



Mecanismos moleculares envolvidos na hipertrofia cardíaca em ratos com regurgitação aórtica tratados com paroxetina

Ana Carolina Mieko Omoto

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Robson Francisco Carvalho

BOTUCATU – SP

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Mecanismos moleculares envolvidos na hipertrofia cardíaca em
ratos com regurgitação aórtica tratados com paroxetina

Ana Carolina Mieko Omoto
Robson Francisco Carvalho
Juliana Irani Fratucci De Gobbi

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Robson Francisco Carvalho

BOTUCATU – SP
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRE 8/5651

Omoto, Ana Carolina Mieko.

Mecanismos moleculares envolvidos na hipertrofia cardíaca em ratos com regurgitação aórtica tratados com paroxetina / Ana Carolina Mieko Omoto. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Robson Francisco Carvalho

Coorientador: Juliana Irani Fratucci De Gobbi

Capes: 20702027

1. Coração - Hipertrofia. 2. Insuficiência aórtica - Aspectos moleculares. 3. Antidepressivos 4. Expressão gênica.

Palavras-chave: Expressão gênica; Fração de encurtamento; H9c2; Paroxetina; Regurgitação aórtica.

*Para os meus maiores e eternos mestres: Mario Omoto e Irene Baggio Omoto. Dedico à vocês
não apenas uma dissertação e um título, mas todo o amor que existe dentro de mim.*

Em primeiro lugar agradeço às duas pessoas mais importantes da minha vida, sem as quais não teria chegado até aqui, meus pais: Mario Omoto e Irene Baggio Omoto, gratidão por fazerem dos meus sonhos o sonho de vocês e por lutarem ao meu lado pela conquista de cada um deles.

Sem vocês meu mundo cairia.

Às mulheres da minha vida: Yaeko Omoto, Lidia Baptista Baggio e Adriana Sayuri Omoto.

São minha fonte de inspiração, humanidade, compaixão, força e saudades.

Gratidão por simplesmente existirem.

Aos amigos que por providencial artimanha do destino encontrei nos laboratórios, mas que levei para minha vida: Paloma Grazielle Bittencourt da Silva, Tassiana Gutierrez De Paula, Leonardo Nazário de Moraes, Geysson Javier Fernandez, Ivan José Vechetti Jr., Juarez Henrique Ferreira, Edson Mareco, Rafaela Nunes, Bruno Duran e Warlen Pereira Piedade, gratidão por toda força, por toda escuta e por acreditarem em mim quando eu mesma não conseguia.

O caminho até aqui teria sido muito mais difícil sem o carinho e apoio vocês.

Aos irmãos que ganhei quando cheguei em Botucatu: André Teves Aquino Gonçalves de Freitas, Amanda Della Coletta, Cristiane Pinho, Juliana Fernandes de Matos e Carla de Moraes, gratidão por estarem presentes em minha vida mesmo quando me ausentei da vida de vocês.

Àquele que enche meus dias de luz com seu amor incondicional e me estende a mão todas as vezes que preciso vencer meus maiores medos: Guilherme Oliveira Gasperini, gratidão por tanto carinho e compreensão.

Às amigas de uma vida: Natália de Freitas Claro, Adriane Dalceno Viana e Priscilla Yukie Kiyota, gratidão por nunca se ausentarem mesmo de tão longe. Meu coração se acalma quando penso que sempre estarão ao meu lado.

Àqueles que, com tanta alegria, proporcionam condições para que nossos trabalhos se realizem: Janete C. Teixeira, Antônio C. B. Tardivo, Luciana S.A. Morgatto e Lilian Morcelli. Gratidão.

À Meliza Goi Roscani, gratidão pela parceria de tantos anos.

Ao professor Robson Francisco Carvalho, gratidão por acreditar e apoiar nossas ideias com tanta paciência e cuidado.

E finalmente, à maior responsável por fazer um sonho virar realidade: Juliana Irani Fratucci De Gobbi, gratidão pelo tempo dedicado à minha formação, por toda paciência e carinho ao ensinar, por todos os sonhos construídos ao longo desses 7 anos de parceria, por todas as conquistas e por todo aprendizado adquirido nos momentos difíceis, por sua amizade verdadeira e, acima de tudo, por sempre acreditar em mim. Não importa o lugar, o tempo que passar e a direção que nossos caminhos tomarem será sempre minha eterna orientadora.

"Ao olhar para mim, sinto a presença de muitas pessoas. Não teria chegado até aqui, da mesma forma, sem elas. Gente da minha família de sangue. Gente da família que o meu coração cria, vida afora. Gente que encontrei em algum ponto do caminho. Muitas me ajudaram sem sequer perceber. Recebi, em diferentes momentos, a dádiva de gestos de cuidado e amor que fizeram toda diferença. Mesmo os mais singelos foram providenciais: sorrisos, olhares, escutas, abraços, palavras, silêncios compartilhados quando a presença diz tanto..." (Ana Jacomo)

“Somos todos anjos com uma asa só e só podemos voar quando abraçados uns aos outros”

Luciano de Crescenzo

RESUMO

A regurgitação aórtica (RA) determina sobrecarga de volume ao coração culminando com dilatação e hipertrofia excêntrica do ventrículo esquerdo. Uma das co-morbidades associada às doenças cardiovasculares é a depressão. Entre os antidepressivos mais prescritos encontramos os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS). O tratamento com paroxetina (parox), um ISRS, preserva a fração de encurtamento do coração de ratos com RA. Alterações neurohumorais e periféricas podem estar envolvidas nessa melhora. A parox favorece a neurotransmissão serotoninérgica e pode aumentar a ocitocina e/ou peptídeos natriuréticos circulantes, ou pode ter ação direta sobre o coração melhorando a contratilidade cardíaca. Visando compreender melhor o efeito do tratamento com a parox na preservação da fração de encurtamento, verificamos a expressão de genes envolvidos com a hipertrofia e contratilidade cardíacas *in vivo* e *in vitro*. Para o estudo *in vivo*, ratos Wistar (280-300kg) foram submetidos à cirurgia de RA ou controle. A RA foi induzida por punção retrógrada dos folhetos valvares e as variáveis morfofuncionais foram analisadas por ecocardiograma, nas semanas 4 e 8 de observação. Os animais foram divididos em 4 grupos: RA+Parox, RA+Salina, Cont+Parox e Cont+Salina, e a partir da 4ª semana parox (10mg/kg) foi administrada subcutaneamente por 4 semanas e salina foi utilizada como controle. Na 8ª semana, os animais foram eutanasiados para a coleta do tecido cardíaco e posterior análise da expressão gênica por RT-qPCR de marcadores cardíacos de hipertrofia nos grupos experimentais. No estudo *in vitro* utilizamos a linhagem celular H9c2 para testar o efeito da parox (300µM) sobre essas células previamente desafiadas ou não com fenilefrina (fenil, 100µM). Os resultados *in vivo* mostraram que a RA produziu alterações morfofuncionais no coração relacionadas à sobrecarga de volume e aumentou a expressão gênica de marcadores de hipertrofia cardíaca. Em adição, o grupo RA+Parox preservou a fração de encurtamento (45,67±1,52 vs 31,97±3,08) e diminuiu a expressão gênica da isoforma β-MyHC (1,45±0,14 vs 1,97±0,15), dos microRNAs -208b (1,29±0,09 vs 2,37±0,09) e -499 (0,69±0,06 vs 1,34±0,06), do BNP(1,30±0,02 vs 1,41±0,02) e das GRK2 (1,14±0,05 vs 1,39±0,05) comparado aos animais do grupo RA+Salina. No estudo *in vitro* não houve alteração dos genes estudados (α-MyHC, β-MyHC, ANP, BNP e α-actina esquelética), tanto para o tratamento com parox quanto com a fenil, na linhagem H9c2. Desta forma, nossos resultados

mostram que a parox melhora a função sistólica de ratos com RA por diminuir a expressão de genes relacionados a deterioração das funções cardiovasculares, bem como de fatores pós-transcricionais que são importantes reguladores da expressão gênica da β -MyHC.

ABSTRACT

Title: Molecular mechanisms involved in cardiac hypertrophy in aortic regurgitation rats treated with paroxetine

Aortic regurgitation (AR) causes volume overload to the heart culminating with left ventricle dilation and eccentric hypertrophy. A very common co-morbidity associated with cardiovascular disease is depression. Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRI) are widely prescribed as antidepressants. Our laboratory has showed that paroxetine (parox), an SSRI, treatment for 4 weeks prevented ventricular dilation preserving fractional shortening. Neurohumoral and peripheral changes might be involved in this improvement. Our hypothesis is that parox could act indirectly, in a oxytocin-dependent manner, or directly in the heart. Trying to understand the mechanism involved in the improvement of fractional shortening, we verify the expression of several genes involved in heart hypertrophy *in vivo* and *in vitro*. For the *in vivo* studies male Wistar rats (280-300kg) were submitted to AR surgery, by retrograde puncture of the aortic valves leaflets, or sham surgery. Morphofunctional variables of the hearts were analyzed by echocardiograms at week 4 and 8. The animals were divided in 4 groups: AR+Parox, AR+Saline, Sham+Parox and Sham+Saline. Parox (10mg/kg) was administered subcutaneously for 4 weeks and saline was used as control. At week 8 the animals were euthanized for tissue collection and posterior analysis of hypertrophic markers gene expression by RTq-PCR. To investigate the effects of parox *in vitro* we use H9c2 cell line. This cells were pre-treated or not with phenylephrine (phenil, 100 μ M), an α -adrenergic agonist, and then parox (300 μ M) was added to the culture. Our results show that AR model was able to produce morphofunctional changes, related to volume overload, in the heart and increase gene expression of cardiac hypertrophy markers. In addition, AR+Parox group preserved fractional shortening (45,67 \pm 1,52 vs 31,97 \pm 3,08) and decrease gene expression of β -MyHC (1,45 \pm 0,14 vs 1,97 \pm 0,15), microRNAs -208b (1,29 \pm 0,09 vs 2,37 \pm 0,09) and -499 (0,69 \pm 0,06 vs 1,34 \pm 0,06), BNP(1,30 \pm 0,02 vs 1,41 \pm 0,02) and GRK2 (1,14 \pm 0,05 vs 1,39 \pm 0,05) compared with AR+Saline group. However, in *in vitro* experiments neither phenil nor parox treatment modify α -MyHC, β -MyHC, ANP, BNP and α -skeletal actin gene expression in H9c2 cell line. In summary, we demonstrated that parox

treatment improved fractional shortening of AR hearts decreasing the expression of maladaptive genes to the heart and post-transcriptional regulators of β -MyHC expression.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. Introdução	1
1.1. Doenças Cardiovasculares.....	1
1.2. Regurgitação aórtica: etiologia, epidemiologia e fisiopatologia	2
1.3. Depressão e doenças cardiovasculares	5
1.4. Regulação endócrina do coração: o importante papel dos peptídeos natriuréticos no remodelamento cardíaco	6
1.5. A contratilidade cardíaca na RA e as diferentes isoformas da cadeia pesada da miosina (MyHC).....	9
1.6. MicroRNAs no coração.....	10
1.8. Rede MyomiR	12
1.9. Paroxetina e as GRK2 na sinalização adrenérgica	15
1.10. Estudo <i>in vitro</i> : H9c2 e paroxetina.....	16
2. Hipótese	18
3. Objetivos.....	19
3.1. Objetivo geral:.....	19
3.2. Objetivos específicos:	19
3.2.1. Estudo <i>in vivo</i> :	19
3.2.2. Estudo <i>in vitro</i> :	19
4. Materiais e Métodos.....	20
4.1. Animais	20
4.2. Indução da Regurgitação Aórtica.....	20
4.3. Ecocardiograma.....	21
4.4. Administração do antidepressivo	22

4.5. Coleta do tecido cardíaco e perfusão transcardíaca	22
4.6. Avaliação quantitativa da expressão gênica por RT-qPCR (mRNA)	23
4.6.1. Extração de RNA com TRIzol (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific)	23
4.6.2. Gel analítico de agarose para verificação da integridade do RNA	24
4.6.3. Eletroforese Capilar para confirmação da integridade do RNA (Agilent 2100 Bioanalyser)	24
4.6.4. Tratamento do RNA com DNase	25
4.6.5. Reação de Transcrição Reversa (RT)	26
4.6.6. Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)	26
4.6.7. Teste de eficiência dos primers	30
4.7. Avaliação quantitativa da expressão gênica por RT-qPCR (microRNA)	31
4.7.1. Transcrição Reversa:	31
4.8. Avaliação quantitativa da expressão proteica por Western Blot	32
4.9. Cultura celular	34
4.10. Análise estatística	35
5. Resultados	36
5.1. 1 Análise morfológica dos parâmetros cardiovasculares 4 ^a semana (Ecocardiograma) ..	36
5.1.2 Análise morfológica dos parâmetros cardiovasculares 8 ^a semana (Ecocardiograma) ...	37
5.2. Análise da Expressão Gênica: estudo <i>in vivo</i>	39
5.2.1. Quantificação relativa da expressão do gene: α -Actina Esquelética	39
5.2.2. Quantificação relativa da expressão dos genes: ANP, BNP e Oxtr	40
5.2.3. Quantificação relativa da expressão dos genes: MyH6 e MyH7	41
5.2.4. Quantificação relativa da expressão dos genes: Sox6, Pur β e Thrap1	42
5.2.5. Quantificação relativa da expressão dos microRNAs: miR-208a, -208b e -499	43
5.2.8. Quantificação relativa da expressão do gene: GRK2	44

5.3. Análise da Expressão Proteica: estudo <i>in vivo</i>	45
5.3.1. Quantificação da expressão proteica da α -MyHC e β -MyHC.....	45
5.4. Análise da expressão gênica: estudo <i>in vitro</i>	46
5.4.1. Quantificação da expressão gênica: Myh6 e Myh7.....	46
5.4.2. Quantificação da expressão gênica: ANP e BNP	47
5.4.3. Quantificação da expressão gênica: α -actina esquelética	48
5.4.4. Ciclos de amplificação (Cts) dos genes estudados <i>in vitro</i>	49
6. Discussão	50
6.1. Estudo <i>in vivo</i> :	50
6.2. Estudo <i>in vitro</i>	54
7. Conclusão.....	55
8. Referências Bibliográficas	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são caracterizadas por prejuízos na função do coração e dos vasos sanguíneos produzindo distúrbios neuroendócrinos e autonômicos. Responsáveis por mais de 17 milhões de mortes por ano as DCVs são a principal causa de mortes no mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde¹, e englobam as doenças coronarianas, acidente vascular cerebral, hipertensão, cardiomiopatia reumática, falência cardíaca e doenças congênitas do coração.

Dentre os principais fatores de risco comportamentais que resultam nas DCVs estão o tabagismo, o sedentarismo, a má alimentação e o uso de álcool. A exposição, em longo prazo, a esses fatores resulta em hipertensão, aumento dos níveis sanguíneos de glicose (diabetes) e lipídeos (dislipidemia) e a obesidade¹.

Apesar de não estar entre as principais causas das DCVs, a febre reumática merece atenção devido a sua alta incidência em países em desenvolvimento como o Brasil (figura 1)². Em adição, sua incidência vem aumentando em países desenvolvidos como a forma degenerativa relacionada à idade devido ao aumento na expectativa de vida da população³. A febre reumática é causada pelo *Streptococcus pyogenes* do grupo A e pode resultar na cardiomiopatia reumática crônica se não tratada adequadamente³.

Na cardiomiopatia reumática crônica, uma doença autoimune, ocorre fibrose das válvulas cardíacas impossibilitando seu funcionamento e acarretando, na maioria das vezes, em falência cardíaca e morte². Quando o *Streptococcus pyogenes* do grupo A se aloja no tecido valvar o sistema imune produz anticorpos para combatê-lo, entretanto, esses anticorpos iniciam uma reação cruzada com as células cardíacas, a qual culmina com a destruição das células cardíacas². Uma vez que as válvulas não funcionam adequadamente, o sangue pode regurgitar, resultando em quadros de falência cardíaca congestiva.

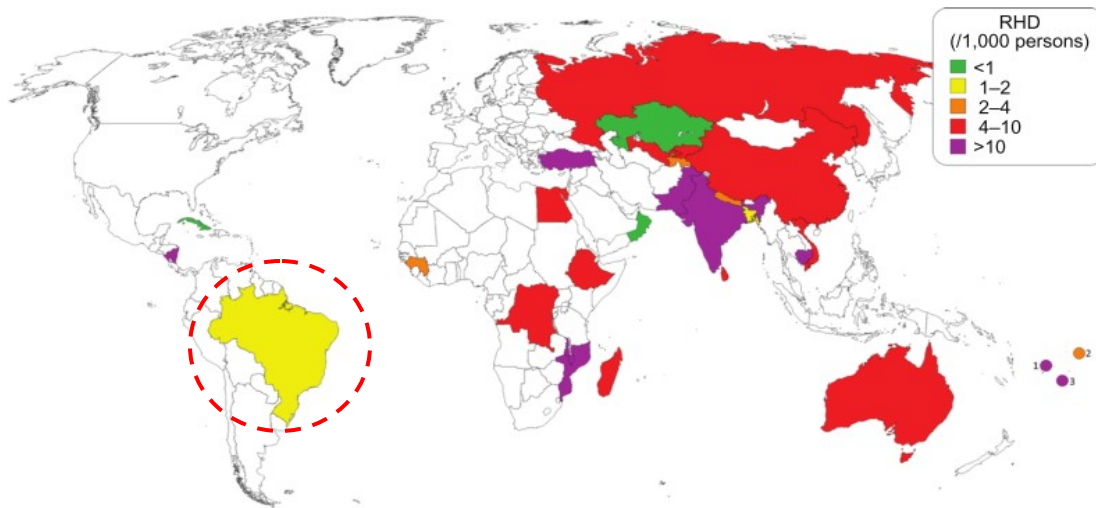


Figura 1: Mapa global mostrando a prevalência da cardiomiopatia reumática crônica em países subdesenvolvidos desde 1991 até 2011, com destaque para o Brasil. (Modificado de Seckeler and Hoke, Clin. Epidemiol., 2011; 3: 67-84).

1.2. Regurgitação aórtica: etiologia, epidemiologia e fisiopatologia

A regurgitação aórtica (RA), uma situação de sobrecarga hemodinâmica, é caracterizada pelo refluxo diastólico do sangue da aorta para o ventrículo esquerdo (VE) devido ao mal fechamento das cúspides aórticas⁴. Como causas da RA podemos destacar: endocardite, degeneração valvar, anormalidades congênitas como válvula aórtica bicúspide, dilatação aórtica idiopática, uso de drogas anoréticas e a cardiopatia reumática crônica^{5,6,7}. A febre e a cardiopatia reumática crônica ainda são um grande problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil⁸. Por outro lado, em países desenvolvidos, as doenças valvares degenerativas vêm se tornando uma causa comum de doenças cardiovasculares somado ao aumento na expectativa de vida da população^{3,6}. Cabe apontar que RA envolvida com anormalidades no arco aórtico, como dilatação, e dilatação da aorta ascendente se tornou comum em países ocidentais⁶. Pacientes jovens são especialmente acometidos pela doença valvar, em especial no Brasil^{5,7}.

A RA é uma doença que está associada a um longo período assintomático no qual o VE sofre dilatação e hipertrofia progressivas em resposta a sobrecarga de volume determinada pelo mal funcionamento da válvula aórtica^{4,9}. O grau de severidade desta patologia varia de acordo com sua etiologia e é classificada em: leve, aguda grave, crônica grave compensada e crônica

grave descompensada. Esta classificação leva em consideração alterações estruturais, funcionais e hemodinâmicas (figura 2) causadas pela doença⁴.

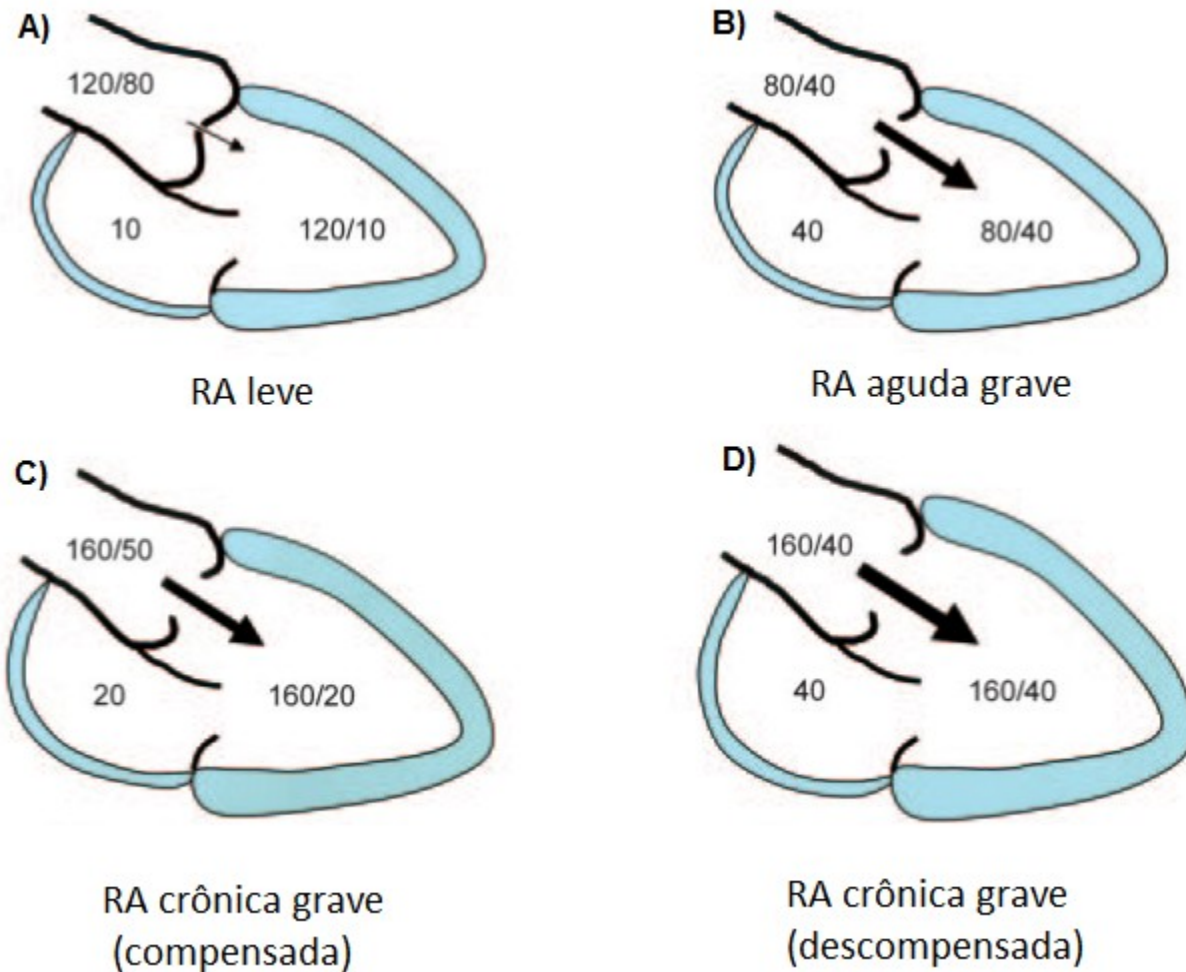


Figura 2: Esquema representativo dos diferentes estágios da RA. A) RA leve (Mild AR) os parâmetros hemodinâmicos, função e tamanho do ventrículo esquerdo (VE) estão normais. B) RA aguda grave (Acute severe AR) a pressão do VE se iguala a pressão na aorta, há também um aumento na pressão do átrio esquerdo e conseqüente edema pulmonar. C) Em estados crônicos a RA pode estar compensada (Chronic severe AR compensated) e apresentar indícios de dilatação do VE e hipertensão sistólica; a fração de ejeção permanece inalterada devido ao aumento do retorno venoso; os parâmetros de enchimento ventricular se apresentam normais. D) RA crônica descompensada (Chronic severe AR decompensated) o VE está dilatado e hipertrofiado devido ao aumento crônico da resistência periférica; o débito cardíaco diminui e a fibrose e hipertrofia do VE resultam em diminuição da fração de ejeção e diminuição na complacência ventricular o que aumenta a pressão de enchimento do VE; (Modificado de Bekerredjian e Grayburn, *Circulation* 2005; 112:125-134).

