UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Instituto de Biociências
de Botucatu - Unesp

LINA ABU ALHUDA

ANTIDEPRESSIVO MODULA O COMPORTAMENTO E A EXPRESSÃO GÊNICA DAS CADEIAS DE MIOSINA, SERCA2 E FOSFOLAMBAM EM RATOS COM INSUFICIÊNCIA AÓRTICA?

BOTUCATU - SP

2013

LINA ABU ALHUDA

ANTIDEPRESSIVO MODULA O COMPORTAMENTO E A EXPRESSÃO GÊNICA DAS CADEIAS DE MIOSINA, SERCA2 E FOSFOLAMBAM EM RATOS COM INSUFICIÊNCIA AÓRTICA?

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Irani Fratucci de Gobbi

BOTUCATU - SP

2013

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

Alhuda, Lina Abu.
Antidepressivo modula o comportamento e a expressão gênica das cadeias de miosina, SERCA2 e fosfolambam em ratos com insuficiência aórtica? / Lina Abu Alhuda. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Juliana Irani Fratucci de Gobbi
Capes: 20702000

1. Antidepressivos. 2. Insuficiência aórtica. 3. Expressão gênica. 4. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Bomba SERCA2a; Depressão; Fosfolambam; Insuficiência aórtica; Paroxetina.

DEDICATÓRIA

Aos meus irmãos, Walid e Rámi na Hungria,

e à minha família no Líbano.

Antidepressivo modula o comportamento e a expressão gênica das cadeias de miosina, serca2 e fosfolambam em ratos com insuficiência aórtica?

Introdução: A insuficiência aórtica (IAo), uma situação de sobrecarga de volume, é caracterizada pelo refluxo diastólico do sangue da aorta refluindo para o ventrículo esquerdo (VE) devido ao mal fechamento das cúspides aórticas. A principal causa da IAo em países em desenvolvimento é a febre reumática, incluindo o Brasil, e a degeneração valvar nos países desenvolvidos. Existe uma forte associação entre doenças cardiovasculares e depressão. Entre os antidepressivos mais prescritos no mundo encontram-se os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS). Estudos prévios do nosso laboratório mostraram que a utilização de um ISRS, paroxetina, determinou melhora da função cardíaca em ratos com IAo subcrônica, bem como redução da ingestão diária de sódio hipertônico (NaCl 0,3M). Doenças cardiovasculares podem determinar mudanças comportamentais como maior ansiedade, e ainda não se sabe se a IAo determinaria estado ansiogênico ou anedonia, incapacidade de obter prazer através de experiências físicas ou sensoriais. Um possível alvo para a ação dos ISRS pode ser a mudança na expressão de isoformas de enzimas que colaboram na função de contração do músculo cardíaco, como as cadeias pesadas da miosina (MHC), a Ca^{2+}/ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), bem como sua proteína reguladora a fosfolambam (PLB). **Objetivo:** Avaliar em ratos com IAo subcrônica e que receberam ou não o tratamento por 4 semanas com um ISRS (paroxetina) parâmetros comportamentais de ansiedade e de anedonia e expressão gênica de α- e β-MHC, SERCA2a e PLB no tecido cardíaco. **Metodologia:** Ratos Wistar machos foram submetidos a cirurgia de indução da IAo, ansiedade foi avaliada através do teste em labirinto em cruz elevado (LCE), e estado de anedonia através da ingestão de solução de sacarose 2%. Após eutanásia foi feita coleta do tecido cardíaco e extração do RNA total

