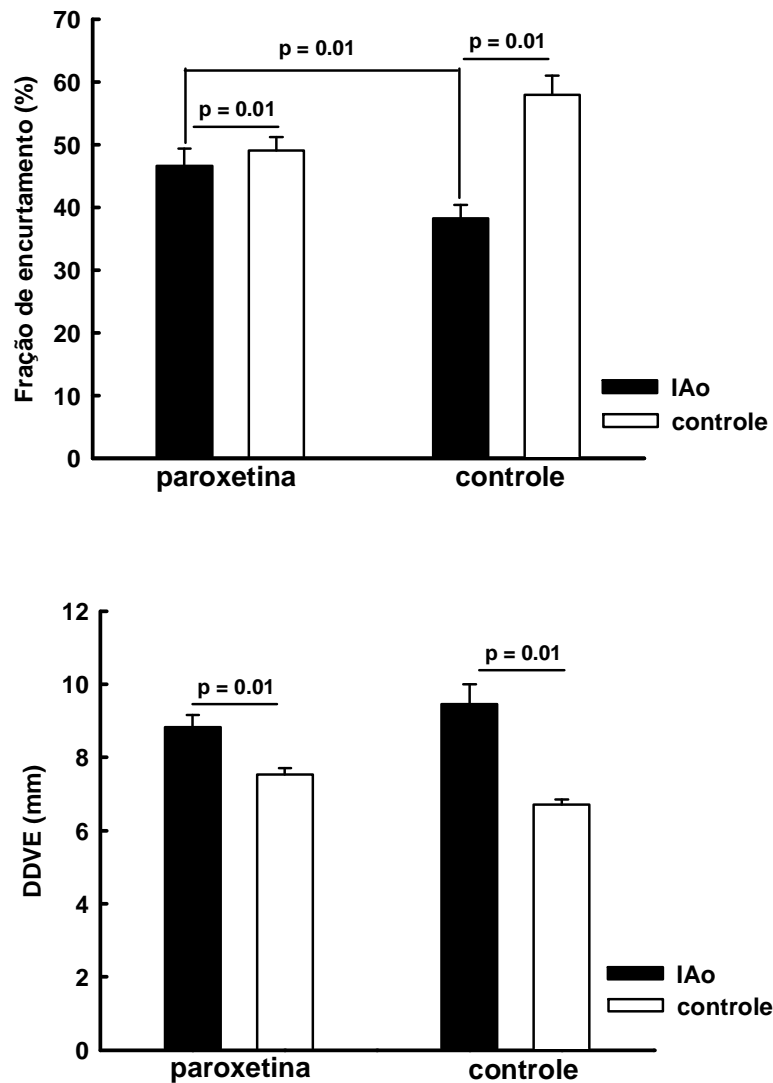


Figura 5. Variáveis morfofuncionais de função sistólica e diastólica do VE, na 8ª semana, obtidos por meio de ecocardiografia com Doppler colorido e cursor em Modo-M para os grupos estudados. Fração de encurtamento (%) = porcentagem de encurtamento do VE, dado pela diferença entre o DDVE e o DSVE; e DDVE (mm) = diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo. Os dados estão expressos como média \pm EPM. Comparações entre os grupos feitas através do teste-t.

Ingestão diária

A ingestão diária de NaCl 0,3M foi menor nos grupos que receberam a paroxetina em comparação aos grupos controle, $p = 0,041$, figura 6. Já a ingestão de água não foi alterada em nenhum dos grupos experimentais, figura 6.