Com o intuito de manter a homeostase do sistema circulatório frente à sobrecarga de volume que o coração está exposto, várias compensações importantes são iniciadas. A pós-carga do VE está aumentada devido ao aumento do diâmetro diastólico final que aumenta o estresse da parede do VE⁶. O volume sistólico está aumentado o que colabora para aumentar a pressão arterial e piora a pós-carga do VE⁶. A combinação do excesso de pré- e pós-carga conduz a progressiva dilatação do VE e disfunção sistólica. Tal disfunção se assemelha a insuficiência cardíaca (IC).

Assim, é importante destacar que em estados crônicos compensados da RA o VE se adapta a sobrecarga de volume através de uma hipertrofia excêntrica que é caracterizada pela deposição de sarcômeros em série e alongamento dos miócitos ventriculares o que determina um aumento no diâmetro intracavitário e afinamento da parede do VE^{6,10-12}. A hipertrofia excêntrica preserva, em curto prazo, a complacência diastólica do VE e conseqüentemente a pressão de enchimento se mantém normal. Já em estados crônicos descompensados da RA a disfunção sistólica é acompanhada por uma diminuição da complacência diastólica do VE devido à hipertrofia e fibrose. Desta forma, ocorre um aumento na pressão de enchimento do VE o que culmina em sintomas de IC^{4,6}, uma síndrome complexa que pode resultar de qualquer desordem funcional ou estrutural que prejudique a capacidade do ventrículo em preencher-se com ou ejetar sangue. A IC também desenvolve hipertrofia excêntrica^{13,14}.

Estas alterações sobre a função sistólica eliciam uma série de mecanismos tanto neurais quanto humorais para compensar as alterações do fluxo sanguíneo. Ainda faltam pesquisas em como estes mecanismos estão alterados na RA, mas na IC existe uma série de estudos que mostram uma exacerbação na atividade do sistema nervoso autônomo simpático para o coração e vasos e um aumento na atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)^{15,16}.

Na RA, o tratamento com o antagonista adrenérgico β_1 , atenolol, contribui para minimizar a hipertrofia do VE⁹, enquanto que o tratamento com captopril, um inibidor da enzima conversora da angiotensina II, melhora o metabolismo cardíaco e favorece a sobrevivência de ratos com RA severa¹⁷. Assim, os mecanismos neurais e humorais ativados na RA parecem ser os mesmos da IC, talvez com uma intensidade diferenciada dependendo da fase de desenvolvimento da doença.

Vale lembrar que esses mecanismos são extremamente importantes para o reestabelecimento da homeostase cardíaca em curto prazo, porém cronicamente a exacerbação

destes mecanismos resulta em prejuízos, muitas vezes irreversíveis, ao coração e seu bom funcionamento.

1.3. Depressão e doenças cardiovasculares

Uma das co-morbidades associadas à doenças cardiovasculares é a depressão, conjunto de transtornos do humor relacionado a estados de ansiedade^{18,19,20,21}. 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^{18,19}. Vários sistemas de neurotransmissores estão desregulados na depressão, sendo a serotonina (5-HT) o principal²². Entre as classes de antidepressivos mais utilizadas temos os tricíclicos e os inibidores seletivos da recepção da 5-HT (ISRS)^{22,23}. Os tricíclicos apresentam efeitos adversos associados ao sistema cardiovascular como hipotensão postural e maior probabilidade para induzir arritmias^{22,23}. Por outro lado, os ISRS apresentam vantagens sobre a segurança na posologia e boa tolerabilidade, sendo mais seguros por reduzir a probabilidade de arritmias^{23,22}, e agregação plaquetária²⁰ em pacientes cardíacos. 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^{22,23}. Assim, o fluxo de impulsos neuronais consegue ativar a liberação de 5-HT pelo terminal axônico²³.

Sabe-se que a administração de agonistas da 5-HT induzem secreção de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT)^{24,25}. Em animais saudáveis, o tratamento com um ISRS, sertralina, aumentou os níveis plasmáticos de AVP e OT²⁶. Com relação à OT, este neuropeptídeo é importante para a liberação de peptídeo natriurético atrial (ANP) pelos átrios²⁷. 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 intra-atrial²⁸. Em concordância, a expansão de volume é acompanhada por aumentos de OT e ANP plasmáticos²⁹.

O tratamento com paroxetina (parox), um ISRS, em ratos com RA subcrônica preservou a fração de encurtamento do coração e diminuiu a ingestão de sódio destes animais³⁰. Os mecanismos

envolvidos para esta preservação na fração de encurtamento ainda não são conhecidos. Entre as possibilidades podemos sugerir que o aumento da neurotransmissão serotoninérgica central possa aumentar tanto a liberação quanto a neurotransmissão da OT. A OT pode ter efeitos centrais modulando a atividade de regiões envolvidas com a regulação cardiovascular e também pode atuar diretamente sobre as células cardíacas. Com relação a atividade cardiovascular, existem neurônios ocitocinérgicos no complexo dorso vagal do bulbo que quanto mais estimulados favorecem a ação do sistema nervoso autônomo parassimpático sobre o coração, o que pode contribuir para a função cardiovascular e preservar a fração de encurtamento³¹. Por outro lado, a OT circulante pode favorecer o metabolismo cardíaco diretamente, a reperfusão cardíaca com OT após infarto do miocárdio melhora a função do ventrículo esquerdo de coelhos³². Também não podemos descartar a possibilidade que tais efeitos possam ser ação da parox diretamente sobre o coração mediando respostas intracelulares.

1.4. Regulação endócrina do coração: o importante papel dos peptídeos natriuréticos no remodelamento cardíaco

A descoberta dos peptídeos natriuréticos (NPs) foi um importante avanço na pesquisa cardiovascular, pois introduziu o conceito de que o coração também exerce função de órgão endócrino³³. O primeiro peptídeo natriurético descoberto foi o peptídeo natriurético atrial (ANP), em 1981, e nas décadas seguintes, a descoberta do peptídeo natriurético cerebral (BNP) e do peptídeo tipo-C (CNP) estabeleceu uma família de hormônios envolvidos na regulação do balanço volêmico e da pressão arterial por induzirem natriurese, diurese, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular³³⁻³⁶. No entanto, sabe-se que as ações dos NPs vão além; tanto o ANP como o BNP também estão implicados com ações diretas ao coração e o CNP com ações voltadas sobre a musculatura lisa³⁷.

Os genes dos NPs codificam pró-hormônios que são clivados por enzimas específicas para dar origem aos peptídeos maduros. A propriedade comum entre as moléculas dos NPs é a presença de uma ponte dissulfídica que resulta em uma estrutura em forma de anel com uma sequência de aminoácidos altamente conservada e necessária para reconhecimento e ligação dos NPs aos seus receptores. Em contrapartida, a sequência de aminoácidos presente nas

extremidades carbox-terminal e amino-terminal são completamente divergentes entre os três NPs
38

A função dos NPs está diretamente relacionada aos seus receptores e, até o momento, foram descobertos três tipos: NPRA, NPRB e NPRC³⁹. Os receptores NPRA e NPRB pertencem a família dos receptores guanilil ciclase (GC), que ativam a cascata intracelular dependente de GMPc e, tanto o ANP quanto o BNP, ligam-se a esse receptor ativando assim a mesma via intracelular^{40,41}. O efeito intracelular desses receptores nas células cardíacas e vasculares é mediado pela PKG (proteína quinase G), uma quinase que fosforila alvos como a fosfolambam (PLN) e canais de cálcio do tipo lento (L-type Ca²⁺), importantes reguladores da concentração de cálcio intracelular (figura 3)⁴² e, portanto, intimamente relacionados à regulação da contratilidade e remodelamento cardíaco⁴³.

O ANP e o BNP são sintetizados e armazenados em grânulos nos miócitos atriais do coração de mamíferos⁴⁴⁻⁴⁶ e são liberados na corrente sanguínea frente à distensão atrial e estímulos neurohumorais^{44,47}. Assim, a sobrecarga de volume ao coração está intimamente associada a liberação dos NPs que trabalham para a regulação do balanço volêmico em contraposição aos efeitos do SRAA. Nessas situações, os NPs atuam não apenas como reguladores dos parâmetros hemodinâmicos mas como potentes fatores locais com ações anti-hipertróficas e anti-fibróticas⁴⁸.

Corroborando com essas informações, estudos mostraram que o ANP e o BNP controlam a proliferação de fibroblastos cardíacos e interferem com a hipertrofia cardíaca, agindo de forma parácrina e/ou autócrina⁴⁹, e inibem a síntese de fibroblastos sob condições patológicas⁵⁰. Além disso, animais *knockout* para o gene do receptor ativado por ANP e BNP (NPRA) apresentaram um aumento significativo da pressão arterial sistêmica e uma acentuada hipertrofia cardíaca⁵¹⁻⁵³.

Recentemente, a associação entre os níveis plasmáticos aumentados de ANP e BNP apontam para redução da sobrevida de pacientes com cardiomiopatias⁵⁴ e estão correlacionados com parâmetros morfofuncionais do coração como, por exemplo, a fração de encurtamento, índice que reflete a função sistólica⁵⁵.

Tomando como base estudos genéticos, foi demonstrado que a expressão gênica do ANP e BNP está aumentada no ventrículo esquerdo de ratos expostos à sobrecarga de pressão⁵⁶ e esses mesmo genes possuem sua expressão aumentada em corações com cardiomiopatias dilatadas, cardiomiopatias isquêmicas e doenças cardíacas congênitas⁵⁷.

Vale ressaltar que a concentração plasmática de BNP está aumentada em pacientes com RA crônica⁵⁸ e que, antagonizando-se a via de transdução do ANP, foi demonstrado *in vitro* que miócitos ventriculares de ratos aumentam a síntese de proteínas como a isoforma β da cadeia pesada da miosina (β -MyHC)⁵⁹. Desta forma, é de fundamental importância o estudo dos NPs e sua atuação não só como hormônios circulantes que regulam o balanço volêmico e pressão arterial, mas como fatores autócrinos e parácrinos que exercem função diretamente no coração regulando a vias intracelulares relacionadas ao remodelamento cardíaco.

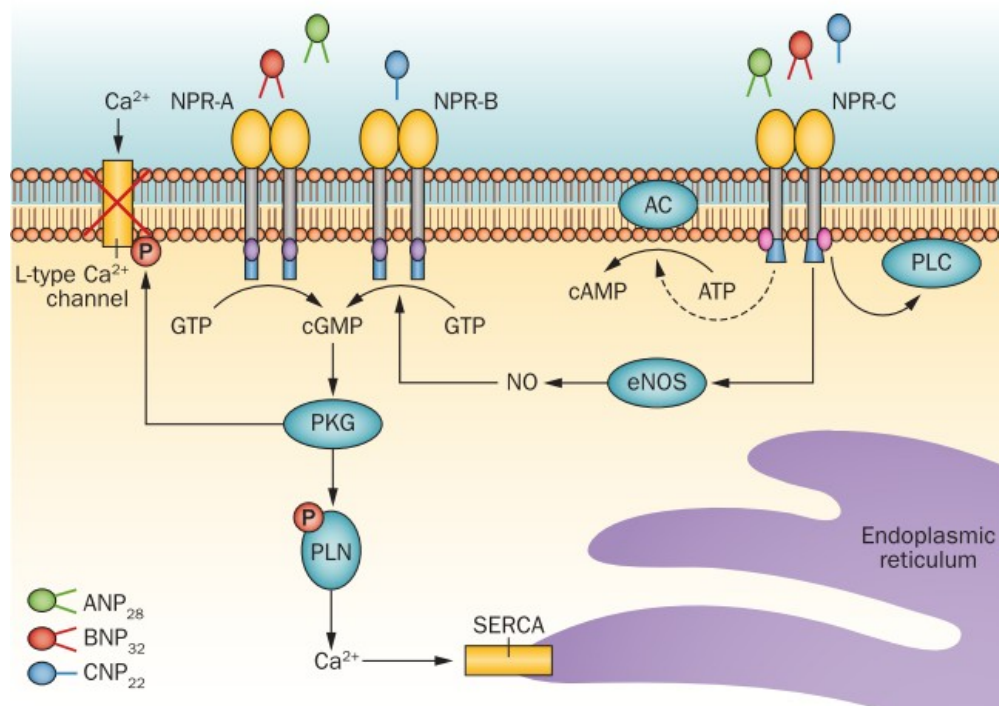


Figura 3: Efeito dos NPs através da ativação dos receptores transmembrana NPRA, NPRB e NPRC. NPRA e NPRB são receptores da família guanilil ciclase (GC) que ativam a mesma via intracelular na qual o segundo mensageiro, GMPC (monofosfato cíclico de guanosina), ativa PKG, que por sua vez, fosforila alvos relacionados a concentração de cálcio intracelular como a fosfolambam (PLN) e os canais de cálcio do tipo lento (L-type Ca²⁺). O NPRC atua através da inibição da adenilato ciclase (AC), da ativação da fosfolipase C (PLC) ou ainda, através da ativação da oxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Modificado de Zois, N. E. et al. Nat. Rev. Cardiol. 2014; 11: 403–412).

1.5. A contratilidade cardíaca na RA e as diferentes isoformas da cadeia pesada da miosina (MyHC)

A capacidade do coração em bombear sangue esta diretamente relacionada a capacidade do miocárdio em gerar força e velocidade de encurtamento⁶⁰, ou seja, a sua capacidade de contrair.

Estudos clínicos e experimentais mostraram que a diminuição da velocidade de encurtamento (fração de encurtamento) do coração é um dos principais defeitos apresentados em quadros de IC⁶¹. Assim como na IC, na RA, os principais índices de disfunção sistólica são o aumento do diâmetro diastólico e sistólico do VE e a diminuição da fração de encurtamento (FE) do coração⁶²⁻⁶⁵. Corroborando com esses dados, estudos do nosso laboratório mostraram que a FE do coração de ratos com RA esta diminuída quando comparada aos animais controle. Estudos revelaram que mudanças na distribuição das isoformas da cadeia pesada da miosina (MyHC), possui um importante papel no controle da FE das fibras cardíacas⁶⁶⁻⁶⁸.

A miosina, principal proteína contrátil do músculo cardíaco, é a responsável pela conversão da energia química, obtida através da quebra das moléculas de ATP, em energia mecânica, possibilitando o encurtamento dos sarcômeros durante o processo de contração. É uma proteína hexamerica contendo duas cadeias pesadas (MyHC) e quatro cadeias leves (MLC).

As MyHCs possuem duas isoformas que diferem pela velocidade de hidrólise do ATP, são elas: α -MyHC que possui velocidade de hidrólise rápida do ATP e portanto, esta relacionada a uma contração mais rápida do músculo cardíaco e β -MyHC que por sua vez, possui velocidade de hidrólise do ATP e contração mais lentas.

Estruturalmente, as MyHCs são subdivididas em duas regiões: 1) C-terminal ou região Rod, que funciona como uma âncora para região S1 e possui os sítios de ligação para Titina e para Miosina ligada a Proteína C, e assim conferindo estabilidade à MyHC no sarcomêro⁶⁹; 2) N-terminal ou região S1(Subfragmento 1), que se dobra em si mesma formando uma estrutura globular, também conhecida como “cabeça da miosina”, que é dividida em dois domínios: motor e regulatório. No domínio motor, encontram-se o sítio de ligação da miosina à actina para a formação das pontes cruzadas no processo de contração, e o sítio com atividade ATPásica, ou seja, responsável pela hidrólise do ATP que confere energia à maquinaria contrátil.

O domínio regulatório da região S1 é o local onde as cadeias leves da miosina (MLC) se ligam com a função de estabilizar o domínio motor e conferir a este uma extensão em seu

comprimento, garantindo uma amplificação na força de contração⁷⁰. As MLCs, através das EF-hands, uma família de proteínas que se liga ao cálcio e se associa à calmodulina e a troponina-C, também modula a geração de força e a cinética das pontes cruzadas de acordo com a disponibilidade de cálcio⁷¹.

A geração de força e a contração muscular são produzidas pela interação cíclica entre a cabeça da miosina e os filamentos de actina. O sítio de ligação do ATP na cabeça da miosina ou região S1 faz a hidrólise desta molécula em ADP e fosfato inorgânico; essa quebra produz energia necessária para o processo de contração e permite a ligação da miosina à actina via interações iônicas. Após a liberação do ADP, a miosina se dissocia da actina e uma nova molécula de ATP se liga à região S1 completando o ciclo. Assim, o ATP controla a afinidade da miosina pela actina durante o ciclo sendo fator crucial para a cinética das pontes cruzadas⁷².

Como a sequência de aminoácidos presente em α - e β -MyHC possui 93% de similaridade, sendo que os aminoácidos distintos fazem parte de *clusters* que estão localizados em regiões de importância funcional para as miosinas como, por exemplo, a região S1⁷³, a diferença na velocidade de contração das isoformas esta relacionada a velocidade de hidrólise do ATP nesta região. Corroborando com esta ideia, estudos mostraram que a velocidade de encurtamento do coração está diretamente relacionada à capacidade da miosina de hidrolisar a molécula de ATP⁷⁴. Desta forma, uma vez que alterações na eficiência da contratilidade cardíaca, como a diminuição da FE, estão presentes na RA e diminuem a eficiência do trabalho cardíaco, e que as isoformas da MyHC são os fatores determinantes da velocidade de hidrólise do ATP no processo de contração é cabível postularmos que a proporção das isoformas da MyHC esteja alterada na RA e que o tratamento com parox possa interferir na expressão gênica destas proteínas.

1.6. MicroRNAs no coração

A descoberta de uma pequena molécula de RNA, codificada a partir do gene *lin-4* que controla o padrão temporal do desenvolvimento de *C. Elegans*, um nematóide utilizado como modelo de organismo multicelular, através da repressão do gene *lin-14* em 1993, deu início a um promissor campo de pesquisa relacionado à regulação pós-transcricional da expressão gênica.

Composto por aproximadamente 22 nucleotídeos, os microRNAs (miRNA) (ver miRBase, <http://microrna.sanger.ac.uk/>) são classificados como pequenas moléculas de RNA não codificante que atuam como importantes reguladores de um grande número de processos celulares através da modulação da expressão gênica⁷⁵ e atualmente vem se destacando como potentes biomarcadores e alvos terapêuticos.

A função de um miRNA é determinada pelo silenciamento do gene alvo através da inibição da transcrição ou degradação de um RNA mensageiro (mRNA)^{76,77}. A maioria dos miRNAs se liga a região 3'UTR (do inglês Untranslated Region) do mRNA em uma sequência de 2 a 8 nucleotídeos denominada região “seed”, essencial para o reconhecimento do mRNA pelo miRNA⁷⁸.

Atualmente, mais de 28645 miRNAs de 223 espécies estão registrados no banco de dado miRBase (miRBase v. 21.0, atualizado em junho de 2014) e esses números tem aumentado a cada ano. Os miRNAs são nomeados como miR- mais números (ex: miR-133), entretanto, existem algumas exceções. Os miRs de sequências similares são geralmente distinguidos por uma letra adicional após o número do miR (ex: miR-133a). Um miR pode atuar sobre múltiplos genes envolvidos em um mecanismo celular específico tornando-os potentes reguladores biológicos e ferramentas eficientes para determinação de vias específicas envolvidas em doenças⁷⁵. Por orquestrar inúmeras funções biológicas atuando na regulação da expressão de genes que codificam proteínas com funções relacionadas, um único miRNA é capaz de modular processos fisiológicos complexos ou mesmo o fenótipo de uma doença através da regulação de uma rede funcional inteira⁷⁹. O advento do estudo dos miRNAs no sistema cardiovascular surgiu com a descoberta de padrões de expressão gênica distintos entre corações de camundongos normais e camundongos com doenças cardíacas⁸⁰.

Usando uma plataforma de 428 miRNAs, Ikeda e colaboradores compararam o padrão de expressão de miRNAs em três diferentes tipos de patologias cardíacas em humanos (cardiopatia isquêmica, cardiopatia dilatada e estenose aórtica) com o padrão de expressão de corações saudáveis. Dentre os 428 miRNAs testados, 87 foram expressos no tecido cardíaco e aproximadamente metade deles eram diferencialmente expressos em pelo menos uma das três cardiopatias⁸¹, o que demonstra a existência de um padrão distinto de expressão dos miRNA para cada cardiopatia estudada e possibilita o desenvolvimento de uma assinatura molecular para o diagnóstico de patologias relacionadas ao coração.

A participação dos miRNAs nos processos de remodelação, crescimento, condutibilidade e contratilidade cardíaca tem sido demonstrada por inúmeros estudos genéticos^{80,82-86} dando destaque para o miR-1 envolvido com a condutibilidade cardíaca através da repressão de importantes genes que regulam a expressão de canais de potássio e junções GAP⁸⁴; o miR-21 que esta relacionado ao crescimento cardíaco e reativação de genes fetais; o miR-133 envolvido em processos de hipertrofia cardíaca⁸², e o miR-208, um dos principais miRNAs expresso no coração por ser exclusivo desse órgão.