para análise da expressão gênica relativa pelo método de RT-qPCR. **Resultados:** A fração de encurtamento dos ratos com IAo que foram tratados em comparação com os animais com IAo que não foram tratados foi preservada. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao tempo gasto nos braços abertos ou tempo gasto nos braços fechados e nem no número de entrada nos braços abertos ou fechados. A ingestão de água e de sacarose 2% foi semelhante entre os grupos durante todo o período estudado. A expressão gênica das proteínas regulatórias do Ca^{2+} (SERCA2a, PLB e a relação SERCA2a/PLB) foi semelhante entre os grupos. Com relação a expressão gênica das proteínas contráteis α-MHC e β-MHC não ocorreram alterações, porém a relação α-/β-MHC foi maior nos animais IAo que receberam paroxetina. **Conclusão:** Nossos resultados mostraram que o tratamento de ratos com IAo com um antidepressivo ISRS, a paroxetina, não alterou parâmetros relacionados à ansiedade ou a expressão das proteínas regulatórias do Ca^{2+} (SERCA2a ou PBL). Por outro lado, o tratamento com paroxetina em ratos com IAo subcrônica favoreceu aumento na proporção das isoformas α-/β-MHC o que pode ser responsável por preservar a fração de encurtamento do coração destes animais nestas condições.

Palavras-chave: insuficiência aórtica, paroxetina, bomba SERCA

Does antidepressant alter behavior and genic expression of heavy chains of myosine, SERCA2 and phospholamban in rats with Aortic Insufficiency?

Introduction: Aortic insufficiency (AoI), a volume overload, is characterized by the diastolic reflux of blood from the regurgitating aorta to the left ventricle. This effect results from malfunctioning aortic cusps. The main cause of AoI in developing countries is rheumatic fever, including Brazil, and valvar degeneration in developed countries. There is a strong association between cardiovascular diseases and depression. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) are one of the most prescribed antidepressants in the world. Previous studies of our laboratory showed that the utilization of a SSRI, paroxetine, improved cardiac function in rats with sub-chronic AoI and reduced the daily ingestion of hypertonic sodium (NaCl 0,3M). Cardiovascular diseases can determine behavior changes like increase of anxiety, and it is yet unknown if AoI would determine anxiety or anhedonia, incapacity of obtaining pleasure through physical or sensorial experiences. A possible target for SSRI action could be a change in the expression of enzyme isoforms that collaborate in the contractile function of the heart muscle, like the heavy chains of myosine, the sarcoplasmatic reticulum $Ca^{2+/}$ATPase (SERCA) and its regulator protein, phospholamban (PLB). **Objectives:** Evaluation of behavior parameters for anxiety and anhedonia state and genic expression of α-myosine, β-myosine, SERCA2a and PLB in the heart tissue of rats with sub-chronic AoI that received treatment with an SSRI (paroxetine) for 4 weeks. **Methods:** Surgery to induce AoI was performed on male Wistar rats, anxiety was evaluated by the elevated plus-maze (EPM) and state of anhedonia was tested by ingestion of 2% sucrose solution. After euthanasia the heart tissue was collected and total RNA was extracted to be analyzed by the RT-qPCR method. **Results:** Heart fractional shortening was preserved in rats with AoI that were treated compared to rats with AoI that were not

treated. There was no statistically significant difference between the groups in time spent in the open arms or time spent in the closed arms of the EPM. The ingestion of water and 2% sucrose solution was similar between the groups during the evaluated period. Genic expression related to Ca^{2+} proteins regulation (SERCA2a, PLB and SERCA2a/PLB relation) was similar between groups. Genic expression of contractility protein α-MHC and β-MHC were not altered, however α-/β-MHC relation was increased in AoI rats treated with paroxetine. **Conclusion:** Our results show that AoI rats treated with paroxetine presented no signal or change of anxiety or even changes in Ca^{2+} proteins regulation. On the other hand, there was an improvement in the α-/β-MHC relation that might be the cause of the systolic preservation of the fraction shortening in these rats under this conditions.