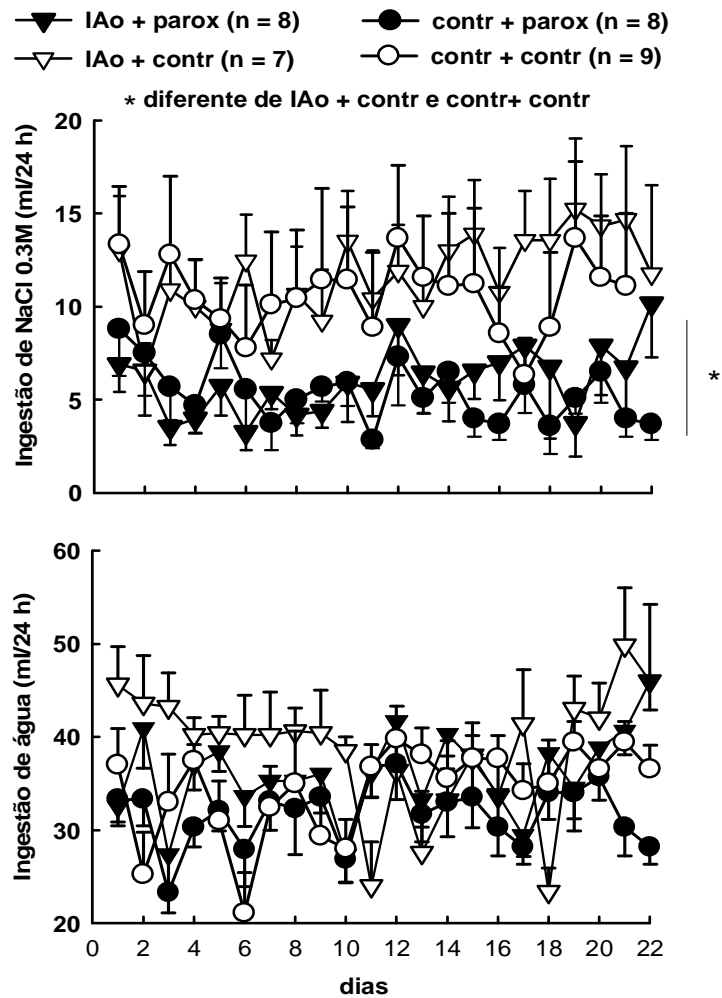


Figura 6. Ingestão diária de NaCl 0,3M (acima) e ingestão de água (abaixo) em 24 h pelo período de 4 semanas nos 4 grupos estudados. Os dados estão expressos como média \pm EPM. Anova duas vias foi utilizada para comparações entre os grupos.

Análise da expressão gênica a partir do RTq-PCR

Análise de variância ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas para a quantificação relativa da expressão gênica tanto para a OT ($p = 0.08$) quanto para AVP ($p = 0.59$), figura 7. Para esta análise tivemos um número menor de animais por grupo, pois perdemos algumas amostras durante as padronizações para a extração do mRNA, permanecendo cada grupo com o seguinte número de animais: IAO + parox = 6, IAO + controle = 5, controle + parox = 4 e controle + controle = 4. Assim, postulamos que se aumentarmos o grupo conseguiremos uma comparação estatisticamente significativa para a expressão dos neuropeptídios alvos. Uma das possibilidades é que a quantidade de tecido extraída não tenha sido boa o suficiente para as análises, em adição as grandes dificuldades para a padronização das concentrações das amostras e o método de extração que não se mostraram muito eficientes para as condições do nosso laboratório. A utilização do gene endógeno de escolha para as análises aqui apresentadas não foi satisfatória por apresentar grande instabilidade, o que pode colaborar para não termos uma significância como hipotetizado.