O miR-208 é codificado a partir do intron 27 do gene que codifica a isoforma α da cadeia pesada da miosina (α -MyHC). Com a função de manter o fenótipo do músculo cardíaco o miR-208 reprime a expressão das miosinas específicas do músculo esquelético. Além disso, Van Rooij e Olson mostraram que animais *knockout* para o miR-208 (miR-208^{-/-}) são incapazes de produzir hipertrofia cardíaca e de aumentar a expressão de β -MyHC frente a uma sobrecarga pressórica causada por constrição aórtica⁸⁷. Assim, além de manter o fenótipo das fibras cardíacas, o miR-208 também é responsável por controlar a expressão da isoforma β -MyHC no coração.

Considerando que o desbalanço entre α - e β -MyHC, no sentido de um aumento na quantidade de β -MyHC em relação a α -MyHC, reduz a performance mecânica e a eficiência do coração⁸⁸⁻⁹¹ e que o miR-208 é o responsável por modular esse balanço, é cabível apontar o miR-208 como um dos principais miRNAs no músculo cardíaco.

Cabe ressaltar que todos os trabalhos citados acima também trazem a tona a importância da pesquisa básica e sua aplicabilidade na prática clínica visando o aprimoramento do prognóstico de doenças cardíacas através do padrão de expressão dos miRNAs e o desenvolvimento de terapias utilizando os miRNAs como alvos para o tratamento dessas doenças.

1.8. Rede MyomiR

Um estudo realizado por Van Rooij e Olson propôs uma rede de miRNAs, codificados a partir dos genes que dão origem às diferentes isoformas da cadeia pesada da miosina (α - e β -MyHC) e que ficou conhecida como rede MyomiR. Nesse estudo foi demonstrado que a função dos genes Myh6 e Myh7, que codificam α -MyHC e β -MyHC, respectivamente, vai além da

codificação das proteínas contráteis para o controle de uma miríade de funções do músculo estriado⁹². O controle destas funções é feita pelos miRNAs (MyomiRs) codificados a partir dos íntrons dos genes Myh6, Myh7 e Myh7b. Os MyomiRs (miR-208a, miR-208b e miR-499) foram altamente conservados durante a evolução apresentando a mesma sequência de nucleotídeos no genoma de todos os vertebrados. É interessante notar que o surgimento dos MyomiRs foi concomitante com a diversificação das fibras musculares e a aquisição de sensibilidade a hormônios.

O miR-208a é codificado a partir do gene Myh6, que por sua vez, dá origem a isoforma α -MyHC. O miR-208a é necessário para o controle da expressão do gene Myh7, que codifica a isoforma β -MyHC, e do seu miRNA, o miR-208b. O miR-208a também regula o gene Myh7b e seu miRNA, miR-499; a diferença entre os genes Myh7 e Myh7b é que o primeiro é ativado em resposta a um sinais estressores ou hipotireoidismo enquanto o segundo, é expresso sem a necessidade de estímulos precedentes.

Os MyomiRs regulam a expressão dos genes da MyHC de forma indireta, ou seja, através de uma variedade de repressores transcricionais. Sox6 e Pur β estão entre os repressores transcricionais que atuam inibindo a expressão de genes que codificam as fibras de contração lenta e que já foram validados experimentalmente^{93,94}. Outro fator transcricional já validado é o Thrap1; esse fator atua na sinalização dos hormônios da tireoide e é expresso em quadros de hipotireodismo, modulando a expressão de β -MyHC no tecido cardíaco⁹⁵. A figura 4 esquematiza a rede MyomiR e seus componentes na regulação da expressão dos genes da MyHC.

Através de estudos com ratos mutantes para os genes dos MyomiRs foi possível chegar a algumas conclusões sobre o papel desses miRNAs no coração. A primeira delas é a de que esta rede atua somente no coração de animais adultos e não esta presente na fase de desenvolvimento fetal do coração, uma vez que os genes Myh7 e Myh7b foram expressos normalmente no coração de ratos neonatos e Knockout para o miR-208a (miR-208a^{-/-}) ao passo que, nos corações adultos, esses mesmos genes foram silenciados devido à deleção do miR-208a⁹².

A segunda conclusão é a de que nenhum desses MyomiRs são essenciais para a funcionamento do coração adulto. Assim, sua função primordial parece estar relacionada à adaptação da expressão dos genes que codificam as proteínas contráteis frente a estímulos fisiológicos e patológicos, sendo importantes para a manutenção da homeostase cardíaca⁹².

Desta forma, muitos estudos vem sendo conduzidos até hoje para avaliar a participação dos componentes da rede MyomiR frente a diferentes cardiopatias.

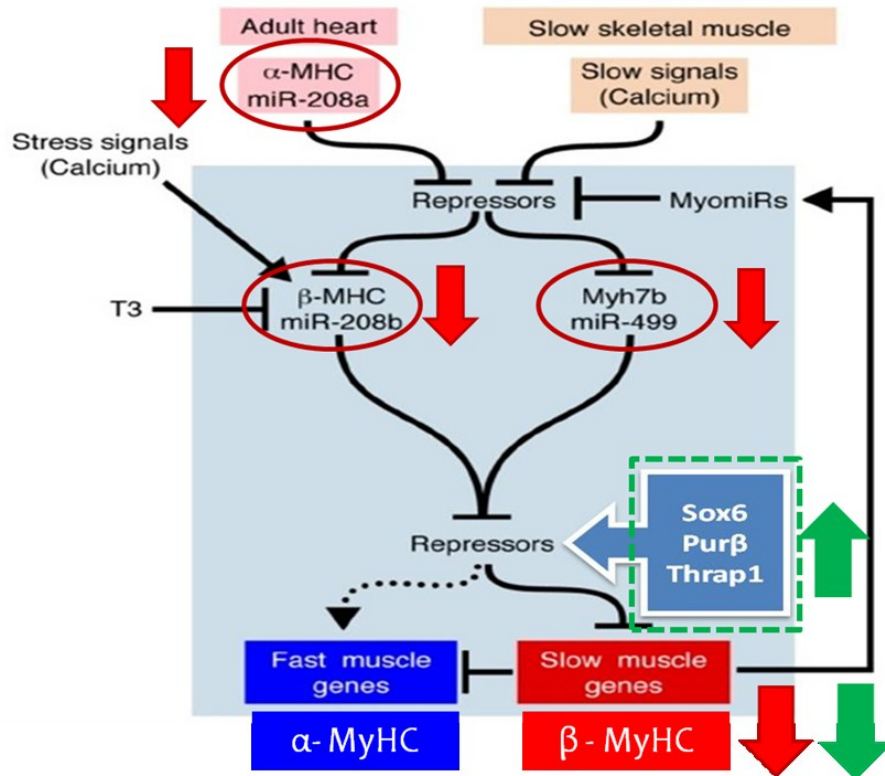


Figura 4. Esquema representativo da rede MyomiR para o controle da expressão das isoformas da MyHC. Segundo este modelo, no coração adulto o miR-208a é codificado a partir do gene relacionado com a expressão da isoforma α -MyHC e é necessário para inibir fatores transcricionais que reprimem os genes responsáveis pela expressão de β -MHC. O gene relacionado a expressão da β -MyHC pode se apresentar nas isoformas Myh7 e Myh7b que codificam os miR-208b e miR-499, respectivamente. Tanto o miR-208b quanto o miR-499 controlam os fatores transcricionais Sox6, Pur β e Thrap1 que, por sua vez, regulam a expressão da isoforma β -MyHC. A presença de fatores estressantes colaboram para que o próprio miR-208a favoreça a transição para a isoforma β -MyHC. Dentro da caixa em azul existem interações regulatórias que seriam comuns tanto para o músculo cardíaco quanto o esquelético (Modificado de van Rooij et al, *Dev Cell*. 2009; 17(5): 662–673).

1.9. Paroxetina e as GRK2 na sinalização adrenérgica.

Sabe-se que a desregulação da sinalização β -adrenérgica é uma característica bem estabelecida em várias doenças cardiovasculares, sendo as GRK2 as principais moléculas envolvidas na regulação para baixo dos receptores β -adrenérgicos (β -AR), consequência da superestimulação simpática⁹⁶.

As GRKs são proteínas que fosforilam os receptores acoplados a proteína G (GPCR) ativados o que culmina em uma dessensibilização, internalização e consequente diminuição desses receptores com o intuito de controlar sua superestimulação⁹⁷. Assim, em patologias cardíacas que causam uma superestimulação simpática, os β -AR são continuamente ativados pelas catecolaminas (CAs) circulantes o que culmina com uma grande produção das GRK2. Essas kinases fosforilam os β -AR, impedido-os de dar continuidade na via de sinalização intracelular, e recrutam as β -arrestinas que, por sua vez, internalizam e degradam os β -AR⁹⁸. Como as GRK2 causam uma ruptura na via de sinalização β -adrenérgica, o aumento da sua produção foi considerado ruim para o sistema cardiovascular, tornando-se um novo alvo terapêutico⁹⁹.

Além da atuação sobre os β -AR, as GRK2 também atuam sobre receptores α 2-adrenérgicos (α 2-AR) localizados na medula da glândula adrenal¹⁰⁰⁻¹⁰². Os α 2-AR são autoreceptores presinápticos inibitórios que controlam a liberação de epinefrina pelas células cromafins da medula da adrenal. A medula da adrenal e os terminais dos neurônios simpáticos são as principais fontes de CAs do corpo¹⁰³. As GRK2 também fosforilam os receptores α 2-AR presentes na medula da adrenal impedindo o mecanismo regulatório para diminuição da liberação de CAs. Assim, ocorre uma elevação crônica das CAs circulantes que por sua vez, contribuem com a dessensibilização e internalização dos β -AR^{102,104} dando origem a um ciclo vicioso de diminuição dos α 2-AR e β -AR e aumento das CAs.

Elucidando o caráter prejudicial das GRK2 para o coração, estudos utilizando bioengenharia e terapia gênica demonstraram que o β -ARKct, um peptídeo desenvolvido para bloquear a translocação e ativação das GRK2, se mostrou eficaz em preservar a função e remodelamento cardíacos após infarto do miocárdio em modelo suíno⁹⁶. Em adição, estudos utilizando animais knockout para o gene da GRK2 mostraram que estes animais, após infarto do miocárdio, apresentaram maior sobrevida e melhora na função contrátil do coração, preservação da geometria do ventrículo esquerdo e diminuição na expressão de genes relacionados à

hipertrofia patogênica como ANP, BNP e β -MHC¹⁰⁵. E mais recentemente, foi demonstrado que o uso de antagonistas β -adrenérgicos (β -bloqueadores) diminuem os níveis de GRK2 ocasionando benefícios para quadros de IC^{9,106}.

Tahl e colaboradores demonstraram, através de análises de cristalografia de proteínas, a interação da molécula da parox com as GRK2¹⁰⁷. Para averiguar a interação física da molécula da parox com as GRK2 foi feita uma co-cristalização da molécula da parox e do complexo GRK2 e a subunidade G $\beta\gamma$ da proteína G, demonstrando que a molécula da parox se liga ao sitio ativo das GRK2 sobrepondo-se ao sitio de ligação do ATP nessa molécula, conferindo a ela uma conformação diferente da sua configuração ativa, o que inibe sua função¹⁰⁷. Para testar a relevância fisiológica da parox sobre as GRK2 foram feitas injeções intravenosas de parox (10mg/kg) em camundongos o que produziu um aumento imediato no índice de contractilidade (dp/dt) do ventrículo esquerdo desses animais além de amplificar a resposta à administração de isoproterenol. Em adição a esses resultados, o trabalho de Schumacher e colaboradores demonstrou que o tratamento com a parox foi capaz de melhorar parâmetros de função e remodelamento do ventrículo esquerdo de ratos com infarto do miocárdio e diminuir os níveis de CAs circulantes bem como a expressão de genes relacionados à hipertrofia cardíaca através da inibição das GRK2¹⁰⁸. Desta forma, o estudo da ação da parox no sistema cardiovascular merece especial atenção uma vez que pode auxiliar no tratamento de pacientes com doenças cardiovasculares e uma de suas co-morbidades, a depressão.

1.10. Estudo *in vitro*: H9c2 e paroxetina

Com o intuito de entender melhor os mecanismos intrínsecos das células cardíacas isoladamente, ou seja, eliminando a influência de outros tipos celulares como as células endoteliais e os fibroblastos, os estudos *in vitro* tem sido alvo de grande interesse¹⁰⁹. Além disso, os estudos com células cardíacas isoladas tem sido amplamente aceito como um complemento dos estudos *in vivo* e em alguns casos, como o de estudos de cardiotoxicidade, a substituição dos animais pela cultura celular é muito bem aceita¹¹⁰.

A cultura de células é o processo pelo qual a proliferação de células animais ou vegetais é mantida após seu isolamento de tecidos vivos^{111,112}. Esse processo só é possível se todos os nutrientes e condições para a sobrevivência e crescimento das células forem fornecidos

corretamente. Para tanto, é necessário a manutenção de condições controladas de temperatura, umidade, oferta de oxigênio e gás carbônico. A cultura de células permite o estudo de um via metabólica sem a influência de associações de efeitos fisiológicos sobre as células, auxiliando no isolamento dos constituintes de uma via.

Cada tipo de célula possui um potencial proliferativo diferente e a maioria das células entram em senescência e morrem após um certo número de divisões celulares^{111,112}. No entanto, algumas células sofrem mutações, frequentemente associadas a tumorigenicidade, tornando-se contínuas^{111,112}.

A imortalização das células, também conhecida como transformação, possibilitou a formação de linhagens celulares contínuas de fácil manuseio e manutenção porém suscetíveis a alterações genéticas. As facilidades e vantagens de se trabalhar com linhagens contínuas possibilitou o advento de estudos com vários tipos celulares diferentes. Contudo, o estabelecimento de uma linhagem contínua para células cardíacas foi de grande dificuldade uma vez que cardiomiócitos isolados não proliferam e tumores cardíacos são muito raros. Ao realizar passagens seriadas seletivas de um subclone da linhagem original derivada de tecido cardíaco embrionário de ratos BDIX, Kimes e Brandt obtiveram sucesso na imortalização de células cardíacas originando a linhagem celular H9c2¹¹³. Apesar de ter perdido a propriedade de contração e de apresentarem algumas propriedades comuns aos músculos cardíaco e esquelético, as células da linhagem H9c2 possuem capacidade proliferativa igual à de células cardíacas já diferenciadas¹¹³⁻¹¹⁵ além de similaridades com células de cultura primária de cardiomiócitos. Por esses motivos, a linhagem H9c2 vem sendo amplamente utilizada para investigar os mecanismos moleculares e celulares envolvidos nos processos de hipertrofia, apoptose, diferenciação e toxicologia^{114,116,117}.

No que se refere aos efeitos da parox *in vitro*, muitos estudos foram realizados com cultura de células tronco neurais, modelo muito utilizado para o estudo da ação de antidepressivos na neurogênese¹¹⁸. Nessas células, a parox promove um aumento da capacidade de proliferação e diferenciação em neurônios através do aumento da expressão do brain-derived neurotrophic factor (BDNF) e de uma proteína anti-apoptótica, o Bcl-2¹¹⁹. Agonistas do receptor α 1-adrenérgico, como a fenilefrina, favorecem hipertrofia de células cardíacas e induzem a expressão de genes relacionados à hipertrofia patológica como a α -actina esquelética e a β -MyHC^{120,121}. Em adição, estudos com cultura de células cardíacas mostraram que a fenilefrina se

mostrou um indutor de hipertrofia mais potente do que a angiotensina II¹²². Poucos trabalhos investigaram a atuação da parox em cultura de células cardíacas. Portanto, entender se a parox alteraria algum marcador de hipertrofia na linhagem H9c2 desafiadas por fenilefrina poderia elucidar parte dos mecanismos da parox nos efeitos de preservação da fração de encurtamento vista nos estudos *in vivo*.

2. HIPÓTESE

Levando em consideração as informações levantadas, nós hipotetizamos que a preservação da fração de encurtamento do coração de ratos com RA tratados com paroxetina possa advir da influência indireta, mediada por aumento dos níveis de OT circulante, ou direta sobre o coração. Assim, investigamos a intervenção do tratamento com paroxetina sobre mecanismos moleculares que participam da hipertrofia cardíaca como: a expressão gênica dos receptores de OT, dos peptídeos natriuréticos ANP e BNP, dos componentes da rede MyomiR e das GRK2 na via de sinalização adrenérgica *in vivo* e *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Estudar os mecanismos moleculares envolvidos na preservação da fração de encurtamento do coração de ratos com RA tratados com paroxetina.

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Estudo *in vivo*:

No ventrículo esquerdo de ratos com RA subcrônica tratados com paroxetina durante 4 semanas foi avaliada a expressão gênica de:

- 1- Receptor de ocitocina (Oxtr)
- 2- ANP e BNP
- 3- Marcador de hipertrofia: α -actina esquelética
- 4- Isoformas da cadeia pesada da miosina: Myh6 e Myh7
- 5- microRNAs: -208a , -208b, -499
- 6- Fatores transcripcionais: Sox6, PurB e Thrap1
- 7- Kinase acoplada a proteína G (GRK2)

A expressão proteica das isoformas da cadeia pesada da miosina (α - e β -MyHC) também foi avaliada em amostras do VE de ratos com RA tratados com paroxetina por 4 semanas.

3.2.2. Estudo *in vitro*:

Na linhagem celular H9c2 exposta ao agonista alfa-adrenérgico, fenilefrina, por 24 horas e tratadas com paroxetina, foi avaliado a expressão gênica de:

- 1- ANP e BNP
- 2- Marcador de hipertrofia: α -actina esquelética
- 3- Isoformas da cadeia pesada da miosina: Myh6 e Myh7

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

O estudo foi realizado utilizando-se ratos Wistar machos fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12-12 h). Os animais tiveram à disposição ração padrão e água de torneira filtrada. Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (454-CEUA).

4.2. Indução da Regurgitação Aórtica

O modelo de regurgitação aórtica (RA) foi realizado através de uma modificação da técnica Arsenault e colaboradores¹²³. Inicialmente, sob anestesia com cloridrato de cetamina (200mg/kg, Dopalen®, Vetbrands) associada a cloridrato de xilazina (100mg/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 só foi finalizado quando não houve mais resistência às perfurações^{124,125}. 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 regurgitação aórtica (RA) foram confirmadas por ecocardiograma, ao final de uma semana após a indução da mesma.

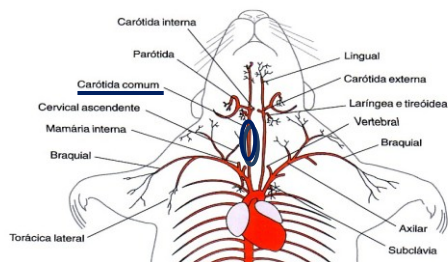


Figura 5. Ilustração do local de dissecação da carótida comum direita e introdução do cateter e fio guia (elipse em azul). Figura modificada do livro: *“Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação”*, UNIFESP, departamento de Psicobiologia, 2004.

4.3. 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 multifreqüencial (7,5 a 12 MHz), seguindo-se a padronização descrita na literatura¹²⁶. Os exames de ecocardiograma foram realizados na 1^a, 4^a e 8^a semana após a indução de RA, no sentido de acompanhar a progressão da RA. Estes exames foram realizados por uma médica experiente na análise das imagens e colaboradora do nosso laboratório.

Animais controles ou com RA foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/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 para-esternal 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. 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. Tal estudo 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 câmaras¹²⁶.

O critério para inclusão dos animais nos grupos foi a presença de fluxo regurgitante \geq 50% na via de saída do ventrículo esquerdo, visto pelo fluxo halodiastólico¹²⁶.

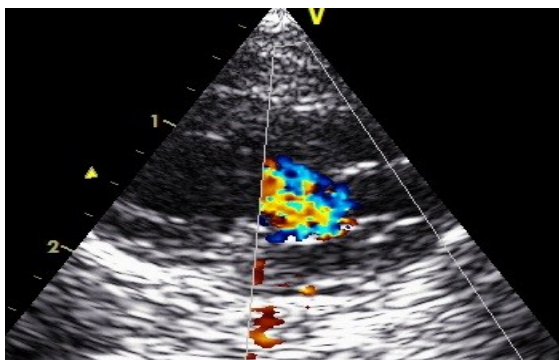


Figura 6. Fluxo sanguíneo na via de saída do ventrículo esquerdo de um dos animais confirmando a presença da regurgitação aórtica. Imagem coletada durante o exame de Doppler Ecocardiograma

4.4. Administração do antidepressivo

Cloridrato de paroxetina hemihidratado (parox, revendedora PharmaNostra, Rio de Janeiro) foi dissolvida em salina estéril, também usada como veículo, imediatamente antes do uso na dose de 10 mg/kg e foi injetada subcutaneamente a cada três dias. O estudo foi dividido entre 4 grupos experimentais: RA+Parox, RA+Salina, Cont+Parox e Controle+Salina.

4.5. Coleta do tecido cardíaco e perfusão transcardíaca

Terminado o tratamento, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (50-75 mg/rato) e perfundidos transcardiacamente com salina gelada em tampão fosfato 0,1 M (PBS - pH = 7,4, ~ 250 ml), para limpeza do coração. Em seguida, o coração foi retirado as câmaras cardíacas isoladas e pesadas e uma porção (50 a 100mg) do ventrículo esquerdo coletada para as análises moleculares.



Figura 7. Fotos representativas dos procedimentos realizados para coleta do tecido. Perfusão transcardíaca com solução de tampão fosfato (esquerda), retirada do coração (centro) e coleta de uma porção do ventrículo esquerdo (direita).

4.6. Avaliação quantitativa da expressão gênica por RT-qPCR (mRNA)

4.6.1. Extração de RNA com TRIzol (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific)

No momento da extração de RNA, as amostras de ventrículo esquerdo, previamente congeladas em nitrogênio líquido, foram homogeneizadas com homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) em 1 mL de TRIzol (quantidade utilizada para cada 50-100 mg de tecido). Para a retirada do material insolúvel resultante da homogeneização, as amostras foram submetidas à centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de 1,5 mL e incubado durante cinco minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. Após esse período, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio, para cada 1mL de TRIzol utilizado, possibilitando a separação dos componentes da reação em três fases: fase aquosa, interfase e fase orgânica. Após a adição do clorofórmio, os tubos foram homogeneizados vigorosamente e incubados, desta vez, por três minutos a temperatura ambiente.