Key-words: aortic insufficiency, paroxetine, SERCA pump

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10
2. OBJETIVOS 15
3. MATERIAIS E MÉTODOS 15
3.1 Animais 15
3.2 Indução da Insuficiênia Aórtica (IAo) 15
3.3 Ecocardiograma (ECO) 16
3.4 Administração do antidepressivo 17
3.5 Teste comportamental -anedonia - Ingestão de sacarose 2% 18
3.6 Teste comportamental - ansiedade -Labirinto em Cruz Elevado (LCE) 18
3.7 Preparo para a coleta do tecido 18
3.8 Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR) 19
3.8.1 Extração de RNA total 19
3.8.2 Análise da qualidade do RNA 19
3.8.3 Reação de Transcrição Reversa (mRNA) 20
3.8.4 PCR quantitativo em Tempo Real 20
3.9 Desenho experimental 21
4. RESULTADOS 22
4.1 Dados dos exames de ECO 22
4.2 Teste de anedonia 26
4.3 Teste do LCE 28
4.4 Coleta do tecido 30
4.5 Expressão gênica da SERCA2a e PLB 32
4.6 Expressão gênica da α e β-miosina 33
5. DISCUSSÃO 34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 37

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência aórtica (IAo) é uma patologia que cursa com sobrecarga hemodinâmica, determinando uma das maiores respostas de hipertrofia do miocárdio. O paciente com IAo desenvolve uma hipertrofia excêntrica que é o aumento das câmaras cardíacas devido a dilatação, uma vez que ocorre adição de sarcômeros em série o que aumenta o comprimento dos miócitos (GROSSMAN; JONES; MCLAURIN, 1975). As causas da IAo são múltiplas, dentre elas, endocardite, degeneração valvar, anormalidades congênitas, dilatação aórtica idiopática, uso de drogas anoréticas e a cardiopatia reumática crônica (BORER et al., 1998; OLSON; SUBRAMANIAN; EDWARDS, 1984; TARASOUTCHI et al., 2003). A febre e a cardiopatia reumática crônica ainda são um grande problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento como o nosso. Estimativas mundiais da doença em crianças e adultos jovens variam de 4,9 a 30 milhões de casos. Estatísticas hospitalares revelam que 10-35% de todas as internações por problemas cardíacos correspondem a pacientes com febre reumática ou cardiopatia reumática crônica (WHO, 2001). Existem pelo menos 15,6 milhões de casos de cardiopatia reumática crônica no mundo com 282 mil casos novos e 233 mil mortes por ano, e a maior prevalência já documentada da doença entre crianças de países em desenvolvimento foi de 5,7 por 1000 indivíduos na África subsaariana (CARAPETIS et al., 2005). No Brasil, onde a doença cardíaca valvar ainda é prevalente e acomete em especial pessoas jovens (BONOW et al., 1998; TARASOUTCHI et al., 2003), os dados sobre a incidência da febre reumática e da cardiopatia reumática crônica são escassos. Estudos realizados em crianças em idade escolar em algumas capitais brasileiras estimaram uma prevalência de cardiopatia reumática crônica de 1-7 por 1000 crianças, o que é significativamente maior do que a prevalência da doença em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, onde varia entre 0,1-0,4 por 1000 crianças (MEIRA et al., 2005).

A doença é causada pela resposta autoimune tardia do organismo ao estreptococo β-hemolítico do grupo A (*Streptococcus pyogenes*), agente causador da faringoamigdalite. É uma doença associada a baixo nível educacional e socioeconômico (WHO, 2001*;* ADANJA;VLAJINAC;JAREBINSKI, 1988; OKELLO et al.,2012;RIAZ et al., 2013), porém estudos recentes indicam que alguns indivíduos podem ter uma predisposição à doença, pois existe uma influência genética que controla tanto a resposta imune adaptativa

quanto a inata sobre seu desenvolvimento (GUILHERME; KALIL, 2013). A expressão de alguns alelos do gene HLA classe II, por exemplo, resulta em moléculas de HLA que preferencialmente apresentam antígenos anti-estreptococo e auto-antígenos aos receptores de células T (GUILHERME; RAMASAWMY; KALIL, 2007). Recentemente, o gene TNFA (localizado no mesmo cromossomo que os genes HLA), carregado de mutação na região promotora, foi associado à doença, pois aumenta a produção de TNF-α, citocina pró-inflamatória (RAMASAWMY et al., 2007). Citocinas como TNF-α e IFN-γ são os principais mediadores das lesões valvares, e o número reduzido de células mononucleares produzindo IL-4 (citocina anti-inflamatória) no tecido valvar contribui para a progressão e manutenção das lesões valvares em pacientes com cardiopatia reumática crônica (GUILHERME, 2013).