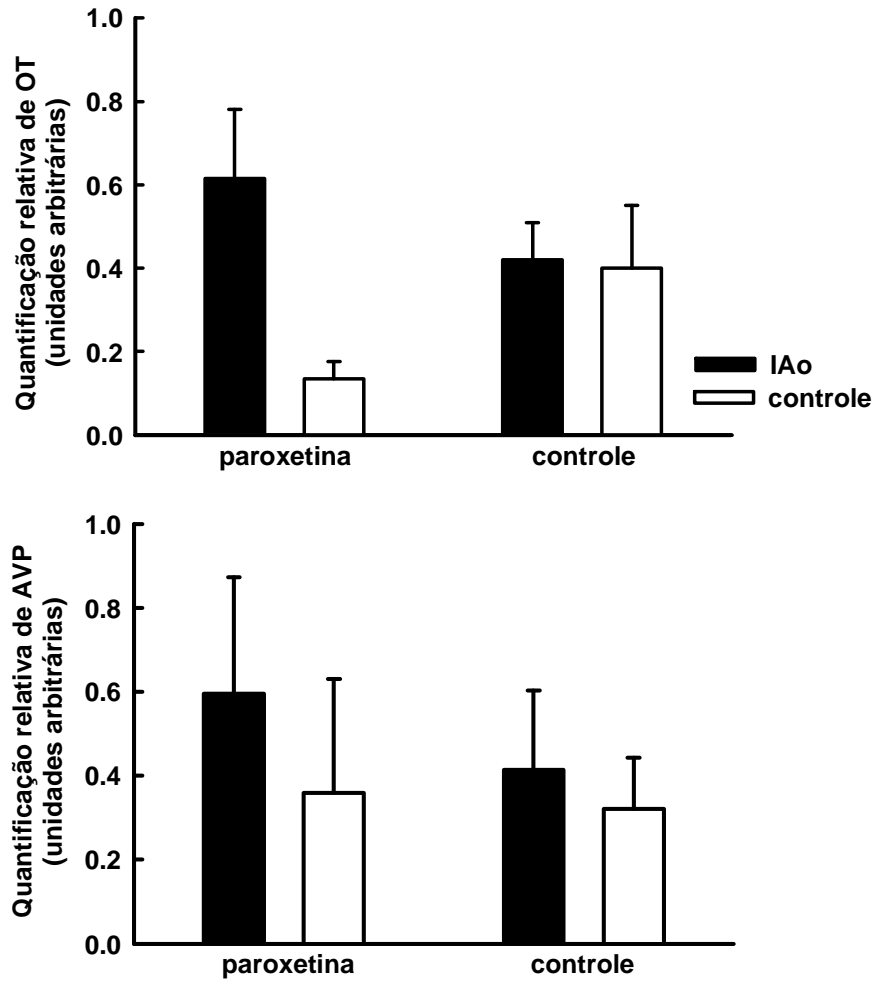


Figura 7. Quantificação relativa de OT (acima) e AVP (abaixo) em ratos com a IAo ou não e que receberam ou não o tratamento com paroxetina. Os dados estão expressos como média \pm EPM. Anova uma via foi utilizada para comparações.

Análise do peso das câmaras cardíacas

Ao final dos experimentos os ratos foram eutanasiados e os corações retirados para pesagem das câmaras cardíacas e comparações entre os grupos, valores expressos na tabela 2. Não ocorreram diferenças entre os grupos para o peso corporal. O VE dos ratos do grupo IAo + parox apresentou peso menor que os dos ratos do grupo IAo + contr, tabela 4. O que pode ajudar a explicar a melhora na função sistólica.

Tabela 4. Pesos corporal, dos átrios (A), do ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) corrigido para cada 100 g de peso corporal entre os 4 grupos estudados.

<i>Grupos</i>	<i>Peso corporal (pc, g)</i>	<i>A/100 g pc</i>	<i>VD/100 g pc</i>	<i>VE/100 g pc</i>
IAo + parox (n = 8)	438.5 ± 16.0	0.027 ± 0.002	0.071 ± 0.005	0.279 ± 0.014 ⁺
IAo + controle (n = 7)	413.0 ± 8.24	0.032 ± 0.002	0.071 ± 0.004	0.330 ± 0.014
controle + parox (n = 8)	453.7 ± 12.0	0.025 ± 0.003	0.066 ± 0.004	0.210 ± 0.004*
controle + controle (n = 8)	418.3 ± 13.5	0.025 ± 0.001*	0.059 ± 0.004	0.206 ± 0.006*

*diferente de IAo, ⁺diferente de IAo + controle



Figura 8. Fotos representativas dos corações de ratos controle e IAo ao final dos experimentos. Direita: comparação do coração total, esquerda: comparação em um corte coronal mostrando a hipertrofia excêntrica do coração.

V DIFICULDADES ENCONTRADAS

Em decorrência da quantidade de tecido ser pequena a concentração de RNA nas amostras foi muito baixa. Para tanto, também utilizamos do artifício de adição de glicogênio de ostra na fase de precipitação durante a extração do RNA. A adição do glicogênio de ostra ajuda na formação de um pellet açucarado que impede que o RNA se perda durante as lavagens do método de extração. Ainda como decorrência das concentrações muito baixas houve dificuldade em padronizar nossas amostras o que resultou em ampliações tardias e muito variáveis durante o RTq-PCR.

Para ser detectada a fluorescência durante os ensaios da RTq-PCR a concentração das amostras precisa estar dentro de uma faixa de 25 a 500ng/ul, porém algumas das nossas amostras tinham concentração inferior a 25ng/ul, análise feita por espectofotometria utilizando-se o aparelho Nanovue (GE Healthcare, EUA), padrão para o laboratório que utilizamos em colaboração. O que diminuiu o número total de amostras.