Para a precipitação do RNA, presente na fase aquosa, o material foi centrifugado a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o RNA foi precipitado através da incubação com 0,5 mL de isopropanol (para cada 1mL de TRIzol utilizado inicialmente) por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 12000 xg por 10 minutos a 4°C. O sedimento (pellet) formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (para cada 1mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7500 xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e, após a retirada do excesso de líquido do fundo do tubo, o pellet foi submetido à secagem durante cerca de 5 minutos à temperatura ambiente. O RNA total foi dissolvido em água ultra pura livre de RNAase (Gibco®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e armazenado a -80°C.

O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o aparelho GE NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Health Care Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) que se baseia na densidade óptica para o comprimento de onda 260 nm (OD – 260) específica para ácidos nucleicos. A razão entre as densidades ópticas para o comprimento de onda 260 e 280 nm (OD 260/280) esta relacionada à quantidade de ácidos nucleicos e proteínas, respectivamente, fornecendo um parâmetro de contaminação da amostra por proteínas. A densidade óptica para o

comprimento de onda 230nm (OD – 230) também foi analisada e sua razão OD 260/230 esta relacionada à presença de resquícios do processo de extração na amostra, como alcoóis e fenóis. Tanto as proteínas quanto os alcoóis e fenóis são contaminantes que interferem nas análises finais da expressão gênica. Essas medidas fornecem uma estimativa do grau de pureza da amostra e conseqüentemente, da qualidade da extração. As amostras utilizadas obtiveram valor ≥ 1.8 para ambas as razões, indicativo de um RNA livre de contaminantes.

4.6.2. Gel analítico de agarose para verificação da integridade do RNA

A integridade do RNA foi avaliada pela presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, após eletroforese de 5 μ L de RNA em gel de agarose a 1%, não denaturante, corado com *SYBR[®] Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen[®], Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) . O gel foi fotografado sob luz ultravioleta para visualização das bandas.

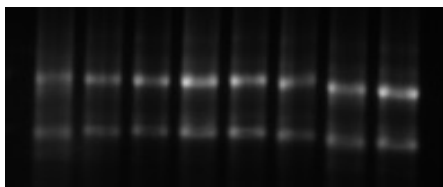


Figura 8. Foto das bandas 28S e 18S de amostras representativas dos 4 grupos experimentais obtidas através do gel analítico de agarose.

4.6.3. Eletroforese Capilar para confirmação da integridade do RNA (Agilent 2100 Bioanalyser)

Para confirmação dos resultados obtidos na eletroforese em gel de agarose foi realizada a eletroforese capilar utilizando o aparelho Agilent 2100 Bioanalyser (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Nesta técnica as amostras de RNA são separadas por eletroforese em um micro chip e as bandas 5S, 18S e 28S dos RNAs ribossomais são detectadas por fluorescência.

A integridade do RNA é dada pela razão entre as bandas 28S e 18S (28S/18S), razões baixas são indicativas de degradação do RNA bem como baixos picos de fluorescência para as bandas 28S e 18S quando analisadas no eletroferograma. Um dos parâmetros desenvolvidos e utilizados pela Agilent para avaliar a integridade das amostras é o RNA Integrity Number (RIN) que leva em consideração a forma da curva de fluorescência emitida pelas bandas de RNA ribossomal (28S e 18S) no eletroferograma. O algoritmo desenvolvido pela Agilent permite a classificação das amostras em uma escala de 1 a 10, sendo que as amostras mais degradadas se aproximam do valor 1 e as mais integras do valor 10. As amostras selecionadas para continuar nos experimentos possuíam um $RIN \geq 7$, valor indicativo de um RNA inteiro para o tipo de tecido estudado.

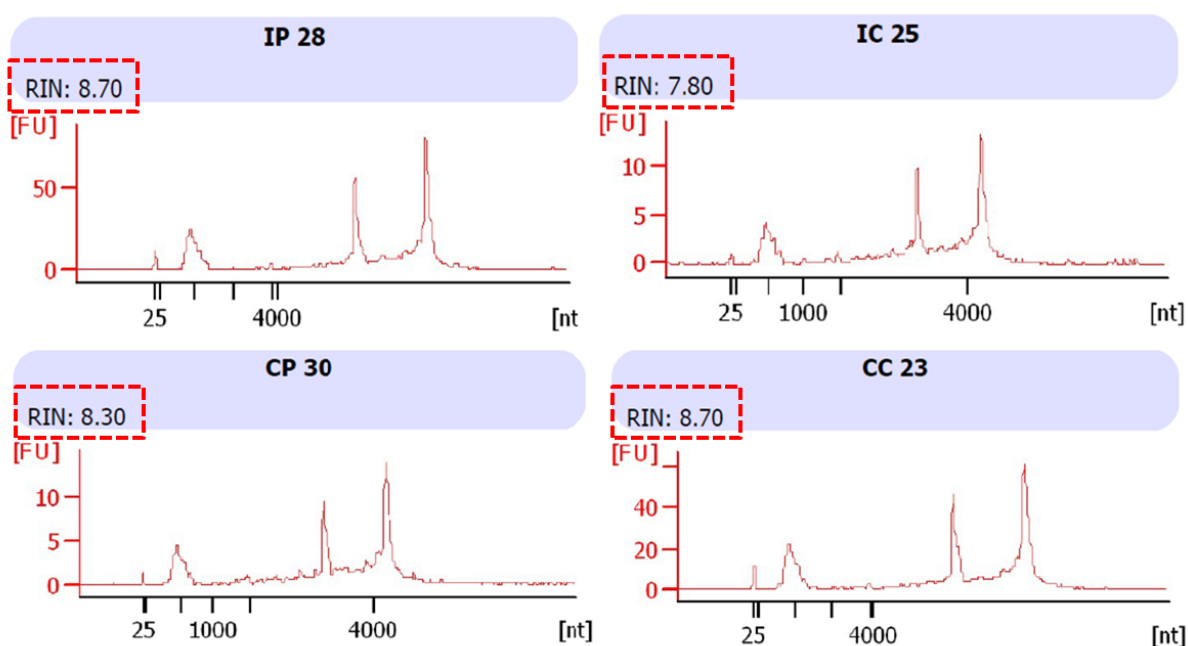


Figura 9. Eletroferograma das amostras de RNA de animais representantes dos 4 grupos experimentais e score do RIN - RNA Integrity Number (destacado em vermelho) obtidos no aparelho Agilent 2100 Bioanalyser.

4.6.4. Tratamento do RNA com DNase

O tratamento com DNase garante a eliminação de possíveis contaminantes como DNA genômico e cátions divalentes que podem catalisar a degradação do RNA. Conforme as instruções do protocolo TURBO DNA-free™ Kit (Ambion®, Life Technologies Corporation,

Carlsbad, CA, EUA), 2 µg do RNA total destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para um microtubo estéril, onde foi acrescentado 2 µL de tampão de DNase (10X), 1 µL de TURBO DNase (2 unidades/µl) e água ultra pura na quantidade suficiente para completar 20 µL de solução. Essa solução foi incubada a 37°C por 30 minutos em termociclador. Em seguida, a essa solução foi adicionado 1 µL de DNase Inactivation Reagent, incubado por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugado a 10 000 x g por 1,5 minutos para a total inativação da enzima TURBO DNase. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo tubo e armazenado em freezer -80°C.

4.6.5. Reação de Transcrição Reversa (RT)

A Taq-Polimerase, enzima responsável pela reação de PCR, utiliza como molde o DNA para a amplificação do gene de interesse, por isso é necessário fazer a retro-transcrição do RNA para um DNA complementar à sua sequência. A reação de Transcrição Reversa (RT) foi realizada utilizando-se o *High Capacity RNA-to-cDNA kit* (Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), em que 2 µg do RNA total tratado com TURBO DNase foram acrescidos de 10 µl de tampão de transcriptase reversa (2X RT buffer), 1 µL de enzima transcriptase reversa (20X RT Enzyme Mix) e o volume final da reação ajustado para 20 µL com água ultrapura livre de RNase. Cada amostra foi incubada a 37°C por 60 minutos, 95°C por 5 minutos e 4°C até o final da reação. Os produtos da reação de RT foram armazenados a -20°C e utilizados nas reações de PCR.

4.6.6. Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)

A PCR em Tempo Real foi realizada com o Go-Taq® q-PCR Master Mix (Promega Corporation, Fitchburg, WI, EUA) utilizando-se 3 µL do produto da RT, 10µL de GoTaq® qPCR Master Mix (2X), primers “sense” e “anti-sense” (nas concentrações ótimas previamente testadas) e água ultra pura livre de RNase suficiente para um volume final de 20 µL de solução.

Os primers para os genes analisados (Tabela 1) foram desenhados através dos softwares Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) a partir de seqüências publicadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/), e sintetizados pela Integrate DNA Technologies. As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, no Sistema Quanstudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA). As condições de termociclagem da reação de *qPCR* foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento. A quantificação relativa foi realizada através do método do Cq (ciclo de quantificação) comparativo e os valores obtidos foram normalizados pelos valores obtidos para os genes constitutivos ARBP e PPIB. A escolha dos genes constitutivos para normalização dos resultados foi feita após a análise de um array contendo 16 genes constitutivos (Taqman Low-Density Array TLDA, Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) dentre os quais os genes ARBP e PPIB se mostraram mais estáveis para nossas amostras.

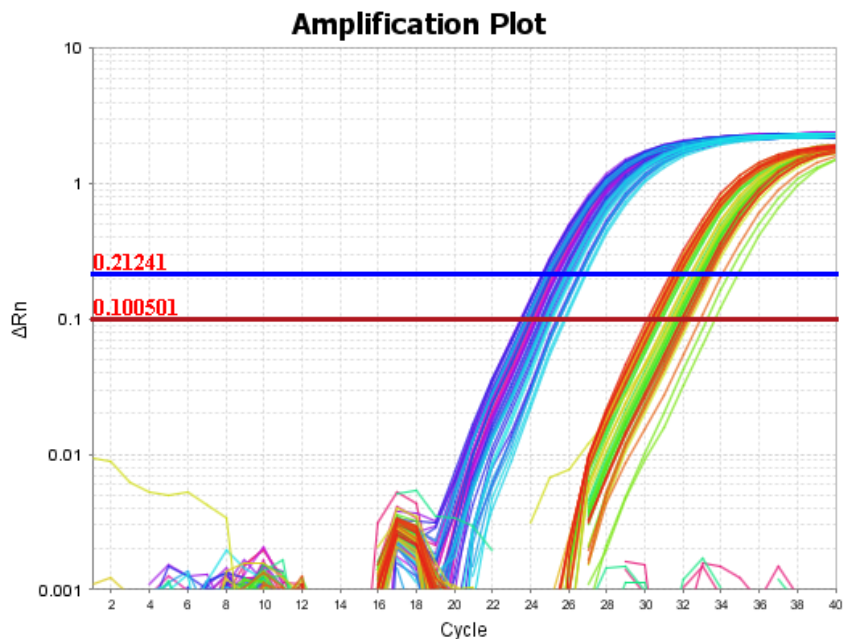


Figura 10. Imagem obtida no Sistema Quanstudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), representando as curvas de amplificação para os miR-208b e -499, respectivamente.

Tabela 1: Genes analisados pela reação de RT-qPCR.

<i>Nome do gene</i>	<i>Símbolo do gene</i>	<i>Número de Acesso</i>	<i>Sequência dos primers forward(F) e reverse(R)</i>
<i>Myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha</i>	<i>MYH6</i> (α -MyHC)	<i>NM_002471</i>	<i>F: TCCGCAAGGTGCAGCACGAG</i> <i>R: ATCGTGCATTTTCTGCTTGGCG</i>
<i>Myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta</i>	<i>MYH7</i> (β -MyHC)	<i>NM_000257</i>	<i>F: GGCAGAGGAGAGGGCGGACA</i> <i>R: ACTCTTCATTACAGGCCCTTGGCG</i>
<i>Natriuretic peptide A</i>	<i>NPPA</i> (ANP)	<i>NM_006172</i>	<i>F: CTCTTCCTGGCCTTTTGGCT</i> <i>R: GCAGGTTCTTGAAATCCATCAGA</i>
<i>Natriuretic peptide B</i>	<i>NPPB</i> (BNP)	<i>NM_002521</i>	<i>F: TGGGCAGAAGATAGACCGGA</i> <i>R: AAAACAACCTCAGCCCGTA</i>
<i>Actin, alpha 1, skeletal muscle</i>	<i>Acta1</i> (α -sk-act)	<i>NM_019212</i>	<i>F: CGAGGTATCCTGACCCTGAA</i> <i>R: TGTCGTCCCAGTTGGTGATA</i>
<i>Oxytocin receptor</i>	<i>Oxtr</i>	<i>NM_000916</i>	<i>F: TCTGCTGCTCTGCTCGTTAC</i> <i>R: TGCTGAAGATGGCTGAGAGC</i>
<i>SRY (sex determining region Y)-box 6</i>	<i>Sox6</i>	<i>NM_001024751.1</i>	<i>F: AACCAACGGCAGCAAATGGAC</i> <i>R: TCCTGCCAAAACGGTCACTT</i>
<i>purine rich element binding protein B</i>	<i>PurB</i>	<i>NM_001017503.1</i>	<i>F: GGGGTTTTCAAGGATCGCCT</i> <i>R: CGCCCTCTCAGCCACAAATA</i>
<i>Mediator complex subunit 13</i>	<i>Med13</i> (<i>Thrap1</i>)	<i>NM_001107035</i>	<i>F: GCCAAGCAAAATGATGCGAG</i> <i>R: TGTTGCCATGTGAGAGGACC</i>
<i>Adrenergic, beta, receptor kinase 1</i>	<i>Adrbk1</i> (<i>Grk2</i>)	<i>NM_012776.1</i>	<i>F: GCTCTTCAAGTTGTTGCGGG</i> <i>R: GCAGCTCAACAGCCATTGTC</i>

Nº Acesso: número de acesso às sequências publicadas no GenBank

Tabela 2: Genes endógenos usados como calibradores para quantificação relativa dos mRNAs.

<i>Nome do gene</i>	<i>Símbolo do gene</i>	<i>Número de Acesso</i>	<i>Sequência dos primers forward(F) e reverse(R)</i>
<i>Ribosomal protein, large, P0</i>	<i>Rplp0</i> (<i>Arbp</i>)	<i>NM_131580</i>	<i>F: CCTGCACACTCGCTTCCTAGAG</i> <i>R: CAACAGTCGGGTAGCCAATCTG</i>
<i>Peptidylprolyl isomerase B</i>	<i>Ppib</i>	<i>NM_022536.2</i>	<i>F: CAAGACCTCCTGGCTAGACG</i> <i>R: CCGTACCACATCCATGCCTT</i>

Nº Acesso: número de acesso às sequências publicadas no GenBank

4.6.7. Teste de eficiência dos primers

A eficiência de todos os primers foi calculada com o software LinRegPCR v11.0 (<http://LinRegPCR.nl>) que emprega dados de fluorescência resultados do monitoramento da reação de PCR utilizando o sistema SYBR Green, agentes intercalantes de DNA. O software determina a eficiência de cada amostra construindo um gráfico de regressão linear com dados obtidos durante a fase exponencial de amplificação da reação de PCR, que depende, dentre outros fatores, do correto pareamento e especificidade dos primers a sequência do gene alvo¹²⁷. O primer ideal, com 100% de eficiência, produz a cada ciclo da PCR o dobro do produto gerado no ciclo anterior. Todos os primers testados obtiveram valores de eficiência iguais ou maiores que 90%.

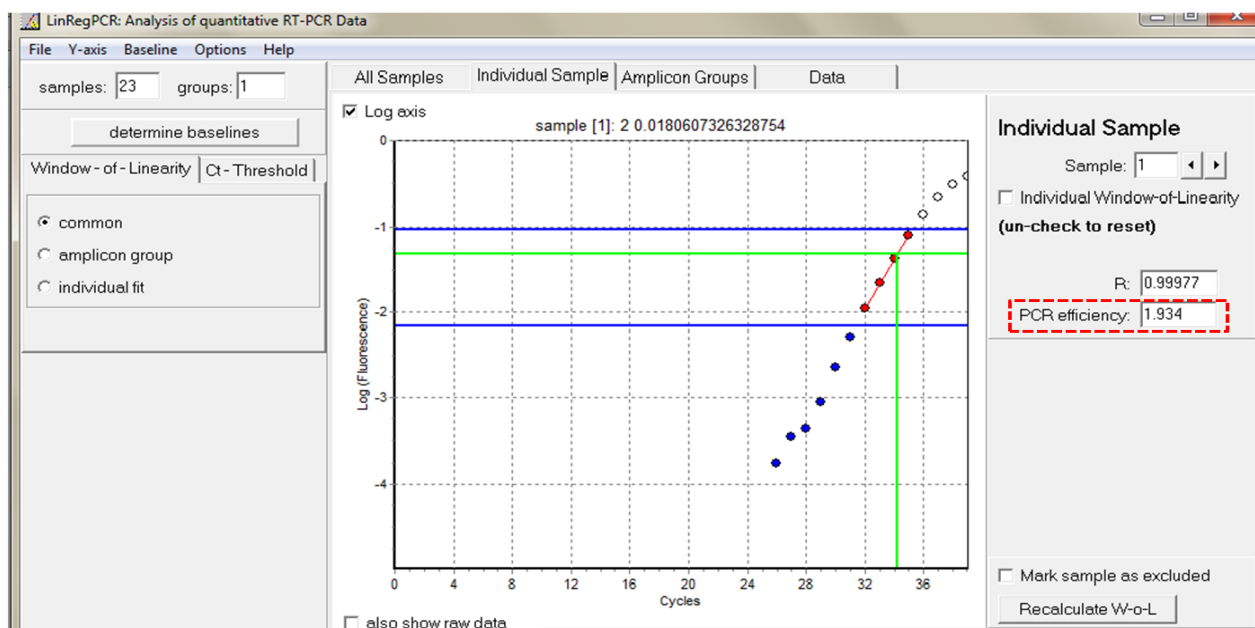


Figura 11: Curva de regressão linear construída pelo software LinRegPCR para a análise da eficiência do primer desenhado para o gene Sox6. Valor da eficiência destacado pelo retângulo vermelho pontilhado (direita).

4.7. Avaliação quantitativa da expressão gênica por RT-qPCR (microRNA)

4.7.1. Transcrição Reversa:

A transcrição reversa do microRNA (Tabela 3) foi realizada utilizando o kit TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as orientações do fabricante. Esse sistema permite a transcrição reversa apenas de microRNAs maduros e não é afetado pela contaminação com DNA genômico. Para a reação foram utilizados 3 µL (2ng) de RNA total ao qual foram adicionados os seguintes componentes do kit: Megaplex[™] RT Primers (10X), dNTPs with dTTP (100 mM), MultiScribe[™] Reverse Transcriptase (50 U/µL), 10X RT Buffer, RNase Inhibitor (20 U/µL) e o volume completado para 4,5 µL com água livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 40 ciclos de 16 °C por 2 min., 42 °C por 1 min. e 50 °C por 1 segundo seguido, da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min. Os demais procedimentos foram idênticos aos descritos para a avaliação da expressão gênica de mRNA.

Tabela 3: microRNAs analisados pela reação de RT-qPCR.

<i>MiRNA</i>	<i>miRNA ID (miRBase)</i>	<i>Número de Acesso</i>	<i>Sequência do miR maduro</i>
<i>miR-208a</i>	<i>hsa-mir-208a-3p</i>	<i>MI0000251</i>	<i>AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU</i>
<i>miR-208b</i>	<i>hsa-mir-208b-3p</i>	<i>MI0005570</i>	<i>AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU</i>
<i>miR-499</i>	<i>rno-mir-499-5p</i>	<i>MI0004676</i>	<i>UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU</i>

Nº Acesso: número de acesso às sequências publicadas no miRBase

Tabela 4: Genes endógenos utilizados como calibradores para quantificação relativa dos microRNAs

<i>Gene endógeno</i>	<i>Símbolo do gene</i>	<i>Número de acesso</i>	<i>Sequência</i>
<i>U6</i>	<i>RNU6-1</i>	<i>NR_004394</i>	<i>GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAACGATACAG AGAAGATTAGCATGGCCCCTGCGCAAGGATGACACGCAAATTC GTGAAGCGTTCATATTT</i>
<i>Y1</i>	<i>Y1 scRNA</i>	<i>U84683</i>	<i>TGAGTTATCTCAATTGATTGTTACAGTCAGTTACAGATTGAACT CCTGTTCTACACTTCCCCCTTCTCACT</i>

Nº Acesso: número de acesso às sequências publicadas no GenBank

4.8. Avaliação quantitativa da expressão proteica por Western Blot

Amostras do ventrículo esquerdo previamente congeladas a -80°C foram homogeneizadas em Polytron com 0,5 mL de tampão de lise RIPA (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) e coquetel de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. A concentração proteica do sobrenadante foi determinada por Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Após a quantificação as amostras foram tratadas com tampão Laemmli (50ul de β ME e 950ul de Laemmli; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) na proporção 1:1. Quantias iguais de proteína total (70ug) foram separadas por SDS-PAGE (Amersham ECL™ Gel 8 -16%, GE Heath Care Life Science, Piscataway, NJ, EUA) e as proteínas separadas transferidas para membranas de nitrocelulose Hybond ECL, 0.45um (Amersham™, GE Health Care Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em TBS-Tween (Tris Buffered Saline + Tween) por 1 hora e então, incubadas overnight a 4°C com anticorpo primário apropriado de acordo com as especificações do fabricante (Tabela 5).

Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com horseradich peroxidase (HRP) e o sistema de detecção quimioluminescente ECL (Amersham™, GE Health Care Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) foram utilizados para visualização das bandas. A quantificação das bandas foi feita por densitometria utilizando o software Image J versão 1.49j

(<http://imagej.nih.gov/ij>). Os valores obtidos foram normalizados pelos valores obtidos para a proteína GAPDH.

Tabela 5: Relação dos anticorpos primários do Western Blot.

<i>Proteína e diluição</i>	<i>Anticorpo Primário</i>	<i>Código do Catálogo</i>	<i>Fabricante</i>
β -MyHC (1:4000)	Monoclonal Anti-Myosin (Skeletal, Slow)	M8421	Sigma-Aldrich, EUA
α -MyHC (1:4000)	Anti-heavy chain cardiac Myosin antibody (BA-G5)	ab50967	Abcam, EUA.
β -actina (1:1000)	β -actin (R-22)	sc -130657	Santa Cruz Biotechnology, EUA.