A degeneração valvar, outra causa importante da IAo, decorre do avanço da idade, e é mais frequente nos países desenvolvidos como os Estados Unidos onde a principal causa de morte em indivíduos com 65 anos ou mais é alguma doença cardíaca (HE et al., 2005), e a expectativa de vida é maior (em 1990 foi de 75 anos ao nascer e em 2011 subiu para 79 anos) (WHO, 2013). Porém, o aumento da população de idosos já pode ser observado no Brasil também, pois a expectativa de vida que foi de 67 anos ao nascer em 1990 está aumentando e alcançou 74 anos em 2011 (IBGE, 2013a; WHO 2013). Além disso, espera-se ter mais de 50 milhões de pessoas com 65 anos ou mais em 2050 no Brasil de acordo com a projeção populacional do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013b). Esta transformação demográfica será responsável pelo aumento na prevalência de doenças cardíacas e valvares decorrentes de degeneração valvar no país. Estudos populacionais em países desenvolvidos demonstraram que a prevalência de doenças valvares aumenta significativamente com o avanço da idade (IUNG et al., 2003; SINGH et al., 1999; NKOMO et al., 2006, LEBOWITZ et al., 2000). Estas doenças valvares são associadas a características de sobrecarga de pressão ou de volume. Portanto, são, em grande parte, causadores de regurgitação valvar, tanto aórtica quanto mitral. Nkomo e colaboradores mostraram que na população geral regurgitação aórtica é associada a dilatação e hipertrofia do VE. Assim, a regurgitação aórtica crônica acaba se desenvolvendo em IAo.

O paciente com IAo mantém-se assintomático por um longo período e, conforme o momento da história natural e do grau de hipertrofia pode desenvolver quadro de insuficiência cardíaca congestiva (IC), um problema de saúde pública que vêm crescendo em prevalência em todo o mundo. A IC é uma síndrome complexa que pode resultar de qualquer desordem funcional ou estrutural do coração que prejudique a capacidade do ventrículo preencher-se com sangue ou ejetá-lo. Etiologicamente a IC é classificada como qualquer

anormalidade mecânica (sobrecarga de pressão/volume, doença pericárdica, doença restritiva), falência miocárdica ou arritmias (bradiarritmias, taquiarritmias). Entre os pacientes com mais de 60 anos a IC é a principal causa de internação, respondendo por 19,6% das internações por doenças cardiovasculares, equivalendo a 11,7% do total de admissões hospitalares (ALBANESI FILHO, 2005).

Estudos sugerem uma via de mão dupla entre doenças cardiovasculares transtornos de humor como a depressão e a ansiedade (GRIPPO; JOHNSON, 2009; PENNIX et al., 2001; VAN DER KOOY et al., 2007). É interessante que tal correlação parece ser independente dos fatores de risco tradicionais para as doenças cardiovasculares, como: hipertensão, sobrepeso, hipercolesterolemia, ou histórico de doenças cardíacas (GRIPPO; JOHNSON, 2009; PENNIX et al., 2001). O principal sistema neurotransmissor desregulado na depressão são os receptores de serotonina (5-HT, BRUTON; PARKER, 2010). Entre os antidepressivos mais prescritos no mundo encontram-se os inibidores seletivos da receptação da serotonina (ISRS), que apresentam vantagens sobre os antidepressivos clássicos (como os tricíclicos), pela segurança na posologia e boa tolerabilidade, sendo muito mais seguros em pacientes com doença cardíaca por diminuir a probabilidade de arritmias (STAHL, 1997; BRUTON; PARKER, 2010). O mecanismo de ação hipotetizado para os ISRS está baseado em ações sobre auto-receptores pré-sinápticos e receptores pós-sinápticos. Inicialmente os ISRS aumentam a 5-HT na região somatodendrítica por agirem em auto-receptores somatodendríticos 5-HT_{1A}, regulando-os para baixo. Assim, o fluxo de impulsos neuronais consegue ativar a liberação de 5-HT pelo terminal axônico (STAHL, 1997). A desinibição serotoninérgica ativa a liberação de 5-HT dos núcleos da rafe, no mesencéfalo, para gânglios da base, córtex límbico e hipocampo, além de uma via descendente da rafe para ponte, bulbo e medula espinhal (STAHL, 1997).