Em adição, outra dificuldade enfrentada para as análises foi a grande instabilidade dos genes endógenos por nós utilizados frente a curva para amplificação durante as análises do RTq-PCR. Nesta curva são analisados os números de ciclos onde ocorre as ampliações em função da fluorescência emitida para a amostra em questão. Este número deve ser comparado com um limiar padrão onde ocorre o início de um trecho linear, o que é expresso como Ct. Frente a esta dificuldade deveremos testar outros genes endógenos que nos ajudem a normalizar nossas amostras. Assim, dentre estes outros genes endógenos escolheremos o que se mostre mais estável para a normalização da mesma.

VI DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a administração crônica de paroxetina, um inibidor seletivo da recaptação da serotonina (ISRS), melhorou a função sistólica nos animais com IAo e reduziu a ingestão diária de sódio, tanto nos IAo quando nos controle. O peso do ventrículo esquerdo foi menor nos animais com IAo + parox comparado aos IAo + controle. A expressão gênica para OT e AVP para porções do PVN não foram diferentes até o momento. Parte deve-se as dificuldades encontradas para a padronização da técnica e parte pela amostra reduzida de animais que utilizamos. Porém, devemos ressaltar que os animais com regurgitação e que receberam a parox apresentaram tendência para maior expressão da OT no PVN, uma das nossas hipóteses e que ainda apostamos nela para análises futuras.

Uma das co-morbidades associadas à doenças cardíacas é a depressão, conjunto de transtornos do humor relacionado a estados de ansiedade (GRIPPO e JOHNSON, 2009; PENNINX et al., 2001; VAN DER KOOY et al., 2007). É interessante que a associação entre transtornos do humor e doença cardiovascular são independentes dos fatores de risco tradicionais para as doenças cardiovasculares, como: hipertensão, sobrepeso, hipercolesterolemia, ou histórico de doenças cardíacas (GRIPPO e JOHNSON, 2009; PENNINX et al., 2001). Vários sistemas de neurotransmissores estão desregulados em doenças cardiovasculares e estados depressivos, o que culmina com alterações comportamentais e de respostas fisiológicas. Uma das implicações na patofisiologia da depressão são alterações no metabolismo dos neurotransmissores de monoaminas e seus receptores, particularmente a norepinefrina e a serotonina (5-HT, BRUTON e PARKER, 2010). Os ISRS são os antidepressivos mais prescritos em todo o mundo devido a segurança na posologia e boa tolerabilidade, sendo muito mais seguros em pacientes com doença

cardíaca por diminuir a probabilidade de arritmias (STAHL, 1997; BRUTON e PARKER, 2010). O mecanismo de ação hipotetizado para os ISRS está baseado em ações sobre auto-receptores pré-sinápticos e receptores pós-sinápticos.

Com relação ao comportamento de ingestão de sódio, o envolvimento da 5-HT é bem documentado. Lesões dos núcleos da rafe, um estrutura mesencefálica rica em neurônios serotoninérgicos, com ácido ibotênico aumentam a ingestão de sódio (CAVALCANTE-LIMA et al., 2005); colaborando com outros estudos que postulam que neurônios serotoninérgicos da rafe recebendo informações viscerossensoriais sobre o volume circulante colaboram para manter a homeostasia da ingestão de sódio (FRANCHINI et al., 2002). Em adição, estudos mostraram que em uma estrutura que se comunica reciprocamente com os núcleos da rafe, o núcleo parabraquial lateral, a participação de receptores serotoninérgicos é importante para inibir o comportamento de ingestão de sódio para diferentes protocolos experimentais (DE GOBBI et al., 2000, 2007; DE LUCA et al., 2003; MENANI e JOHNSON, 1995; MENANI et al., 2002). Desta forma, nossos resultados estão em acordo com os estudos que demonstraram a importância de mecanismos serotoninérgicos para o controle da ingestão de sódio.