Figura 12: marcação das isoformas da miosina e proteína endógena (β -actina) em amostras de ventrículo esquerdo.

4.9. Cultura celular

Utilizamos a linhagem celular H9c2, subclone da linhagem original de B. Kimes e B. Brandt, derivadas do tecido cardíaco de embriões de ratos BD1X, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ, Rio de Janeiro, RJ). As células foram cultivadas em garrafas com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) + 10% soro fetal bovino (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) + 1% de antibiótico (Penicillin-streptomycin solution stabilized, Gibco®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) até atingirem uma confluência de 80%. Ao atingirem essa confluência (período de 5 a 7 dias), foi feita a tripsinização e contagem das células.

Para formar o grupo de estudo, utilizamos 2 placas de 6 poços com 1×10^5 células plaqueadas em cada poço formando 4 grupos experimentais (2 grupos por placa): Fenil+Parox; Fenil+DMEM; Cont+Parox e Cont+DMEM; o restante das células foi transferido para uma garrafa e expandido para posterior congelamento.

As células dos grupos de estudo foram cultivadas com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) + 10% soro fetal bovino (SFB, Gibco®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) + 1% de antibiótico (Penicillin-streptomycin solution stabilized, Gibco®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) até atingirem uma confluência de 80% e então iniciamos os tratamentos. As células foram desafiadas com um indutor de hipertrofia, a fenilefrina, na concentração de 1×10^{-6} uM, durante 24h, e em seguida foram tratadas com a paroxetina na concentração de 3×10^{-6} uM, durante mais 24h. Ao final do tratamento o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS (Phosphate buffered saline, pH 7,4) e foi adicionado 2ml de Trizol (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) em cada poço. As células com trizol foram transferidas para tubos de 1.5ml e congeladas em freezer -80°C até o momento da extração. A concentração das drogas foi determinada de acordo com a literatura. Foi feita uma solução estoque na concentração de 1×10^{-3} uM para fenilefrina e a paroxetina, a partir dessas soluções diluímos as drogas nas concentrações preestabelecidas para cada uma, em 2 ml de meio de cultura (DMEM) e adicionamos aos poços nos dias do tratamento.

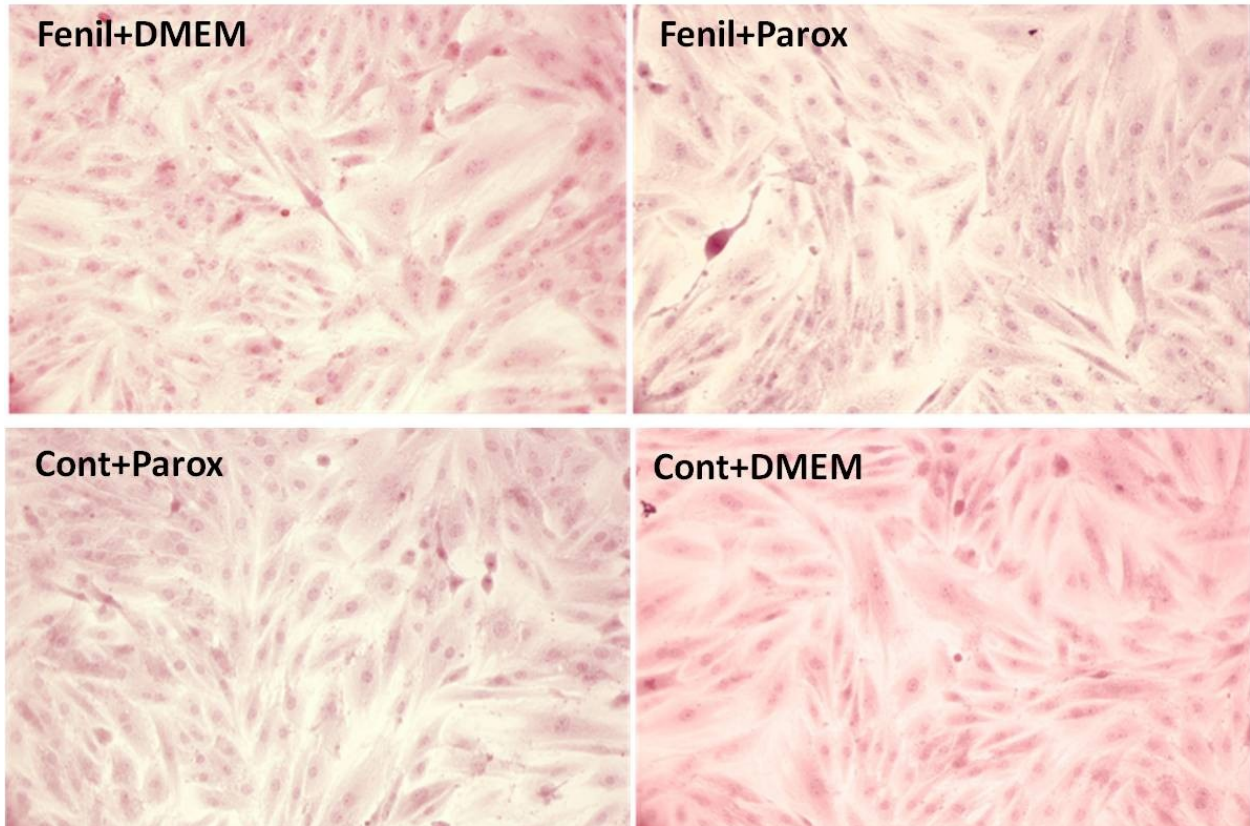


Figura 13: Fotos obtidas em microscópio invertido, no aumento de 20x, das células H9c2 coradas com hematoxilina e eosina (HE) ao final do protocolo experimental.

4.10. Análise estatística

A comparação dos dados entre os grupos experimentais para os exames de ecocardiografia foi realizada utilizando-se ANOVA duas vias, sendo diferença de 5% considerada estatisticamente significativa. Os valores de expressão dos genes foram feitos a partir do método de quantificação relativa, $\Delta\Delta Ct$ ¹²⁸. Todas as quantificações relativas foram avaliadas pelo teste de aleatorização com permutações (algoritmo utilizado pelo software REST 2009 v2.0.13)¹²⁹, com a eficiência da reação de PCR calculada pelo software LinRegPCR v11.1¹²⁷ que utiliza a regressão linear da curva de fluorescência emitida durante a fase exponencial para os cálculos. A quantificação relativa da expressão gênica foi posteriormente comparada entre os grupos pelo teste estatístico ANOVA duas vias para medidas repetidas, com nível de significância $p \leq 0,05$ e pós-teste Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos.

5. RESULTADOS

5.1. 1 Análise morfométrica dos parâmetros cardiovasculares 4^a semana (Ecocardiograma)

Na 4^a semana após a indução da Regurgitação Aórtica (RA) os animais apresentaram aumentos significativos do DDVE, índice de esfericidade, débito cardíaco e átrio esquerdo comparado aos animais controle. Cabe ressaltar que os grupos RA + Parox e RA + Salina eram semelhantes entre si, bem como os grupos Contr + Parox e Contr + Salina (tabela 3). O que é importante para demonstrar que os grupos estavam em condições parecidas antes do início do tratamento com parox (figura 14).

Tabela 6. Variáveis morfofuncionais dos grupos estudados na 4^a semana após a indução da RA, antes do início do tratamento com parox.

Variáveis Morfofuncionais (4 semanas)	RA +Parox n=8	RA+Salina n=6	Cont+Parox n=8	Cont+Salina n=8
DDVE (mm)	8,18 ± 0,17*	8,34 ± 0,43*	6,7 ± 0,19	6,86 ± 0,09
Fração de encurtamento(%)	44,13 ± 5,74*	46,5 ± 1,65*	53,67 ± 1,79	47,67 ± 3,41
Índice de esfericidade	0,83 ± 0,02*	0,84 ± 0,03*	0,68 ± 0,02	0,64 ± 0,02
Débito Cardíaco (ml/min)	169,54 ± 40,75*	179,51 ± 17,16*	110,75 ± 12,15	86,12 ± 10,4
AE/Ao	1.54 ± 0.01*	1.35 ± 0.17*	1.23 ± 0.05	1.04 ± 0.02
Peso Corporal (g)	384,1 ± 9,5	366,2 ± 17,2	390,1 ± 12,4	398,1 ± 12,4

DDVE = diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (mm); fração de encurtamento % = $\frac{DDVE - \text{diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo}}{DDVE} \times 100$; índice de esfericidade = $\frac{\text{comprimento do eixo menor}}{\text{comprimento do eixo maior do ventrículo esquerdo}}$; DC = débito cardíaco (ml/min); AE/Ao = átrio esquerdo normalizado pela aorta; e peso corporal (g). ANOVA duas vias foi usada para comparação entre os grupos.* diferente de Controle; $p < 0,001$.

5.1.2 Análise morfométrica dos parâmetros cardiovasculares 8ª semana (Ecocardiograma)

Na 8ª semana os animais com RA apresentam aumentos significativos do DDVE, índice de esfericidade, débito cardíaco, átrio esquerdo e do peso do coração comparado aos animais controle. Após 4 semanas do tratamento com parox, ocorreu uma melhora da função cardíaca do grupo RA + Parox em relação ao grupo RA + Salina. Podemos observar que a fração de encurtamento dos RA + Parox foi preservada, sendo semelhante ao grupo controle (figura 14).

Tabela 7. Variáveis morfofuncionais dos grupos estudados na 8ª semana após a indução da RA, após o tratamento com parox.

Variáveis morfofuncionais (8 semanas)	RA+Parox n=8	RA+Salina n=6	Cont+Parox n=8	Cont+Salina n=8
DDVE (mm)	9,06±0,26*	9,15±0,58*	7,35±0,14	7,18±0,28
Fração de encurtamento(%)	45,67±1,52*†	31,97±3,08*	48,44±1,84	52,25±1,84
Índice de Esfericidade	0,85±0,02*	0,87±0,04*	0,70±0,01	0,66±0,01
Débito Cardíaco(ml/min)	186,69±24,22*	173,16±19,43*	122,96±9,86	90,82±13,43
AE/Ao	1,5±0,09*	1,52±0,05*	1,2±0,04	1,12±0,01
Peso Corporal (g)	438,62±9,65	406,83±20,58	433±16,87	431,62±13,20
Peso do coração/100g peso corpóreo	0,44±0,02*	0,45±0,03*	0,34±0,008	0,41±0,03

DDVE = diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (mm); fração de encurtamento % = $\frac{\text{DDVE} - \text{diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo}}{\text{DDVE}} \times 100$; índice de esfericidade = $\frac{\text{comprimento do eixo menor}}{\text{comprimento do eixo maior do ventrículo esquerdo}}$; DC = débito cardíaco (ml/min); AE/Ao = átrio esquerdo normalizado pela aorta; peso do coração normalizado para cada 100g de peso corpóreo; e peso corporal (g). ANOVA duas vias foi usada para comparação entre os grupos. * diferente de Cont; $p < 0,001$; † diferente de RA+Salina; $p < 0,001$.

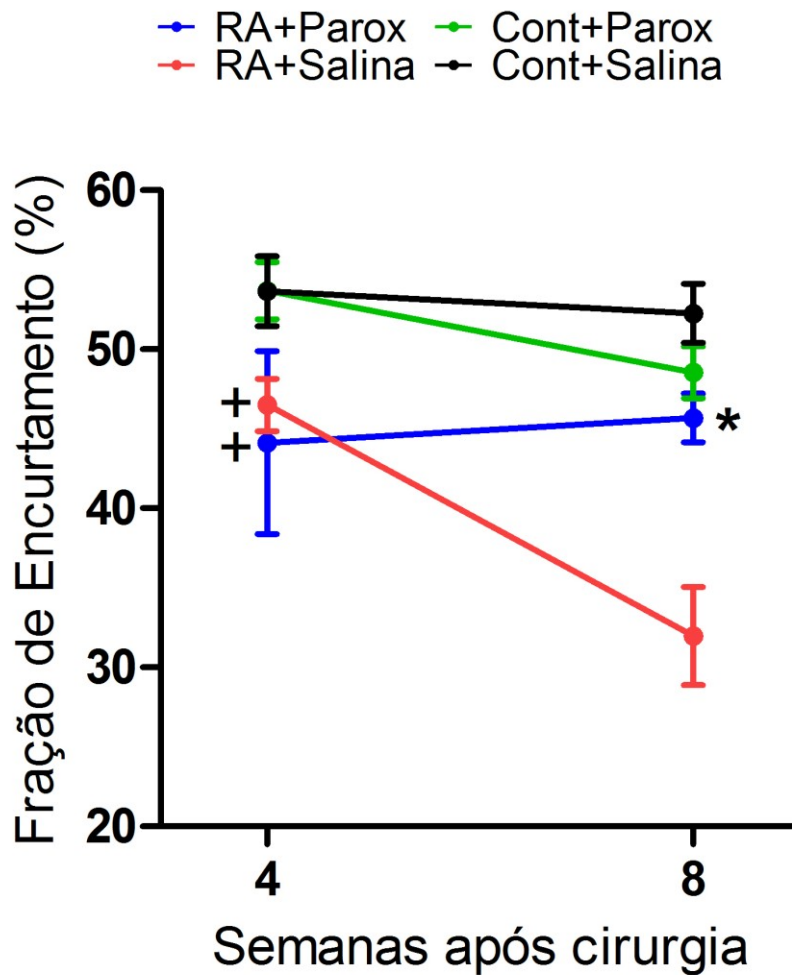


Figura 14. Fração de encurtamento, na 4^a e 8^a semana, variável obtida por meio de ecocardiografia com Doppler colorido e cursor em Modo-M para os grupos estudados. Fração de encurtamento (%) = $[(DDVE - DSVE)/DDVE] \times 100$. DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo. ANOVA duas vias foi usada para comparação entre os grupos. + $p < 0,001$ vs Cont; * $p < 0,001$ vs RA+Salina.

5.2. Análise da Expressão Gênica: estudo *in vivo*

5.2.1. Quantificação relativa da expressão do gene: α -Actina Esquelética

A quantificação relativa da expressão gênica da α -Actina Esquelética foi aumentada nos animais com RA quando comparados aos animais dos grupos controle, $p < 0,05$.

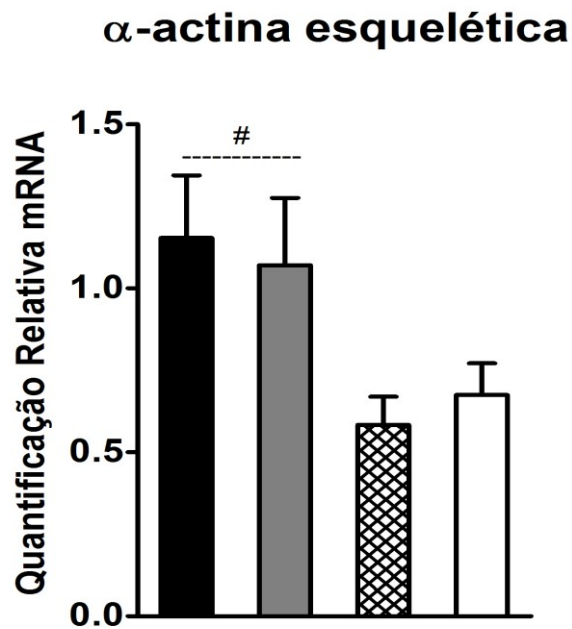


Figura 15. Quantificação relativa da expressão dos genes α -Actina Esquelética. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias foi aplicada para comparações entre os grupos utilizando a cirurgia e o tratamento como fatores. Student-Newman-Keuls foi utilizado como pós-teste. # $p < 0,05$ vs Cont.

5.2.2. Quantificação relativa da expressão dos genes: ANP, BNP e Oxtr

A quantificação relativa da expressão gênica dos peptídeos natriuréticos, ANP e BNP, foram aumentadas nos animais com RA comparado ao grupo controle, $p < 0,05$ (figura 16A e B). O tratamento com parox foi eficaz em reduzir a expressão gênica do BNP nos grupos RA+Parox comparado ao grupo RA+Salina, $p = 0,02$, e no grupo Cont+Parox comparado ao grupo Cont+Salina, $p = 0,001$ (figura 16B). Já a quantificação relativa da expressão gênica do receptor de ocitocina (Oxtr) no ventrículo esquerdo, não foi alterada entre os grupos experimentais (figura 17C).

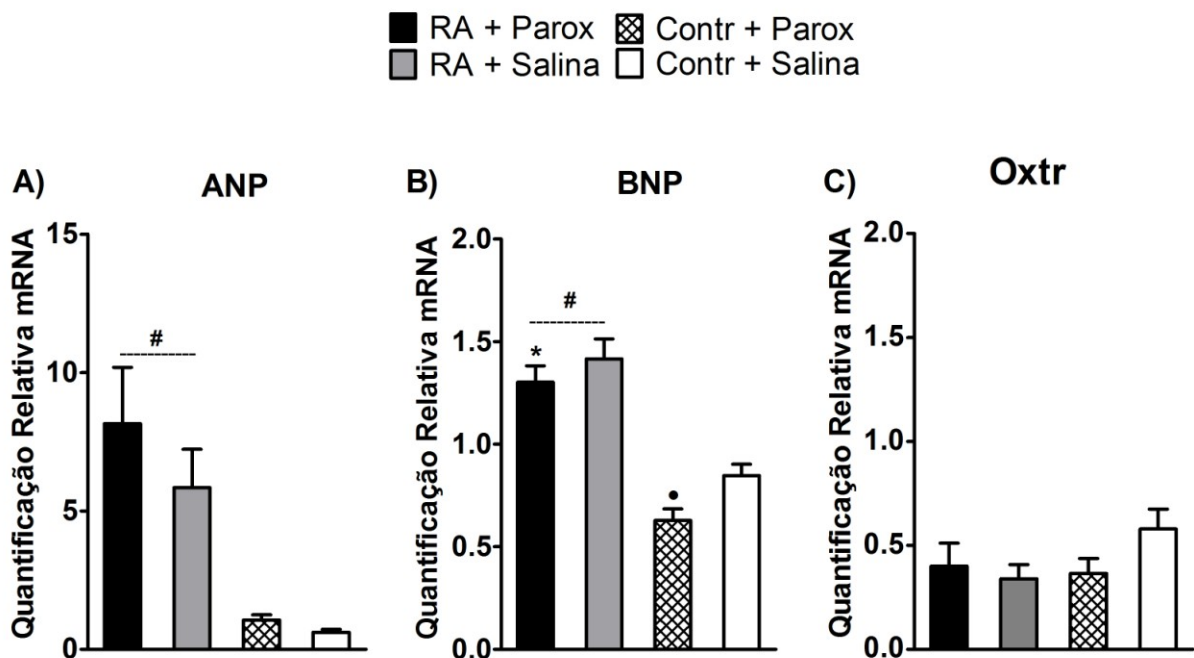


Figura 16. Quantificação relativa da expressão dos genes ANP, BNP e Oxtr. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias para medidas repetidas mostrou diferença significativa entre os grupos para a quantificação relativa dos genes ANP e BNP, $p < 0,001$, utilizando a cirurgia e o tratamento como fatores. Student-Newman-Keuls foi utilizado como pós-teste para comparação entre os grupos. * $p = 0,02$ vs RA + Salina; • $p < 0,001$ vs Cont + Salina; # $p < 0,05$ vs Cont.

5.2.3. Quantificação relativa da expressão dos genes: MyH6 e MyH7

A quantificação relativa da expressão do gene Myh6 foi diminuída nos grupos RA + Parox, RA + Salina e Cont + Parox em relação ao grupo Cont + Salina, $p \leq 0,05$ (figura 17A). Já a quantificação relativa da expressão do gene Myh7 foi aumentada nos animais com RA em comparação aos animais Cont, $p \leq 0,05$, e o tratamento com parox reduziu a expressão do gene Myh7 no grupo RA + Parox em relação ao grupo RA + Salina, $p \leq 0,05$ (figura 17B). Pela razão MyH6/MyH7 observamos o predomínio de Myh7 no animais com RA em relação ao grupo Contr, $p \leq 0,05$ (figura 17C). Cabe ressaltar que tais genes são os responsáveis pela codificação das isoformas α -MHC e β -MHC, respectivamente.

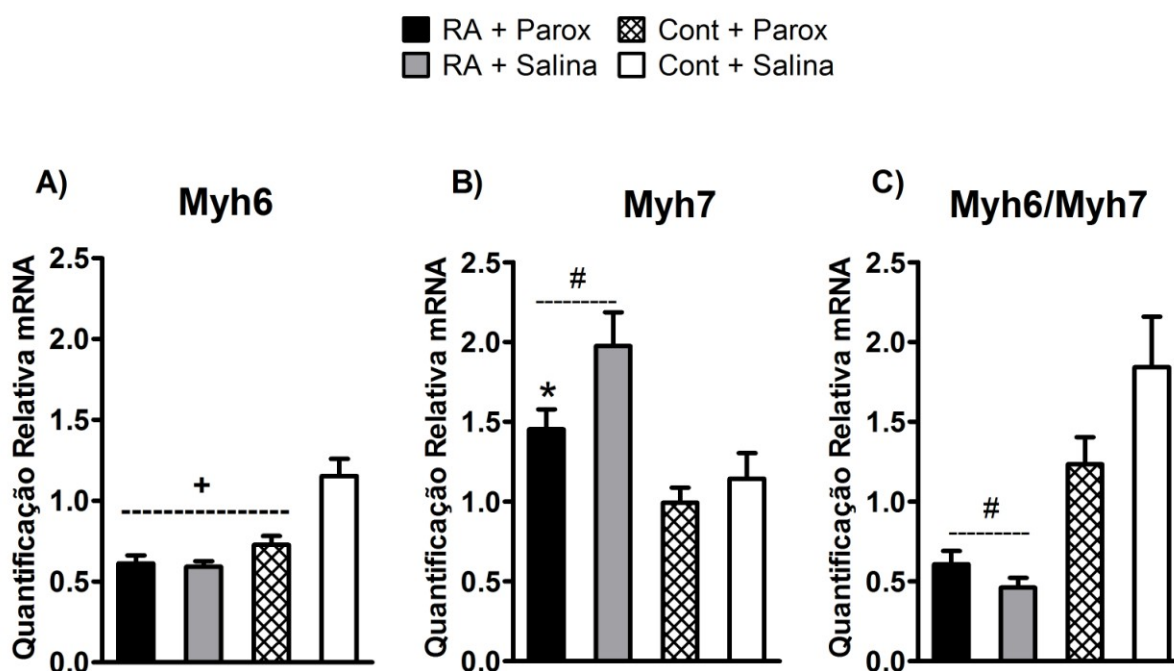


Figura 17. Quantificação relativa da expressão dos genes Myh6, Myh7 e razão Myh6/Myh7. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias para medidas repetidas mostrou diferença significativa entre os grupos, $p < 0,001$, utilizando a cirurgia e o tratamento como fatores. Student-Newman-Keuls foi utilizado como pós-teste para comparação entre os grupos.
* $p < 0,05$ vs RA + Salina; + $p < 0,05$ vs Cont + Salina; # $p < 0,05$ vs Cont.