O efeito comportamental de doenças cardiovasculares pode ser o desenvolvimento de estados de ansiedade e/ou anedonia. A anedonia (ou anedônia) para animais de experimentação é definida como incapacidade de obter prazer através de experiências físicas ou sensoriais, como por exemplo, toque ou sabores na alimentação, que normalmente são consideradas prazerosas. Desta forma, através do oferecimento de uma solução de sacarose, como descrito por Grippo e colaboradores (GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002), propomos verificar como estará este parâmetro comportamental nos animais com IAo e que receberão o ISRS. Em adição, seria interessante testar se a IAo determinaria algum tipo de ansiedade nos animais, bem como se o ISRS mudaria estes parâmetros em ratos com IAo subcrônica. A ansiedade pode ser testada pela exposição dos

animais a um teste em labirinto em cruz elevado (LCE). Este aparato é um dos modelos consagrados para detectar atividade ansiolítica em drogas (HOGG, 1996). O teste é baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos (TREIT; MENARD; ROYAN, 1993), onde são avaliados parâmetros espaço-temporais em relação ao tempo gasto, bem como número de vezes que os animais permaneceram nos braços abertos e fechados do LCE (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). Um estudo interessante em ratos enfartados mostrou que estes animais apresentaram maior chance em explorar mais os braços abertos do aparato bem como pular do aparato, e estes comportamentos foram interpretados não como falta de ansiedade, mas como um ataque de pânico (HENZE et al., 2008). Já foi observado em humanos diagnosticados com IC, que cerca de 9.3% destes apresentam ataques de pânico em relação à um máximo de 3% na faixa de indivíduos considerados saudáveis (MULLER-TASCH et al., 2008).

Estudos do nosso laboratório mostraram que o tratamento com paroxetina, um ISRS, em ratos com IAo subcrônica reduziu o consumo diário de NaCl 0,3M, e melhorou a função sistólica destes animais. O uso de ISRS parece ser benéfico ao coração, e pacientes com síndrome do pânico e tratados com ISRS apresentam aumento na variabilidade da frequência cardíaca (TUCKER et al., 1997). Assim, a 5-HT central parece favorecer a função cardíaca. Administração de agonistas da 5-HT induz secreção de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT; ANDERSON; MARTIN; RAMAGE, 1992, VAN DER KAR, 1991). O tratamento de animais saudáveis com um outro ISRS, a sertralina, aumentou os níveis plasmáticos de AVP e OT (DEMAGALHÃES-NUNES et al., 2007). Estes hormônios são sintetizados em núcleos hipotalâmicos e transportados via axônios para a neurohipófise, sendo liberados para a circulação periférica. Em adição a estes efeitos periféricos eles também atuam como neurotransmissores. Terminais ocitocinérgicos dentro do complexo vagal do núcleo do trato solitário modulam reflexos cardíacos, facilitando a atividade vagal para o coração (HIGA et al., 2002). Estudos com treinamento físico mostram aumentos na expressão de OT em núcleos hipotalâmicos, e sugerem que este aumento seja o responsável pelos efeitos benéficos de um treinamento sobre o sistema cardiovascular (CAVALLERI et al., 2011).

Neste sentido cabe ressaltar que a OT parece estar diretamente envolvida com o sistema cardiovascular. A presença de OT é importante para a liberação de peptídeo natriurético atrial (ANP) pelos átrios. Lesões no hipotálamo e na hipófise bloqueiam a liberação de OT e inibem a liberação de ANP induzida pela expansão de volume isotônico intraatrial (ANTUNES-RODRIGUES et al., 1991). Em concordância, a expansão de volume é acompanhada por aumentos de OT e ANP plasmáticos (HAANWINCKEL et al., 1995). Existem sítios para ligação de OT diretamente sobre átrios e ventrículos e estes receptores

colaboram para a liberação de ANP (GUTKOSWKA et al., 1997). Nosso laboratório está envolvido com um projeto onde estes mediadores serão estudados, mas sabe-se que estes interferem com a função contrátil, o que ainda precisa ser analisado.