Agonistas serotoninérgicos injetados periféricamente, bem como drogas liberadoras de serotonina, aumentam as concentrações de ocitocina (OT) no plasma por ativarem receptores 5-HT₂ (SAYDOFF et al., 1991) e receptores 5-HT_{1A} (BAGDY e KALOGERAS, 1993). O tratamento de animais saudáveis com um ISRS, sertralina, aumentou os níveis plasmáticos de vasopressina (AVP) e OT (DE MAGALHÃES-NUNES et al., 2007). A presença de OT é de importância para a liberação de peptídeo natriurético atrial (ANP) pelos átrios. Lesões da eminência média, que bloqueiam a liberação de OT, abolem o efeito natriurético de solução hipertônica injetada no terceiro ventrículo, bem como a liberação de ANP induzida pela expansão de volume isotônico intraatrial (ANTUNES-

RODRIGUES et al., 1991). Em concordância, a expansão de volume é acompanhada por aumentos de OT e ANP plasmáticos (HAANWINCKEL et al., 1995). Nesta linha de raciocínio, podemos imaginar que a melhora na função sistólica possa ser devido ao aumento da OT central e periférica, indiretamente pelo aumento da atividade serotoninérgica central.

Atualmente a OT é vista como um hormônio relacionado à atividade cardíaca. Entre seus potenciais efeitos sobre o sistema cardiovascular citamos a diferenciação de células embrionárias em cardiomiócitos (PAQUIN et al., 2002; JANKOWSKI et al., 2004; NOISEUX et al., 2012); natriurese (ANTUNES-RODRIGUES et al., 1991) e vasodilatação via receptores OT (THIBONNIER et al., 1999). Em modelos experimentais de isquemia cardíaca o tratamento com OT reduziu significativamente o tamanho do infarto e melhorou parâmetros da função cardíaca (JANKOWSKI et al., 2010; KOBAYASHI et al., 2009). Terminais ocitocinérgicos dentro do complexo vagal do núcleo do trato solitário parecem modular reflexos cardíacos, facilitando a atividade vagal para o coração (HIGA et al., 2002). Em adição estudos com treinamento físico mostram aumentos na expressão de OT em núcleos hipotalâmicos, sugerindo que este aumento seja o responsável pelos efeitos benéficos de um treinamento sobre o sistema cardiovascular (CAVALLERI et al., 2011). Nos resultados presentes com a administração de paroxetina não conseguimos, ainda, observar diferenças na expressão de OT no PVN, prolongamentos deste estudo poderão elucidar esta questão.

Além dos efeitos centrais da OT sua participação periférica deve ser ressaltada como moduladora da função cardíaca. Existem sítios para ligação de OT diretamente sobre átrios e ventrículos e estes receptores colaboram para a liberação de ANP (GUTKOSWKA et al., 1997). Os efeitos natriuréticos do ANP parecem depender da OT (HAANWINCKEL et al., 1995). Em adição, os outros peptídeos natriuréticos da família do ANP, o BNP e o CNP, trabalham para a regulação do balanço volêmico da circulação em contraposição aos efeitos do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Tanto o ANP quanto o BNP controlam a

proliferação de fibroblastos cardíacos e interferem com a hipertrofia cardíaca, podendo agir de forma parácrina ou autócrina (JANKOWSKI et al, 1998). Estudos *in vitro* em miócitos ventriculares de rato mostraram que antagonizando a via de transdução do ANP ocorre aumento da síntese de proteínas estimuladas por fenilefrina, entre elas a cadeia pesada de α -miosina (HORIO et al., 2000). Estes peptídeos inibem a síntese de fibroblastos sob condições patológicas (CAO; GARDNER, 1995). A OT também parece exercer neuromodulação parassimpática (MUKADDAM-DAHER et al., 2001) e vasodilatação via produção de óxido nítrico (THIBONNIER et al., 1999). A reperfusão coronária, 2 e 14 dias após ligadura da artéria coronária esquerda em coelhos, com OT reduziu a área infartada e melhorou a função do ventrículo esquerdo (KOBAYASHI et al., 2009). Desta forma, apesar de não termos dosado as concentrações séricas de OT e ANP no presente trabalho, bem como possíveis alterações da expressão de OT no tecido cardíaco, podemos postular que os efeitos benéficos sobre a função cardíaca possam ser decorrentes de alterações sobre a expressão de OT diretamente sobre o coração em nosso estudo. Futuros experimentos neste sentido poderão elucidar tais especulações.