5.2.4. Quantificação relativa da expressão dos genes: Sox6, Pur β e Thrap1

A quantificação relativa da expressão gênica dos fatores transcricionais Sox6, Pur β e Thrap1 não foi alterada entre os grupos experimentais (figura 18).

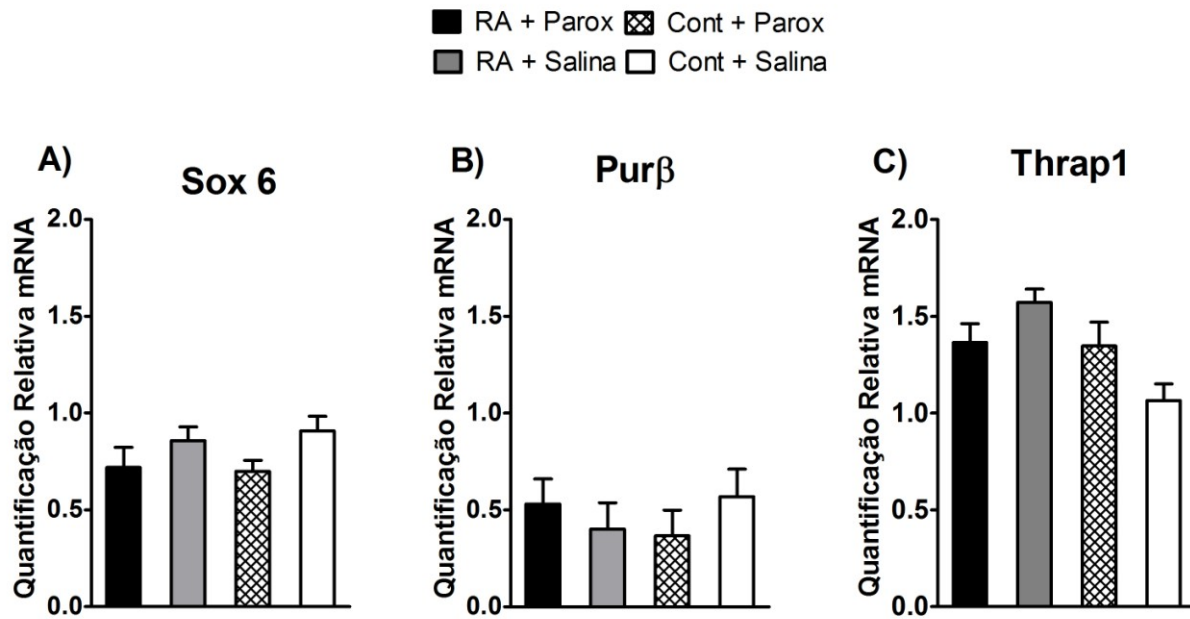


Figura 18. Quantificação relativa da expressão dos genes Sox6, Pur β e Thrap1. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias para medidas repetidas foi aplicada para comparações entre os grupos utilizando a cirurgia e o tratamento como fatores. Student-Newman-Keuls foi utilizado como pós-teste.

5.2.5. Quantificação relativa da expressão dos microRNAs: miR-208a, -208b e -499

A quantificação relativa da expressão do miR-208a, não foi alterada entre os grupos experimentais (Figura 19A) porém, a quantificação relativa da expressão dos miR-208b foi aumentada nos animais com RA em relação ao grupo Controle, $p \leq 0,05$ (figura 19B) e o tratamento com parox reduziu a expressão do miR-208b no grupo RA+Parox em comparação ao grupo RA+Salina, $p \leq 0,05$ (figura 19B). O tratamento com parox também foi capaz em reduzir a expressão do miR-499 no grupo RA+Parox em comparação ao grupo RA+Salina, $p \leq 0,05$ e Cont+Parox, $p \leq 0,05$ (figura 19C).

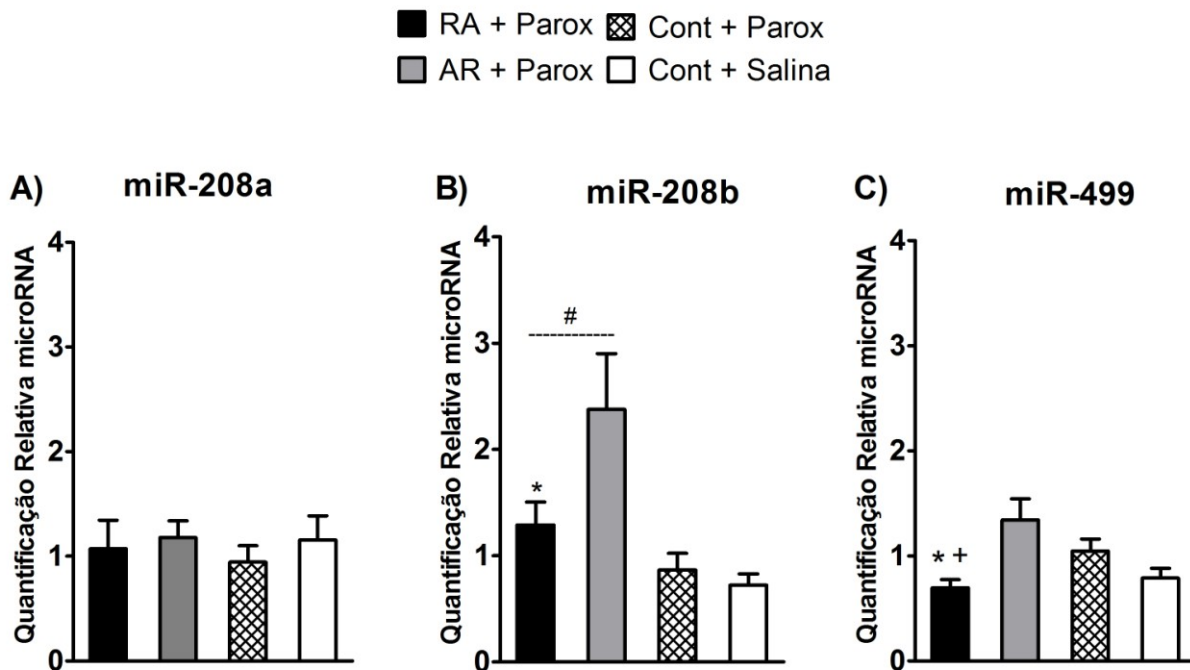


Figura 19. Quantificação relativa da expressão dos microRNA miR-208a, -208b e -499. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias para medidas repetidas foi aplicada para comparações entre os grupos utilizando a cirurgia e o tratamento como fatores. Student-Newman-Keuls foi utilizado como pós-teste. * $p \leq 0,05$ vs RA+Salina; # $p \leq 0,05$ vs controle; + $p \leq 0,05$ vs Cont+Parox.

5.2.8. Quantificação relativa da expressão do gene: GRK2

O tratamento com parox foi capaz de reduzir a expressão da GRK2 no grupo RA+Parox em comparação ao grupo RA+Salina, $p \leq 0,05$.

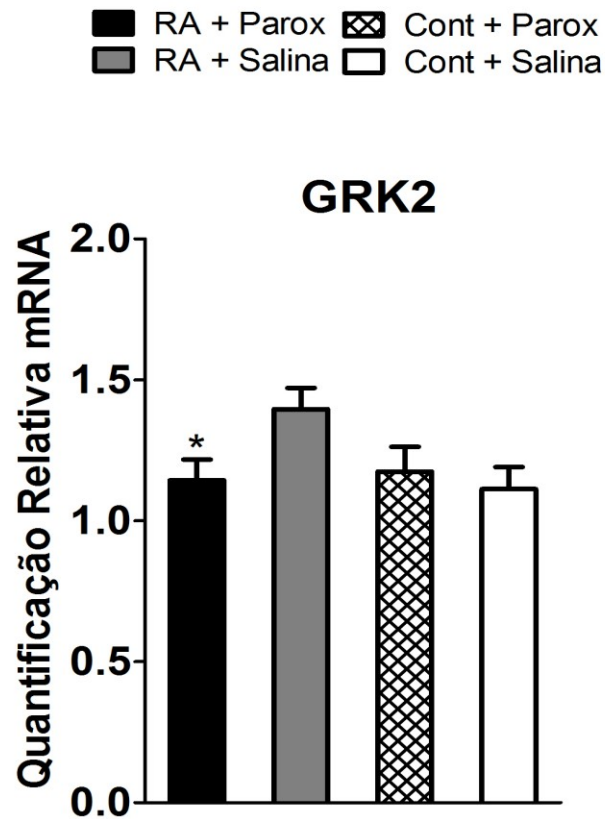


Figura 20. Quantificação relativa da expressão do gene da GRK2. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias para medidas repetidas foi aplicada para comparações entre os grupos utilizando a cirurgia e o tratamento como fatores. Student-Newman-Keuls foi utilizado como pós-teste. * $p \leq 0,05$ vs RA+Salina.

5.3. Análise da Expressão Proteica: estudo *in vivo*

5.3.1. Quantificação da expressão proteica da α -MyHC e β -MyHC

A quantificação proteica tanto da α -MyHC quanto da β -MyHC não foi alterada entre os grupos experimentais.

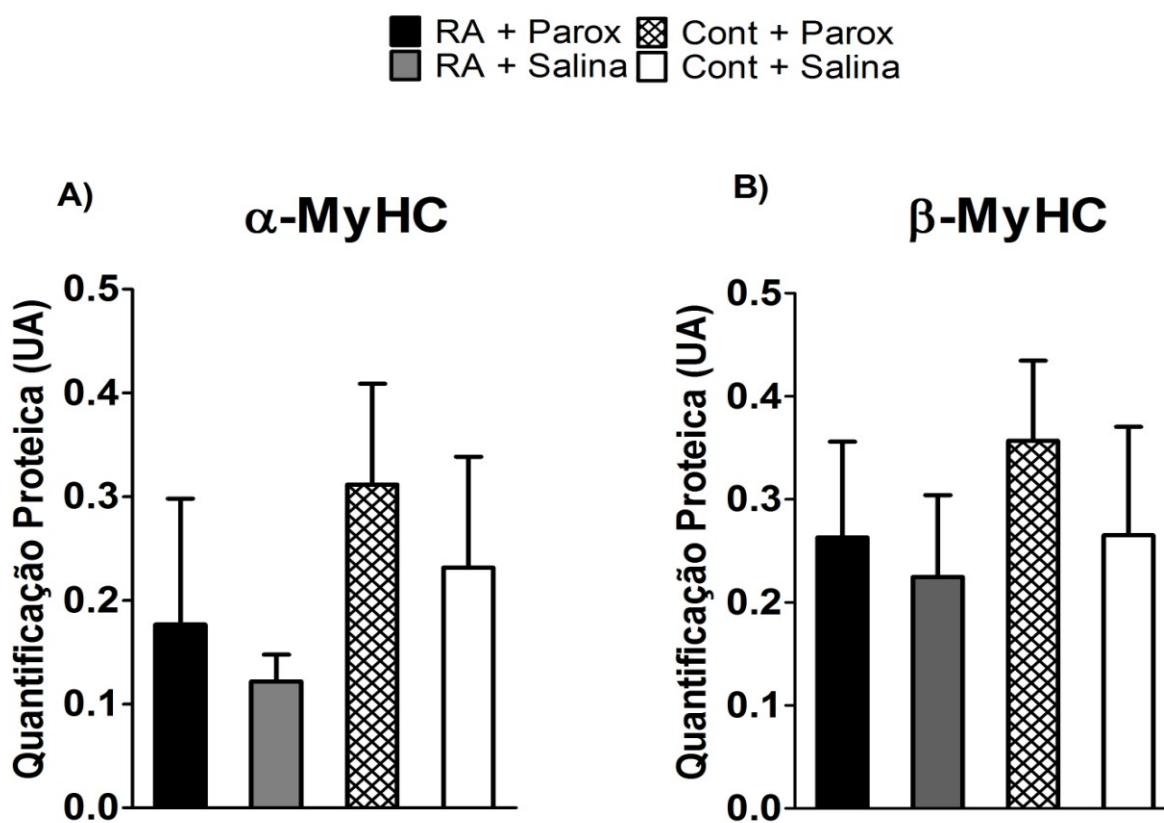


Figura 21. Quantificação da expressão proteica das isoformas α -MyHC e β -MyHC. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias para medidas repetidas foi aplicada para comparações entre os grupos utilizando a cirurgia e o tratamento como fatores. Student-Newman-Keuls foi utilizado como pós-teste.

5.4. Análise da expressão gênica: estudo *in vitro*

5.4.1. Quantificação da expressão gênica: Myh6 e Myh7

A quantificação relativa da expressão do gene MyH6 foi aumentada no grupo Cont + Parox em relação ao grupo Cont + DMEM, $p \leq 0,05$ e Fenil + DMEM, $p \leq 0,05$ (figura 22A). Já a quantificação relativa da expressão do gene Myh7 não foi alterada entre os grupos experimentais (figura 22B). Cabe ressaltar que apesar do aumento significativo para a quantificação do gene MyH6 no grupo Cont + Parox, a expressão desse gene foi muito tardia (tabelas 9 e 10) demonstrando uma expressão muito baixa nessa linhagem celular H9c2.

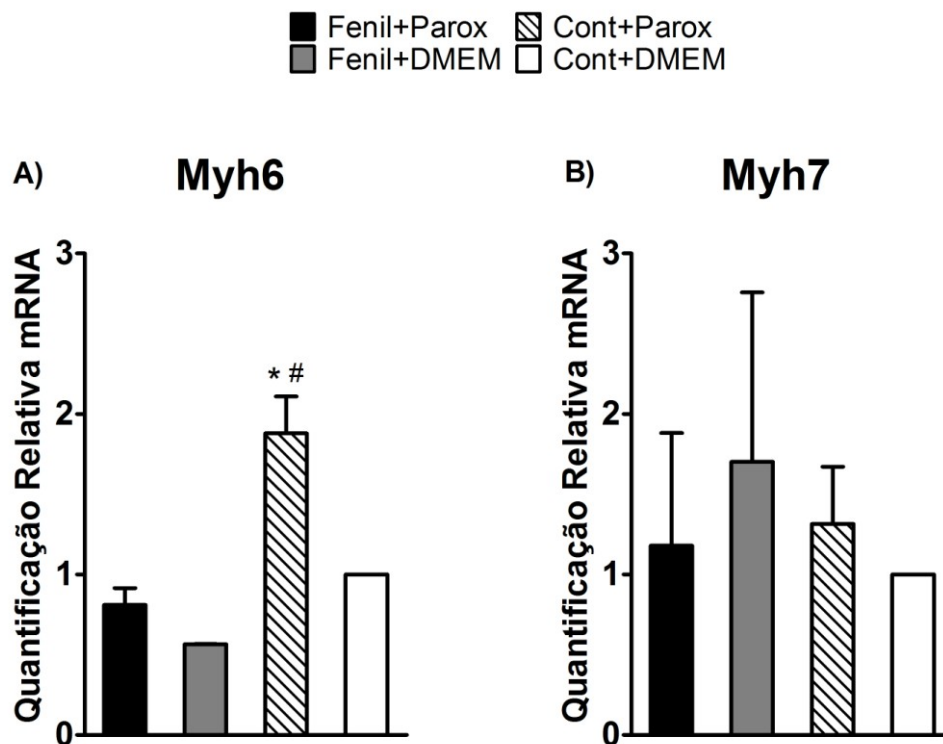


Figura 22. Quantificação relativa da expressão dos genes Myh6 e Myh7. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias para medidas repetidas foi aplicada para comparações entre os grupos utilizando os tratamentos com fenilefrina e paroxetina como fatores. Student-Newman-Keuls foi utilizado como pós-teste.* $p \leq 0,05$ vs Cont+DMEM; # $p \leq 0,05$ vs Fenil+DMEM.

5.4.2. Quantificação da expressão gênica: ANP e BNP

A quantificação relativa da expressão gênica dos peptídeos natriuréticos, ANP e BNP, não foi alterada entre os grupos experimentais (figura 23A e B).

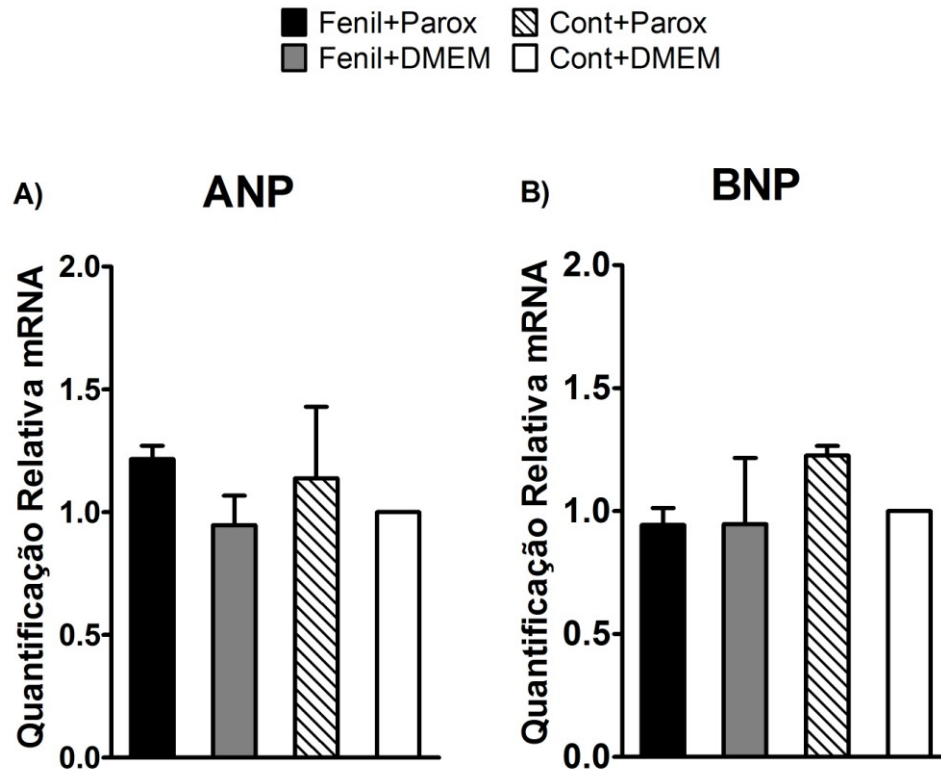


Figura 23. Quantificação relativa da expressão dos genes ANP e BNP. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias para medidas repetidas foi aplicada para comparações entre os grupos utilizando os tratamentos com fenilefrina e paroxetina como fatores. Student-Newman-Keuls foi utilizado como pós-teste.

5.4.3. Quantificação da expressão gênica: α -actina esquelética

A quantificação relativa da expressão gênica da α -actina esquelética não foi alterada entre os grupos experimentais (figura 24).

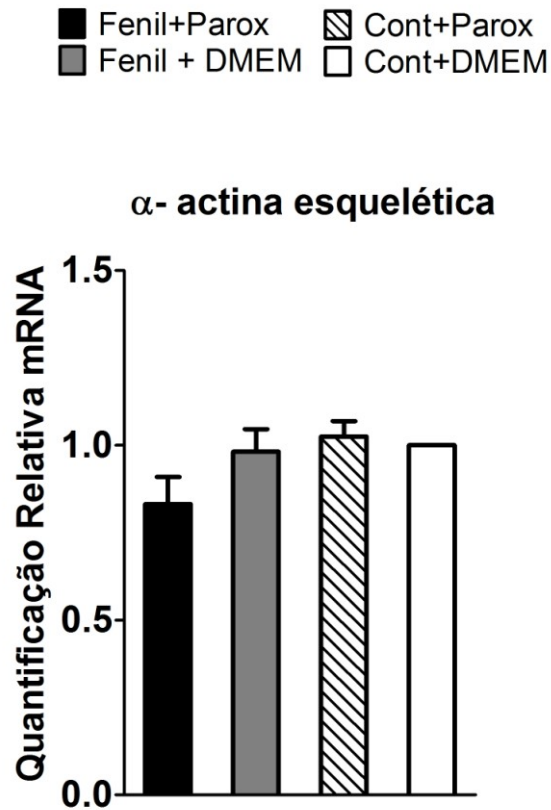


Figura 24. Quantificação relativa da expressão do gene α -actina esquelética. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias para medidas repetidas foi aplicada para comparações entre os grupos utilizando os tratamentos com fenilefrina e paroxetina como fatores. Student-Newman-Keuls foi utilizado como pós-teste.

5.4.4. Ciclos de amplificação (Cts) dos genes estudados *in vitro*

A amplificação dos ciclos da RT-PCR foi tardia para os genes ANP, BNP, Myh6 e Myh7 comparado a amplificação do gene endógeno (ARBP) e da α -actina esquelética tanto no primeiro experimento quanto em sua réplica biológica (experimento 2).

Tabela 8: Ciclos de amplificação dos genes ANP, BNP, Myh6, Myh7, α -actina esquelética e ARBP no primeiro experimento.