Em conclusão, os dados mostram que aumentos dos níveis de serotonina centrais, pela administração do antidepressivo, foram eficazes em preservar a fração de encurtamento em corações expostos a uma sobrecarga cardíaca subcrônica e foram eficazes em diminuir a ingestão diária de sódio. Experimentos futuros com quantificação da expressão gênica de OT e AVP, centrais e periféricas, poderão colaborar para o melhor entendimento destas observações sobre o coração e comportamento de ingestão.

VII REFERÊNCIAS

ARSENAULT, M; PLANTE, E; DROLET, MC; COUET, J. Experimental aortic regurgitation in rats under echocardiographic guidance. *J Heart Valve Dis.*, v. 111. p.128-34, 2002.

BAGDY, G; KALOGERAS, K T; Stimulation of 5-HT₁ and 5-HT_{2/5-HT2c} receptors induces oxytocin release in the male rat. *Brain Res.*, v. 611. p.330-332, 1993.

BRUTON, L L; PARKER, K L (Eds). *Goodman e Gilman Manual de farmacologia e terapêutica*, p.1219, Porto Alegre: AMGH, 2010.

BUSTIN, AS; BENES, V; GARSON, JA; HELLEMANS, J; HUGGETT, J; KUBISTA, M; MUELLER, R; NOLAN, T; PFAFFL, MW; SHIPLEY, GL; VANDESOMPELE, J; WITTEWER, CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.*, v. 55. p.611-22, 2009.

CAO, L; GARDNER, DG. Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension*; v.25. p. 227-234, 1995.

CAVALCANTE-LIMA, HR; BADAUÊ-PASSOS, D JR; DE-LUCCA, W JR; LIMA, HR; COSTA-E-SOUSA, RH; OLIVARES, EL; CEDRAZ-MERCEZ, PL; REIS, RO; MEDEIROS, MA; CÔRTEZ, WS; REIS, LC. Chronic excitotoxic lesion of the dorsal raphe nucleus induces sodium appetite. *Braz J Med Biol Res.*, v.38. p.1669-5, 2005.

CAVALLERI, MT; BURGI, K; CRUZ, JC; JORDÃO, MT; CERONI, A; MICHELINI, LC. Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, v.301. p.958-66, 2011.

DE GOBBI, JI; MARTINEZ, G; BARBOSA, SP; BELTZ, TG; DE LUCA, LA JR; THUNHORST, RL; JOHNSON, AK; MENANI, JV. 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors in the lateral parabrachial nucleus mediate opposite effects on sodium intake. *Neuroscience*; v.146. p.453-61, 2007.

DE GOBBI, JI; DE LUCA, LA Jr; MENANI, JV. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. *Brain Res.*, v.880. p.131-8, 2000.

DE LUCA, LA JR; BARBOSA, SP; MENANI, JV. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. *Neuroscience*; v.121. p.1055-61, 2003.

FLEIGE, S; PFAFFL, MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.*; v.27. p.126-39, 2006.

FRANCHINI, LF; JOHNSON, AK; DE OLMOS, J; VIVAS, L. Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* ; v.282. p.235-43, 2002.

GRIPPO, AJ; JOHNSON, AK. Stress, depression and cardiovascular dysregulation: a review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. *Stress.*; v.12. p.1-21, 2009.

GUTKOWSKA, J; JANKOWSKI, M; LAMBERT, C; MUKADDAM-DAHER, S; ZINGG, HH; MCCANN, SM. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*; v. 94. p.11704-9, 1997.

HIGA, KT; MORI, E; VIANA, FF; MORRIS, M; MICHELINI, LC. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; v.282. p.537-45, 2002.

HORIO, T; NISHIKIMI, T; YOSHIHARA, F; MATSUO, H; TAKISHITA, S; KANGAWA, K. Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension*; v. 35. p.19-24, 2000.

JANKOWSKI, M; HAJJAR, F; KAWAS, SA; MUKADDAM-DAHER, S; HOFFMAN, G; MCCANN, SM; GUTKOWSKA, J. Rat heart: a site of oxytocin production and action. *Proc Natl Acad Sci U S A*; v. 95. p.14558-63, 1998.

KOBAYASHI, H; YASUDA, S; BAO, N; IWASA, M; KAWAMURA, I; YAMADA, Y; YAMAKI, T; SUMI, S; USHIKOSHI, H; NISHIGAKI, K; TAKEMURA, G; FUJIWARA, T; FUJIWARA, H; MINATOBUCHI, S. Postinfarct treatment with oxytocin improves cardiac function and remodeling via activating cell-survival signals and angiogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 54. p.510-9, 2009.