Tratamento	Cycle threshold (Ct) - Experimento 1					
	ANP	BNP	Myh6	Myh7	α -actina esquelética	ARBP
Fenil+Parox	33.6	30.1	35	32.8	18.2	16.9
Fenil+DMEM	34.8	31.3	36.4	33.2	18.7	17.8
Cont+Parox	34.6	31.1	36.2	33.3	19	18.4
Cont+DMEM	34.9	31.2	36	32.9	18.9	18.2

Tabela 9: Ciclos de amplificação dos genes ANP, BNP, Myh6, Myh7, α -actina esquelética e ARBP no segundo experimento

Tratamento	Cycle threshold (Ct) - Experimento 2					
	ANP	BNP	Myh6	Myh7	α -actina esquelética	ARBP
Fenil+Parox	35.2	35.2	36.5	36.9	19.4	20
Fenil+DMEM	35.2	34.8	36.8	36.4	19.3	20
Cont+Parox	37.1	35.6	35.6	38	20.2	21
Cont+DMEM	35.8	34.8	36.2	37.4	19.1	19.8

6. DISCUSSÃO

6.1. Estudo *in vivo*:

Os resultados mostraram que o modelo de RA utilizado neste estudo determinou aumento do débito cardíaco, do índice de esfericidade e do átrio esquerdo, evidenciando sobrecarga de volume e hipertrofia ao coração; além de diminuição da fração de encurtamento, mostrando diminuição da função sistólica. O tratamento com parox foi capaz de preservar a fração de encurtamento. A RA foi eficaz em produzir hipertrofia excêntrica tomando como base os parâmetros morfofuncionais analisados pelo ecocardiograma e também foi capaz de aumentar a expressão gênica de ANP, BNP e α -actina esquelética, sendo que o tratamento com parox foi capaz de reduzir a expressão de BNP. Em adição, a parox em ratos com RA diminuiu a expressão da isoforma β -MyHC, cuja velocidade de hidrólise do ATP é lenta. A diminuição da expressão da β -MyHC parece ser decorrente de diminuições na expressão do miR-208b e miR-499, fatores pós-transcricionais, sem alterar a expressão gênica de fatores transcricionais como o Sox6, Pur β e Thrap1. O tratamento com parox parece restabelecer a via de sinalização beta adrenérgica que esta relacionada a diminuição dos níveis de expressão das kinases acopladas aos receptores de proteínas G, as GRK2. Por outro lado, não parece que a alteração da expressão gênica para receptores de ocitocina seja alterada pela presença da RA ou pelo tratamento com parox nestas condições.

Os peptídeos natriuréticos ANP e BNP são reconhecidos por estarem aumentados em situações de hipertrofia cardíaca decorrente de doenças cardiovasculares¹³⁰, e são considerados marcadores de hipertrofia cardíaca. Nos nossos resultados tanto a expressão gênica do ANP quanto a do BNP foram aumentadas pela presença da sobrecarga de volume determinada pela RA, em concordância com a literatura¹³¹. O tratamento com parox não foi capaz de interferir com a expressão do ANP, mas foi capaz de reduzir a expressão do BNP em relação aos ratos com RA e que não receberam parox. É sabido que quanto maior os níveis plasmáticos de BNP pior o prognóstico da doença cardíaca⁵⁵. Embora não tenhamos dosado os níveis plasmáticos de BNP, a expressão reduzida deste fator no tecido cardíaco pode sugerir algum papel benéfico sobre o mecanismo de contratilidade do miocárdio.

A miosina é a principal molécula responsável pela transdução química e mecânica dos movimentos que dão origem ao processo de contração dos músculos estriados cardíaco e esquelético. Sua estrutura possui seis subunidades, duas cadeias pesadas (MyHCs) e quatro

cadeias leves (MLCs). Nas MyHCs encontramos os sítios de ação para a atividade ATPásica responsável pela hidrólise do ATP que confere energia à maquinaria contrátil⁷². A miosina cardíaca é expressa, principalmente, a partir dos genes Myh6 e Myh7 que codificam as cadeias pesadas alfa (α -MyHC) e beta (β -MyHC), respectivamente¹³².

A predominância de um tipo de fibra em detrimento de outro esta relacionada à espécie, à idade e exposição a estímulos fisiopatológicos¹³³. Condições fisiopatológicas, tanto alterações hemodinâmicas quanto hormonais, podem propiciar a reexpressão de β -MyHC o que é considerada uma modificação adaptativa com intuito de economizar energia, mas que em longo prazo se torna prejudicial⁹⁰. Nos resultados presentes a RA favoreceu a reexpressão do gene que codifica a isoforma β -MyHC, enquanto que o tratamento com parox reduziu esta reexpressão. Cabe ressaltar que na literatura tal reexpressão está relacionada à performance mecânica do coração¹³⁴⁻¹³⁶. Foi demonstrado *in vitro* que miócitos ventriculares de ratos aumentam a síntese de β -MyHC em situações patológicas que levam à falência do músculo cardíaco^{89,135}. Além disso, mutações no gene MyH7, que codifica β -MyHC, foram identificadas em cardiomiopatias hipertróficas familiares¹³⁷.

Em contrapartida, nos resultados presentes não observamos alterações na expressão proteica das isoformas α - e β -MyHC. Levando em consideração que há um caminho muito longo entre a expressão de um gene e a sua tradução em proteína. Muitos fatores pós-transcricionais, translacionais e pós-translacionais podem atuar regulando a taxa de síntese e degradação das proteínas, em resposta a vários estímulos, aumentando a variação entre os resultados da expressão gênica e proteica¹³⁸⁻¹⁴¹. Assim, nem sempre o que é observado na expressão gênica reflete-se na expressão proteica. Outra possibilidade é que a técnica de Western Blot pode não ser tão eficiente em detectar pequenas variações na quantidade de proteínas estruturais como é o caso da α - e β -MyHC. Diferente das proteínas regulatórias de vias intracelulares que estão ausentes ou presentes dependendo do estímulo, as proteínas estruturais estão sempre presentes e por se tratar de uma técnica semi-quantitativa, as variações, para mais ou para menos, na quantidade de proteínas estruturais tornam-se difíceis de serem detectadas e mais suscetíveis a erros durante as análises. Desta forma, acreditamos que o tratamento com parox elicia alterações gênicas benéficas ao coração que podem ajudar a explicar a preservação da fração de encurtamento vista em nossos resultados.

Entre os fatores que podem interferir com esta reexpressão encontramos em nível molecular alterações tanto transcricionais quanto pós-transcricionais. Com relação aos fatores transcricionais, ou seja, os necessários para a transcrição do gene, que podem agir favorecendo ou reprimindo esta transcrição, destacam-se para o controle da expressão da β -MyHC os fatores: Sox6, Pur β e Thrap-1^{142,143}. Nossos resultados não mostraram alterações na expressão desses 3 fatores para os ratos com RA tratados ou não com parox. Nós havíamos hipotetizado que eles poderiam estar aumentados, reprimindo a expressão da β -MyHC. Assim, podemos concluir que para nosso modelo e condições de tratamento outros fatores transcricionais devem interferir com a expressão da isoforma β -MyHC. Também testamos se a participação dos fatores pós-transcricionais, descritos na rede MyomiR, estariam alterados. Os miRs regulam negativamente a expressão gênica determinando degradação ou inibição da transcrição do mRNA¹⁴³. Entre os miRs que merecem destaque para o coração temos os miRs -208a, -208b e -499¹⁴²⁻¹⁴⁵ que são exclusivos do tecido cardíaco, por serem codificados a partir dos próprios genes da miosina regulando, desta forma, a transição entre as isoformas α - e β -MyHC^{79,145}. Nossos resultados mostraram que a expressão do miR-208a não foi alterada, enquanto a expressão do miR-208b e do miR-499 foi aumentada nos corações dos ratos com RA e o tratamento com parox foi eficaz em diminuir a expressão desses miRs. Segundo a figura 27, podemos observar como os fatores transcricionais e pós-transcricionais afetam a transição das isoformas dos genes que codificam α - e β -MyHC. É oportuno salientar que grande parte dos possíveis mecanismos envolvidos nesta transição de isoformas foram propostos em modelos de estudo para fibras de músculo esquelético e músculo cardíaco em animais desafiados por um estressor ou animais modificados geneticamente para expressarem alguma cardiomiopatia dilatada^{142,143,145}. Interessantemente, os miRs são apontados como importantes biomarcadores para algumas patologias, principalmente após a descoberta de que os miRs podem circular livremente no sangue com uma acentuada bioestabilidade permitindo, desta forma, sua detecção no plasma e no soro com alta sensibilidade e especificidade^{146,147}. Neste contexto, foi demonstrado que aumentos na concentração plasmática do miR-280b e do miR-499 são observados em situações em que há danos no miocárdio, tanto em humanos como em modelos animais¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Assim, nossos resultados indicam que o tratamento com parox poderia diminuir a presença de biomarcadores relacionados ao dano do miocárdio causado pela RA.

Outro fator importante para o processo de acoplamento actina-miosina é a disponibilidade de cálcio. Este íon regula a interação entre os filamentos grossos e finos dos sarcômeros via troponina e tropomiosina. Duas são as enzimas envolvidas no metabolismo do cálcio, SERCA2a ($\text{Ca}^{++}/\text{ATPase}$ do retículo sarcoplasmático) e fosfolambam (PLN)¹⁵¹. Outros resultados em paralelo do nosso laboratório mostraram que tanto a SERCA2a quanto a PLN não estão alteradas em ratos com RA tratados com parox. Portanto, a preservação da fração de encurtamento nos nossos resultados parece estar mais relacionada aos fatores acima levantados.

A expressão do receptor para a ocitocina (Oxtr) no tecido ventricular não foi alterada nos ratos com RA e que receberam o tratamento com parox. Este resultado pode ser pela falta de maior secreção de OT devido a ação central da parox, ou porque o átrio direito do coração e não os ventrículos é o local com maior porcentagem de expressão dos OTRs^{152,153}. Nos átrios, a presença dos Oxtrs favorece a secreção de ANP¹⁵². Uma possibilidade é que o aumento constante do ANP circulante pela sobrecarga de volume determinada pela RA produza regulação para baixo na expressão dos receptores de Oxtr que são ativados para colaborar na liberação do ANP. Assim, não haveria alterações na expressão de Oxtr no presente estudo. A maioria dos trabalhos que sugerem efeitos da OT diretos sobre o coração são estudos *in vitro*. Desta forma, outra hipótese que havíamos levantado não se confirmou. Apesar de alguns antidepressivos aumentarem a liberação de OT plasmática, talvez a parox possa ter efeitos diferentes e seus efeitos não se devam a ações da OT.

Como Tahl e colaboradores demonstraram uma interação direta da molécula da parox com as GRK2 resolvemos investigar se a expressão gênica dessas kinases em nosso estudo estaria alterada. Em concordância com a literatura, encontramos uma diminuição significativa da expressão gênica das GRK2 nos animais com RA tratados com a parox quando comparado aos animais com RA e que não receberam o tratamento. Na exacerbação da atividade simpática as GRKs fosforilam os receptores acoplados a proteína G (GPCR) culminando em dessensibilização, internalização e conseqüente diminuição desses receptores com o intuito de controlar a superestimulação⁹⁷. Na figura 28 propomos uma representação das possíveis ações da parox sobre a GRK2. Em corações saudáveis (normais) a ativação dos receptores β -AR, um GPCR, pelas CAs resulta na dissociação da sua subunidade α estimulatória ($G\alpha_s$) da subunidade $G\beta\gamma$. A $G\alpha_s$ estimula a AC a converter o ATP em AMPc, que por sua vez, ativa a PKA. Dentre outras ações, a PKA atua diretamente no sarcômero aumentando sua contratilidade (figura 28A).

No entanto, na RA, grande quantidade de CA é produzida levando a uma superestimulação dos β -AR. Essa superestimulação é controlada pelo aumento das GRK2 que fosforilam os receptores β -AR em sua extremidade C-terminal inibindo a via AC/PKA o que reduz a contractilidade cardíaca (figura 28B). Como a parox se liga as GRK2 impedindo-as de fosforilarem os β -AR, a via AC/PKA é ativada novamente restaurando o inotropismo do coração (figura 28C). Assim, nossos resultados indicam que o tratamento com a parox pode ter preservado a via de sinalização β -adrenérgica, que através da ativação da via da AC e PKA atua sobre os sarcômeros e tem uma influência direta na contratilidade cardíaca.

6.2. Estudo *in vitro*

Com relação aos resultados do estudo *in vitro* não encontramos nenhuma alteração para os genes estudados na linhagem celular H9c2. Tanto os peptídeos natriuréticos, ANP e BNP, quanto as isoformas da miosina, Myh6 e Myh7, tiveram curvas de amplificação muito tardias (tabela 9 e 10) indicando que esses genes são pouco expressos ou até mesmo ausentes nessa linhagem celular. Assim, o aumento da expressão do gene Myh6 observado no grupo Cont+Parox comparado aos grupos RA+Salina e Cont+Salina após o tratamento com fenil e parox não é um resultado confiável.

Para o gene da α -actina esquelética as curvas de amplificação apresentaram valores similares aos valores das curvas de amplificação do gene endógeno (ARBP) mostrando que esse gene é expresso na linhagem celular H9c2, no entanto não observamos alterações da sua expressão entre os grupos estudados. Alguns estudos utilizam condições específicas de suplementação do meio, como por exemplo a redução da concentração de soro fetal bovino de 10% para 1%, antes do tratamento com fenil¹⁵⁴. Talvez essa condição seja necessária para que a fenil exerça efeito hipertrófico sobre a linhagem H9c2.

Apesar de já ter sido demonstrado que o pré-tratamento de uma cultura primária de miócitos ventriculares com parox potencializa, significativamente, a ação do isoproterenol na contratilidade cardíaca quando comparado à ação do isoproterenol sozinho¹⁰⁷ não há estudos da ação da parox em culturas contínuas como a H9c2. Por serem células de origem embrionária e apresentarem características de mioblastos, células indiferenciadas, as H9c2 precisariam ser diferenciadas com algum fármaco, como por exemplo o ácido retinóico^{116,155} para apresentarem

fenótipo de cardiomiócitos e produzirem mudanças expressivas em nosso estudo. Nós utilizamos apenas fenil para reproduzirmos uma possível hipertrofia.

A maioria dos estudos com H9c2 não levam em consideração o estágio de diferenciação que essas células se encontram desmerecendo efeitos que podem ser relacionados ao grau de diferenciação celular e não à intervenção do estudo em si¹¹⁶. Nesse sentido, nossos resultados são interessantes para mostrar que nessas condições as células da linhagem H9c2 não apresentam alterações para os genes estudados. Estudos futuros poderão elucidar melhor a questão.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados mostraram que o tratamento com parox em ratos com RA preserva a fração de encurtamento do coração possivelmente por impedir maior reexpressão da isoforma β -MyHC, regulada pela diminuição da expressão de fatores pós-transcricionais como os miR-208b e -499, e por inibir as GRK2.

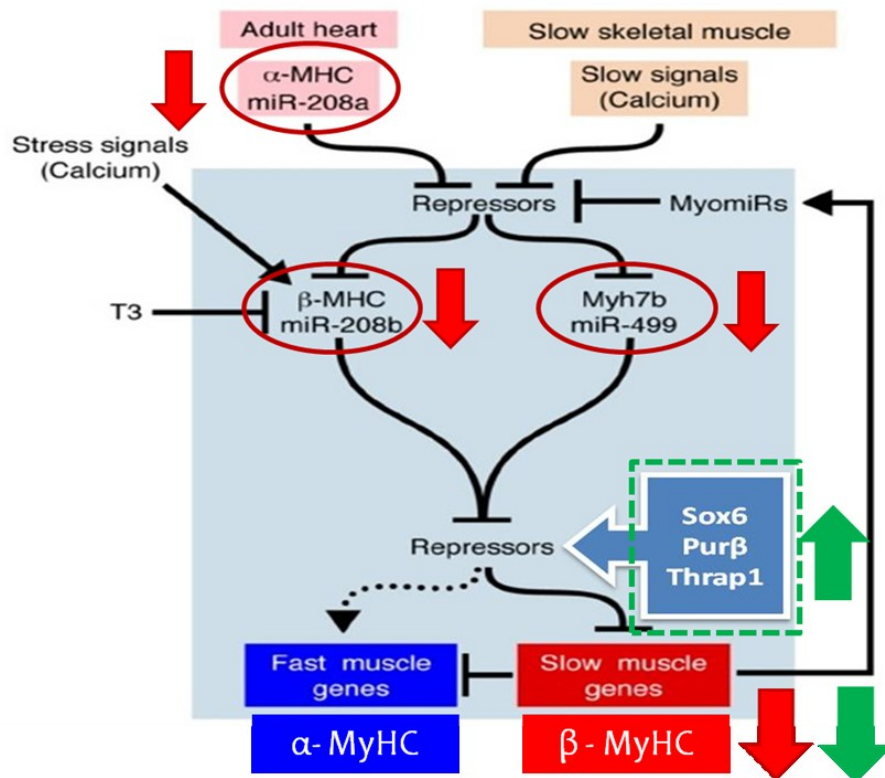


Figura 25. Esquema representativo da rede MyomiR para o controle da expressão das isoformas da MyHC. Segundo este modelo, no coração adulto o miR-208a é codificado a partir do gene relacionado com a expressão da isoforma α -MyHC e é necessário para inibir fatores transcricionais que reprimem os genes responsáveis pela expressão de β -MHC. O gene relacionado a expressão da β -MyHC pode se apresentar nas isoformas Myh7 e Myh7b que codificam os miR-208b e miR-499, respectivamente. Tanto o miR-208b quanto o miR-499 controlam os fatores transcricionais Sox6, Pur β e Thrap1 que, por sua vez, regulam a expressão da isoforma β -MyHC. A presença de fatores estressantes colaboram para que o próprio miR-208a favoreça a transição para a isoforma β -MyHC. Dentro da caixa em azul existem interações regulatórias que seriam comuns tanto para o músculo cardíaco quanto o esquelético (Modificado de van Rooij et al, *Dev Cell*. 2009; 17(5): 662–673).

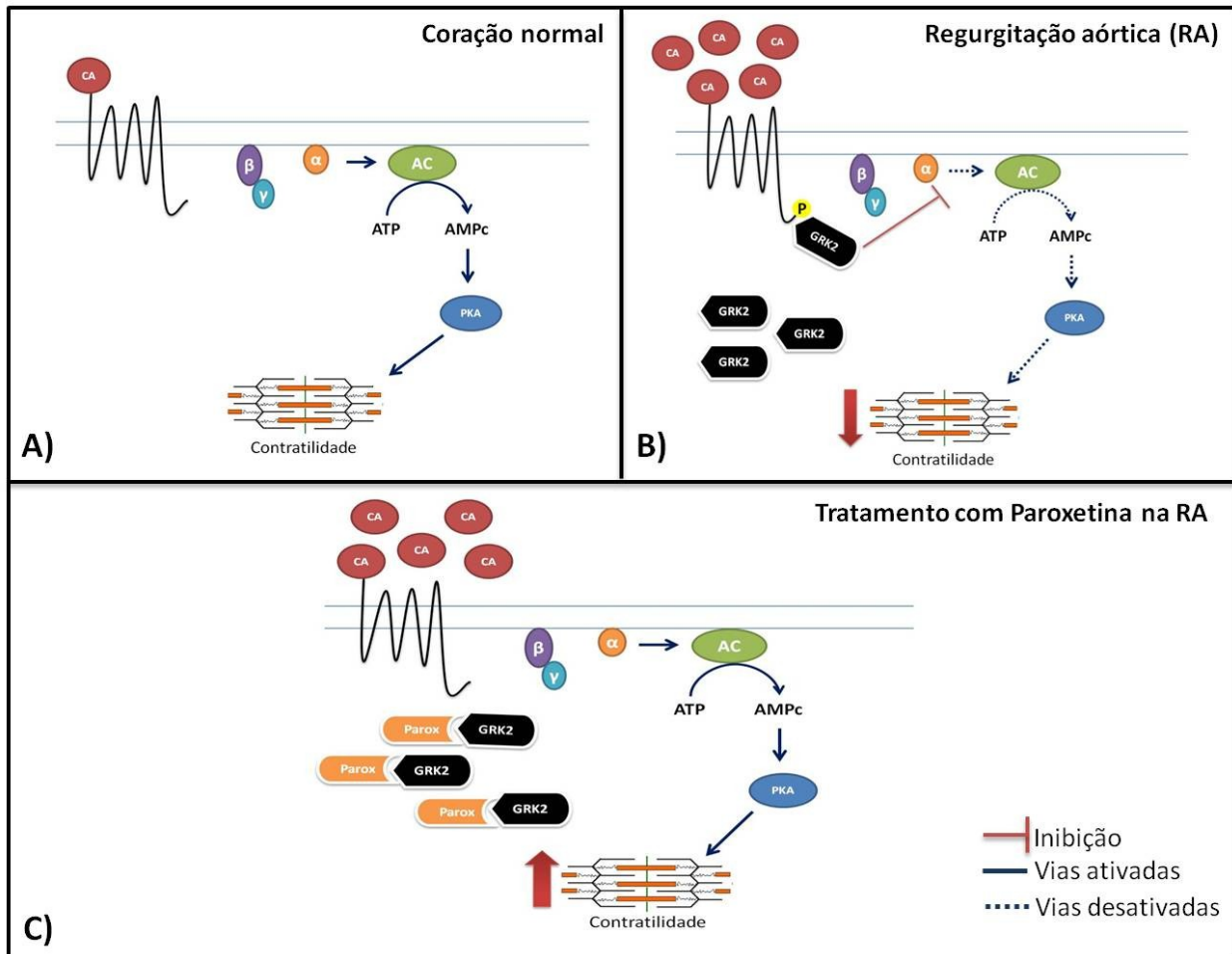


Figura 26: Esquema representativo da via de sinalização β -adrenérgica em corações normais e da atuação das GRK2 e da paroxetina sobre essa via em corações com RA. Nos corações normais as CAs se ligam aos β -AR e aumentam a contratilidade cardíaca através da ativação da via AC/PKA pela subunidade G_{α_s} (A). Na RA, a superestimulação dos β -AR pelas CAs levam a produção das GRK2 que diminuem a contratilidade do coração por inibirem a via AC/PKA através da fosforilação dos β -AR (B). A paroxetina se liga às GRK2 e impedem sua atuação nessa via resultando na melhora da contratilidade cardíaca em corações com RA (C).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Federation, H. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control.
2. Seckeler, M. D. & Hoke, T. R. The worldwide epidemiology of acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Clin. Epidemiol.* **3**, 67–84 (2011).
3. Iung, B. & Vahanian, A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat. Rev. Cardiol.* **8**, 162–72 (2011).
4. Bekeredjian, R. & Grayburn, P. a. Valvular heart disease: aortic regurgitation. *Circulation* **112**, 125–34 (2005).
5. Bonow, R. O. *et al.* Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease : Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Patients With Valvular Heart. *Circulation* **98**, 1949–1984 (1998).
6. Maganti, K., Rigolin, V. H., Sarano, M. E. & Bonow, R. O. Valvular Heart Disease : Diagnosis and Management. *Mayo Clin Proc.* **85**, 483–500 (2010).
7. Tarasoutchi, F. *et al.* Ten-year clinical laboratory follow-up after application of a symptom-based therapeutic strategy to patients with severe chronic aortic regurgitation of predominant rheumatic etiology. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 1316–1324 (2003).
8. WHO Rheumatic fever and rheumatic heart disease: report of a WHO expert consultation on rheumatic fever and rheumatic heart disease. World Health Organization. (2001).
9. Plante, E. *et al.* Benefits of long-term beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **294**, H1888–95 (2008).
10. Maillet, M., van Berlo, J. H. & Molkenin, J. D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 38–48 (2013).
11. Ricci, D. R. Afterload mismatch and preload reserve in chronic aortic regurgitation. *Circulation* **66**, 826–834 (1982).
12. Ross, J. & McCullagh, W. H. Nature of enhanced performance of the dilated left ventricle in the dog during chronic volume overloading. *Circ. Res.* **30**, 549–56 (1972).

13. Kopel L., Lage S.G. Insuficiência Cardíaca: conceito, importância e significado da classificação funcional. Em: Manual de Cardiologia, Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo (SOCESP). 26–27 (2000).
14. Nishimura, R. a *et al.* 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, e57–e185 (2014).
15. Zucker, I. H., Xiao, L. & Haack, K. K. V. The central renin-angiotensin system and sympathetic nerve activity in chronic heart failure. *Clin. Sci. (Lond)*. **126**, 695–706 (2014).
16. Zucker, I. H. & Pliquett, R. U. Novel mechanisms of sympatho-excitation in chronic heart failure. *Heart Fail. Monit.* **3**, 2–7 (2002).
17. Arsenault, M. *et al.* Angiotensin II-converting enzyme inhibition improves survival, ventricular remodeling, and myocardial energetics in experimental aortic regurgitation. *Circ. Heart Fail.* **6**, 1021–8 (2013).
18. Grippo, A. J. & Johnson, A. K. Stress, depression, and cardiovascular dysregulation: A review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. *Natl. Inst. Heal.* **12**, 1–21 (2009).
19. Penninx BW, Beekman AT, Honig A, Deeg DJ, Schoevers RA, van Eijk JT, van T. W. Depression and Cardiac Mortality. *Arch Gen Psychiatry* **58**, 221–227 (2001).
20. Somberg TC; Arora RR. Depression and heart disease: therapeutic implications. *Cardiology* **111**, 75–81 (2008).
21. Kooy, K. Van Der, Hout, H. Van, Marwijk, H., Marten, H. & Stehouwer, C. Depression and the risk for cardiovascular diseases : systematic review and meta analysis. *Int J Geriatr Psychiatry* **22**, 613–626 (2007).
22. Bruton LL, P. K. (Eds). *Goodman e Gilman Manual de farmacologia e terapêutica*. 1219 (2010).
23. Stahl SM. *Psicofarmacologia dos antidepressivos*. 114 (1997).
24. Anderson IK; Martin GR; Ramage AG. Central administration of 5-HT activates 5-HT_{1A} receptors to cause sympathoexcitation and 5-HT₂/5-HT_{1C} receptors to release vasopressin in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* **107**, 1020–1028 (1992).
25. Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of serotonergic (5-HT) neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **31**, 289–320 (1991).

26. Magalhães, A. P. De *et al.* Sertraline , a selective serotonin reuptake inhibitor , affects thirst , salt appetite and plasma levels of oxytocin and vasopressin in rats. *Exp Physiol* **92**, 913–922 (2007).
27. 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 USA* **94**, 11704–11709 (1997).
28. Antunes-Rodrigues, J., Ramalho, M. J. & Reis, L. C. Lesions of the hypothalamus and pituitary inhibit volume-expansion-induced release of atrial natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. USA* **88**, 2956–2960 (1991).
29. Haanwinckel MA; Elias LK; Favaretto ALV; Gutkowska J; McCann SM; Antunes-Rodrigues J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc. Natl. Acad. USA* **92**, 7902–7906 (1995).
30. De Gobbi JIF; Omoto ACM; Siqueira TF; Matsubara LS; Matsubara BB; Roscani MG. Antidepressant treatment decreases daily salt intake and prevents heart dysfunction following subchronic aortic regurgitation in rats. *Submitt. J. Physiol.* (2013). doi:10.1016/j.physbeh.2015.02.037
31. Higa, K. T., Mori, E., Viana, F. F., Morris, M. & Michelini, L. C. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **282**, 537–545 (2002).
32. Kobayashi, H., Yasuda, S. & Bao, N. Postinfarct Treatment With Oxytocin Improves Cardiac Function and Remodeling via Activating Cell-survival Signals and Angiogenesis. *Cardiovasc Pharmacol* **54**, 510–519 (2009).
33. De Bold, A. J., Borenstein, H. B., Veress, A. T. & Sonnenberg, H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. Reprinted from *Life Sci.* 28:89-94, 1981. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 403–9; discussion 403–8, 408–9 (2001).
34. Kita, T. *et al.* Natriuretic and hypotensive effects of brain natriuretic peptide (BNP) in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* **44**, 1541–5 (1989).
35. Richards, A. M. *et al.* Atrial natriuretic hormone has biological effects in man at physiological plasma concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **67**, 1134–9 (1988).
36. Burnett, J. C., Granger, J. P. & Opgenorth, T. J. Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and renin release. *Am. J. Physiol.* **247**, F863–6 (1984).
37. Souza, S. P. D., Davis, M. & Baxter, G. F. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. *Pharmacol. Ther.* **101**, 113–129 (2004).

38. Suzuki, T., Yamazaki, T. & Yazaki, Y. The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* **51**, 489–94 (2001).
39. Maack, T. *et al.* Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* **238**, 675–8 (1987).
40. Kuhn, M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ. Res.* **93**, 700–9 (2003).
41. Kuno, T. *et al.* Co-purification of an atrial natriuretic factor receptor and particulate guanylate cyclase from rat lung. *J. Biol. Chem.* **261**, 5817–23 (1986).
42. Zois, N. E. *et al.* Natriuretic peptides in cardiometabolic regulation and disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **11**, 403–12 (2014).
43. Takimoto, E. Cyclic GMP-Dependent Signaling in Cardiac Myocytes. *Circ. J.* **76**, 1819–1825 (2012).
44. Mukoyama, M. *et al.* Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J. Clin. Invest.* **87**, 1402–12 (1991).
45. Hasegawa, K. *et al.* Light and electron microscopic localization of brain natriuretic peptide in relation to atrial natriuretic peptide in porcine atrium. Immunohistochemical study using specific monoclonal antibodies. *Circulation* **84**, 1203–9 (1991).
46. Goetze, J. P., Friis-Hansen, L., Rehfeld, J. F., Nilsson, B. & Svendsen, J. H. Atrial secretion of B-type natriuretic peptide. *Eur. Heart J.* **27**, 1648–50 (2006).
47. Dietz, J. R. Release of natriuretic factor from rat heart-lung preparation by atrial distension. *Am. J. Physiol.* **247**, R1093–6 (1984).
48. Tamura, N. *et al.* Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4239–44 (2000).
49. Jankowski M, Hajjar F, Kawas SA, Mukaddam-Daher S, Hoffman G, McCann SM, G. J. Rat heart : A site of oxytocin production and action. *Proc Natl Acad USA* **95**, 14558–14563 (1998).
50. Cao, L. & Gardner, D. G. Natriuretic Peptides Inhibit DNA Synthesis in Cardiac Fibroblasts. *Hypertension* **25**, 227–234 (1995).
51. Lopez, M. J. *et al.* Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* **378**, 65–8 (1995).

52. Oliver, P. M. *et al.* Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 14730–5 (1997).
53. Kuhn, M. *et al.* Progressive cardiac hypertrophy and dysfunction in atrial natriuretic peptide receptor (GC-A) deficient mice. *Heart* **87**, 368–74 (2002).
54. Hall, C. *et al.* N-terminal proatrial natriuretic factor. An independent predictor of long-term prognosis after myocardial infarction. *Circulation* **89**, 1934–1942 (1994).
55. Omland, T. *et al.* Plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular systolic function and long-term survival after acute myocardial infarction. Comparison with plasma atrial natriuretic peptide and N-terminal proatrial natriuretic peptide. *Circulation* **93**, 1963–9 (1996).
56. Christoffersen, T. E. H. *et al.* Increased natriuretic peptide receptor A and C gene expression in rats with pressure-overload cardiac hypertrophy Increased natriuretic peptide receptor A and C gene expression in rats with pressure-overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol.* **290**, H1635–H1641 (2006).
57. Takahashi T, Allen PD, I. S. Expression of A-, B-, and C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricles. Correlation with expression of the Ca(2+)-ATPase gene. *Circ Res.* **71(1)**, 9–17 (1992).
58. Spina, G. S. *et al.* Neurohormonal Profile of Rheumatic Patients with Significant Chronic Aortic Regurgitation. *Arq Bras Cardiol.* **92**, 143–149 (2009).
59. Horio T; Nishikimi T; Yoshihara F; Matsuo H; Takshita S; Kangawa K. Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension* **35**, 19–24 (2000).
60. Gupta, M. P. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **43**, 388–403 (2007).
61. Spann, J. *Functional changes o in pathologic hypertrophy. In: Zak, R., editor. Growth of the Heart in Health and Disease. New York: Raveen Press; 421–466 (1984).*
62. Bonow, R. O. *et al. ACC / AHA Practice Guidelines Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease Executive Summary A Report of the American College of Cardiology / American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management o. doi:10.1161/01.CIR.98.18.1949*
63. Kim, K.-H. & Kim, H.-K. Exercise Echocardiography in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Chronic Severe Aortic Regurgitation. *Circ. J.* **77**, 2253–2254 (2013).
64. Mangner, N. & Schuler, G. [ESC guidelines on the management of valvular heart disease. What has changed and what is new?]. *Herz* **38**, 828–37 (2013).

65. Taniguchi, K. & Sawa, Y. Contemporary reviews by surgeon: timing of operation for chronic aortic regurgitation. *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **60**, 735–43 (2012).
66. Hajjar, R. J. & Gwathmey, J. K. Cross-bridge dynamics in human ventricular myocardium. Regulation of contractility in the failing heart [published erratum appears in *Circulation* 1994 Jan;89(1):509]. *Circulation* **86**, 1819–1826 (1992).
67. Mann, D. L., Urabe, Y., Kent, R. L., Vinciguerra, S. & Cooper, G. Cellular versus myocardial basis for the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Circ. Res.* **68**, 402–15 (1991).
68. Shroff, S. G. & Motz, W. Left ventricular systolic resistance in rats with hypertension and hypertrophy. *Am. J. Physiol.* **257**, H386–94 (1989).
69. Harrington, W. F. On the origin of the contractile force in skeletal muscle Biochemistry : Harrington. **76**, 5066–5070 (1979).
70. Rayment, I. *et al.* Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**, 50–8 (1993).
71. Morano, M. *et al.* Regulation of human heart contractility by essential myosin light chain isoforms. *J. Clin. Invest.* **98**, 467–73 (1996).
72. England, J. & Loughna, S. Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 1221–39 (2013).
73. McNally, E. M., Kraft, R., Bravo-Zehnder, M., Taylor, D. a & Leinwand, L. a. Full-length rat alpha and beta cardiac myosin heavy chain sequences. Comparisons suggest a molecular basis for functional differences. *J. Mol. Biol.* **210**, 665–71 (1989).
74. Bárány, M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.* **50**, Suppl:197–218 (1967).
75. Van Rooij, E. The art of microRNA research. *Circ. Res.* **108**, 219–34 (2011).
76. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* **9**, 102–14 (2008).
77. Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 597–610 (2010).
78. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–33 (2009).
79. Van Rooij, E. & Olson, E. N. microRNAs put their signatures on the heart. *Physiol. Genomics* **31**, 365–6 (2007).

80. Rooij, E. Van *et al.* A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad USA* **103**, 18255–18260 (2006).
81. Ikeda, S. *et al.* Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol. Genomics* **31**, 367–73 (2007).
82. Catalucci, D. *et al.* MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. **13**, 613–618 (2007).
83. Patrick, D. M. *et al.* Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. **120**, 3817–3916 (2010).
84. Yang, B. *et al.* The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat. Med.* **13**, 486–91 (2007).
85. D., Z. Y. S. E. S. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* **436**, 214–220 (2005).
86. Zhao, Y. *et al.* Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* **129**, 303–17 (2007).
87. Rooij, E. Van, Sutherland, L. B., Qi, X. & Richardson, J. A. Control of Stress-Dependent Cardiac Growth and Gene Expression by a MicroRNA. **316**, 575–79 (2007).
88. Abraham, W. T. *et al.* Coordinate changes in Myosin heavy chain isoform gene expression are selectively associated with alterations in dilated cardiomyopathy phenotype. *Mol. Med.* **8**, 750–60 (2002).
89. Miyata, S., Minobe, W., Bristow, M. R. & Leinwand, L. a. Myosin Heavy Chain Isoform Expression in the Failing and Nonfailing Human Heart. *Circ. Res.* **86**, 386–390 (2000).
90. Krenz, M. & Robbins, J. Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress. *Journal of the American College of Cardiology* **44**, 2390–7 (2004).
91. Herron, T. J. Small Amounts of alpha-Myosin Heavy Chain Isoform Expression Significantly Increase Power Output of Rat Cardiac Myocyte Fragments. *Circ. Res.* **90**, 1150–1152 (2002).
92. Van Rooij, E. *et al.* A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev. Cell* **17**, 662–73 (2009).
93. Hagiwara, N., Yeh, M. & Liu, A. Sox6 Is Required for Normal Fiber Type Differentiation of Fetal Skeletal Muscle in Mice. **236**, 2062–2076 (2007).
94. Ji, J. *et al.* Puralpha and Purbeta collaborate with Sp3 to negatively regulate beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle inactivity. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1531–43 (2007).

95. Grueter, C. E. *et al.* A cardiac microRNA governs systemic energy homeostasis by regulation of MED13. *Cell* **149**, 671–83 (2012).
96. Raake, P. W. J. *et al.* AAV6. β ARKct cardiac gene therapy ameliorates cardiac function and normalizes the catecholaminergic axis in a clinically relevant large animal heart failure model. *Eur. Heart J.* **34**, 1437–47 (2013).
97. Lymperopoulos, A., Rengo, G. & J. Koch, W. GRK2 Inhibition in Heart Failure: Something Old, Something New. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 186–191 (2012).
98. Ferguson, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **53**, 1–24 (2001).
99. Siryk-Bathgate, A., Dabul, S. & Lymperopoulos, A. Current and future G protein-coupled receptor signaling targets for heart failure therapy. *Drug Des. Devel. Ther.* **7**, 1209–1222 (2013).
100. DeGraff, J. L., Gagnon, A. W., Benovic, J. L. & Orsini, M. J. Role of arrestins in endocytosis and signaling of β 2-adrenergic receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* **274**, 11253–11259 (1999).
101. Jewell-Motz, E. a & Liggett, S. B. G protein-coupled receptor kinase specificity for phosphorylation and desensitization of α 2-adrenergic receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* **271**, 18082–18087 (1996).
102. Lymperopoulos, A., Rengo, G., Funakoshi, H., Eckhart, A. D. & Koch, W. J. Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure. *Nat. Med.* **13**, 315–23 (2007).
103. Lymperopoulos, A., Rengo, G. & Koch, W. J. Adrenal adrenoceptors in heart failure: fine-tuning cardiac stimulation. *Trends in Molecular Medicine* **13**, 503–511 (2007).
104. Lymperopoulos, A. *et al.* Reduction of sympathetic activity via adrenal-targeted GRK2 gene deletion attenuates heart failure progression and improves cardiac function after myocardial infarction. *J. Biol. Chem.* **285**, 16378–16386 (2010).
105. Raake, P. W. *et al.* G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 Ablation in Cardiac Myocytes Before or After Myocardial Infarction Prevents Heart Failure. **103**, 413–422 (2009).
106. Harding, V. B., Jones, L. R., Lefkowitz, R. J., Koch, W. J. & Rockman, H. a. Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 5809–14 (2001).
107. Thal, D. M. *et al.* Paroxetine Is a Direct inhibitor of G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 and Increases Myocardial Contractility. **7**, 1830–1839 (2013).

108. Schumacher, S. M. *et al.* Paroxetine-mediated GRK2 inhibition reverses cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *7*, 1–12 (2015).
109. Diaz, R. J. & Wilson, G. J. Studying ischemic preconditioning in isolated cardiomyocyte models. *Cardiovasc. Res.* **70**, 286–296 (2006).
110. Parameswaran, S., Kumar, S., Verma, R. S. & Sharma, R. K. Cardiomyocyte culture - an update on the in vitro cardiovascular model and future challenges. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **91**, 985–998 (2013).
111. Invitrogen. Cell Culture Basics. 1–61 (2010). at <papers3://publication/uuid/514B97BF-B151-40A6-9721-B0B41B2B4E3A>
112. Qiagen. *Transfection Resource Book Transfection Tools — your online guide to transfection. Protocol* (2011).
113. Kimes, B. W. & Brandt, B. L. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp. Cell Res.* **98**, 367–381 (1976).
114. Koekemoer, A. L., Chong, N. W., Goodall, A. H. & Samani, N. J. Myocyte stress 1 plays an important role in cellular hypertrophy and protection against apoptosis. *FEBS Lett.* **583**, 2964–2967 (2009).
115. Zordoky, B. N. M. & El-Kadi, A. O. S. H9c2 cell line is a valuable in vitro model to study the drug metabolizing enzymes in the heart. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **56**, 317–322 (2007).
116. Pereira, S. L. *et al.* Metabolic remodeling during H9c2 myoblast differentiation: Relevance for in vitro toxicity studies. *Cardiovasc. Toxicol.* **11**, 180–190 (2011).
117. Watkins, S. J., Borthwick, G. M. & Arthur, H. M. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* **47**, 125–131 (2011).
118. Peng, Z. W. *et al.* Sertraline promotes hippocampus-derived neural stem cells differentiating into neurons but not glia and attenuates LPS-induced cellular damage. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **36**, 183–188 (2012).
119. Peng, Z.-W. *et al.* Paroxetine up-regulates neurogenesis in hippocampus-derived neural stem cell from fetal rats. *Mol. Cell. Biochem.* **375**, 105–13 (2013).
120. Bishopric, N. H., Simpson, P. C. & Ordahl, C. P. Induction of the skeletal alpha-actin gene in alpha 1-adrenoceptor-mediated hypertrophy of rat cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* **80**, 1194–1199 (1987).

121. Meidell, R. S., Sen, a, Henderson, S. a, Slahetka, M. F. & Chien, K. R. Alpha 1-adrenergic stimulation of rat myocardial cells increases protein synthesis. *Am. J. Physiol.* **251**, H1076–H1084 (1986).
122. Zhang, T. T., Takimoto, K., Stewart, A. F., Zhu, C. & Levitan, E. S. Independent regulation of cardiac Kv4.3 potassium channel expression by angiotensin II and phenylephrine. *Circ. Res.* **88**, 476–482 (2001).
123. Arsenault M, Plante E, Drolet MC, C. J. Experimental aortic regurgitation in rats under echocardiographic guidance. *J Hear. Valve Dis.* **11**, 128–134 (2002).
124. Plante E, Lachance D, Gaudreau M, Drolet MC, Roussel E, Arsenault M, C. J. Effectiveness of beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. *Circulation* **110**, 1477–1483 (2004).
125. Plante E, Gaudreau M, Lachance D, Drolet MC, Roussel E, Gauthier C, Lapointe E, Arsenault M, C. J. Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents volume overload cardiomyopathy in experimental chronic aortic valve regurgitation. *J Physiol Pharmacol* **82**, 191–199 (2004).
126. Sanh DJ, DeMaria A, Kisslo J, W. A. 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.* **58**, 1072–1083 (1978).
127. Ruijter, J. M. *et al.* Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* **37**, e45 (2009).
128. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
129. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**, e36 (2002).
130. Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L. & McMullen, J. R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.* **128**, 191–227 (2010).
131. Champetier, S. *et al.* Gene profiling of left ventricle eccentric hypertrophy in aortic regurgitation in rats : rationale for targeting the α_1 -adrenergic and renin-angiotensin systems. **5**, 669–677 (2009).
132. Mahdavi, V. *et al.* Sarcomeric myosin heavy chain gene family: organization and pattern of expression. *Med. Sci. Sports Exerc.* **18**, 299–308 (1986).

133. Gupta, M. P. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **43**, 388–403 (2007).
134. Weiss A *et al.* Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96(6)**, 2958–63 (1999).
135. Morkin, E. Control of Cardiac Myosin Heavy Chain Gene Expression. **531**, 522–531 (2000).
136. Swynghedauw, B. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol. Rev.* **66**, 710–71 (1986).
137. Watkins, H. *et al.* Characteristics and prognostic of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* (1992).
138. De Sousa Abreu, R., Penalva, L. O., Marcotte, E. M. & Vogel, C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol. Biosyst.* **5**, 1512–1526 (2009).
139. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, B. D. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**, 64–71 (2008).
140. Selbach, M. *et al.* Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**, 58–63 (2008).
141. Unwin, R. D. *et al.* Quantitative proteomics reveals posttranslational control as a regulatory factor in primary hematopoietic stem cells. *Blood* **107**, 4687–4694 (2006).
142. McCarthy, J. J., Esser, K. A., Peterson, C. A. & Dupont-Versteegden, E. E. Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiol. Genomics* **39**, 219–26 (2009).
143. Van Rooij E, Liu N, O. E. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet* **24**, 159–66 (2008).
144. Oliveira-Carvalho, V., Carvalho, V. O. & Bocchi, E. A. The emerging role of miR-208a in the heart. *DNA Cell Biol.* **32**, 8–12 (2013).
145. Rooij, E. Van *et al.* A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Natl. Inst. Heal.* **17**, 662–673 (2009).
146. Gilad, S. *et al.* Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* **3**, e3148 (2008).
147. Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10513–8 (2008).

148. Ji, X. *et al.* Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin. Chem.* **55**, 1944–9 (2009).
149. Adachi, T. *et al.* Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin. Chem.* **56**, 1183–5 (2010).
150. Corsten, M. F. *et al.* Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **3**, 499–506 (2010).
151. Lindemann, J. P. & Watanabe, A. M. Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca²⁺-calmodulin-dependent mechanisms. *J. Biol. Chem.* **260**, 4516–25 (1985).
152. Favaretto, a L. *et al.* Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. *Peptides* **18**, 1377–81 (1997).
153. Gutkowska, J., Jankowski, M. & Antunes-Rodrigues, J. The role of oxytocin in cardiovascular regulation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **47**, 206–14 (2014).
154. Hahn, N. E. *et al.* Early NADPH oxidase-2 activation is crucial in phenylephrine-induced hypertrophy of H9c2 cells. *Cell. Signal.* **26**, 1818–1824 (2014).
155. Ménard, C. *et al.* Modulation of L-type calcium channel expression during retinoic acid-induced differentiation of H9C2 cardiac cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 29063–29070 (1999).