LIMA, HR; CAVALCANTE-LIMA, HR; CEDRAZ-MERCEZ, PL; COSTA-E-SOUSA, RH; OLIVARES, EL; BADAUÊ-PASSOS, D JR; MEDEIROS, MA; CÔRTEZ, WS; REIS, LC. Brain serotonin depletion enhances the sodium appetite induced by sodium depletion or beta-adrenergic stimulation. *An Acad Bras Cienc.*; v.76. p. 85-92, 2004.

LIVAK, KJ; SCHMITTGEN, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25; p. 402-8, 2001.

DE MAGALHÃES-NUNES, AP; BADAUÊ-PASSOS, D JR; VENTURA, RR; GUEDES DDA, S JR; ARAÚJO, JP; GRANADEIRO, PC; MILANEZ-BARBOSA, HK; Da COSTA-E-SOUSA, RH; DE MEDEIROS, MA; ANTUNES-RODRIGUES, J; REIS, LC. Sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, affects thirst, salt appetite and plasma levels of oxytocin and vasopressin in rats. *Exp Physiol.* ; v.92. p.913-22, 2007.

MENANI, JV; BARBOSA, SP ; DE LUCA, LA JR ; DE GOBBI, JI ; JOHNSON, AK. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; v.282. p.R837-41, 2002.

MENANI, JV; JOHNSON, AK. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. *Am J Physiol.*; v.269. p.1044-9, 1995.

MUKADDAM-DAHER, S; LIN, YL; ROY, J; GUTKOWSKA, J; CARDINAL, R. Negative inotropic and chronotropic effects of oxytocin. *Hypertension*; v. 38. p. 292-296, 2001.

PENNINX, BW; BEEKMAN, AT; HONIG, A; DEEG, DJ; SCHOEVERS, RA; VAN EIJK, JT; VAN TILBURG, W. Depression and cardiac mortality: results from a community-based longitudinal study. *Arch Gen Psychiatry.* ; v.58. p.221-7, 2001.

PLANTE, E; GAUDREAU, M; LACHANCE, D; DROLET, MC; ROUSSEL, E; GAUTHIER, C; LAPOINTE, E; ARSENAULT, M; COUET, J. Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents volume overload cardiomyopathy in experimental chronic aortic valve regurgitation. *can j physiol pharmacol.* ; v.82. p.191-9, 2004a.

PLANTE, E; LACHANCE, D; GAUDREAU, M; DROLET, MC; ROUSSEL, E; ARSENAULT, M; COUET, J. Effectiveness of beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. *Circulation;* v.110. p.:1477-83, 2004b.

REIS, LC; RAMALHO, MJ; ANTUNES-RODRIGUES, J. Effect of central administration of serotonergic agonists on electrolyte excretion control. *Braz J Med Biol Res.;* v. 24. p.633-41, 1991.

SANH, DJ; DEMARIA, A; KISSLO, J; WEYMAN, AE. The Committee on M-mode standardization of the American Society of Ecocardiography. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circ.;*v. 58. p.1072-83,1978.

SAYDOFF, JA; RITTENHOUSE, PA; VAN DE KAR, LD; BROWNHELD, MS. Enhanced serotonergic transmission stimulates oxytocin secretion in conscious male rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v.257. p.95-99, 1991.

STAHL, SM. *Psicofarmacologia dos antidepressivos.* s.l. MARTIN DUNITZ; p.114, 1997.

THIBONNIER, M; CONARTY, DM; PRESTON, JA; PLESNICHER, CL; DWEIK, RA; ERZURUM, SC. Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. *Endocrinology;* v. 140. p.1301–1309, 1999.

TUCKER, P; ADAMSON, P; MIRANDA, R JR; SCARBOROUGH, A; WILLIAMS, D; GROFF, J; MCLEAN, H. Paroxetine increases heart rate variability in panic disorder. *J Clin Psychopharmacol.;*v. 17 p.370-6, 1997.

VAN DER KOOY, K; VAN HOUT, H; MARWIJK, H; MARTEN, H; STEHOUWER, C; BEEKMAN, A. Depression and the risk for cardiovascular diseases: systematic review and meta analysis. *Int J Geriatr Psychiatry;* v.22. p.613-26, 2007.