Os peptídeos natriuréticos compreendem uma família de peptídeos derivados tanto do coração como vasos e encéfalo que trabalham para a regulação do balanço volêmico em contraposição aos efeitos do sistema renina-angiotensina II-aldosterona (SRAA). Os principais peptídeos são o ANP, o peptídeo cerebral natriurético (BNP) e o peptídeo tipo-C (CNP, D'SOUZA; DAVIS; BAXTER, 2004). O ANP e o BNP estão implicados com ações diretas no coração, já o CNP possui ações mais voltadas à vasculatura (D'SOUZA; DAVIS; BAXTER, 2004). Tanto o ANP quanto o BNP controlam a proliferação de fibroblastos cardíacos e interferem na hipertrofia cardíaca, podendo agir de forma parácrina ou autócrina (JANKOWSKI et al, 1998). Estudos *in vitro* em miócitos ventriculares de rato mostraram que antagonizando a via de transdução do ANP ocorre aumento da síntese de proteínas estimuladas por fenilefrina, entre elas a cadeia pesada β-miosina (HORIO et al., 2000). O estudo das isoformas α-e β- da cadeia pesada da miosina (MHC) merece destaque, pois mudanças na proporção destas parecem afetar a função mecânica do coração (WEISS et al., 1999, MORKIN, 2000). Situações patológicas como avanço da idade, hipotireoidismo e IC aumentam a proporção da expressão de β-MHC e diminuem a da α-MHC (MORKIN, 2000). Uma possibilidade para a melhora na função sistólica determinada pelo tratamento com o ISRS pode ser a mudança na proporção da expressão destas isoformas.

Em adição, além das isoformas acima mencionadas, é imprescindível que as concentrações de cálcio (Ca^{2+}) no sarcoplama, que colaboram nas fases de contração e relaxamento cardíacos, sejam bem reguladas por meio de enzimas acopladas ao ATP. A Ca^{2+}/ATPase do retículo sarcoplasmático, enzima conhecida pelo nome de SERCA, é responsável pela receptação dos íons Ca^{2+} do sarcoplasma para dentro do retículo sarcoplasmático, contribuindo assim para a queda dos níveis de Ca^{2+}no sarcoplasma durante a diástole, condição necessária para o relaxamento muscular. Entre as isoformas desta enzima a SERCA2a merece destaque para o miocárdio, sendo sua atividade regulada pela proteína fosfolambam (PLB) que reduz sua afinidade pelos íons Ca^{2+} (LINDEMANN; WATANABE, 1985). Em condições de hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga de pressão e estágios mais avançados da IC a expressão gênica de SERCA2a está diminuída (MATSUI et al., 1995; MEYER et al., 1995). Em concordância, a inibição do gene PLB aumenta a contratilidade do miocárdio (LUOet al., 1994). Desta forma, seria interessante avaliar se a melhora na função

cardíaca observada em nossos animais poderia decorrer por aumentos na expressão gênica da SERCA2a e/ou diminuição na expressão gênica da PLB.

2. OBJETIVOS

Desta forma, pelo acima exposto, os objetivos do presente projeto foram estudar em ratos com IAo subcrônica e que receberam o tratamento por 4 semanas com um ISRS (paroxetina): a) parâmetros comportamentais de ansiedade através do teste em labirinto em cruz elevado para validar a dose de paroxetina, b) estado de anedonia, e c) a expressão gênica de α- e β-MHC,SERCA2a e PLB no tecido cardíaco.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 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, em ambiente com temperatura controlada (23 ± 2ºC) e ciclo claro-escuro (12-12 h). As ofertas de ração e água foram *ad libitum.* Os procedimentos experimentais estavam de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 Indução da Insuficiênia Aórtica (IAo)

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

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

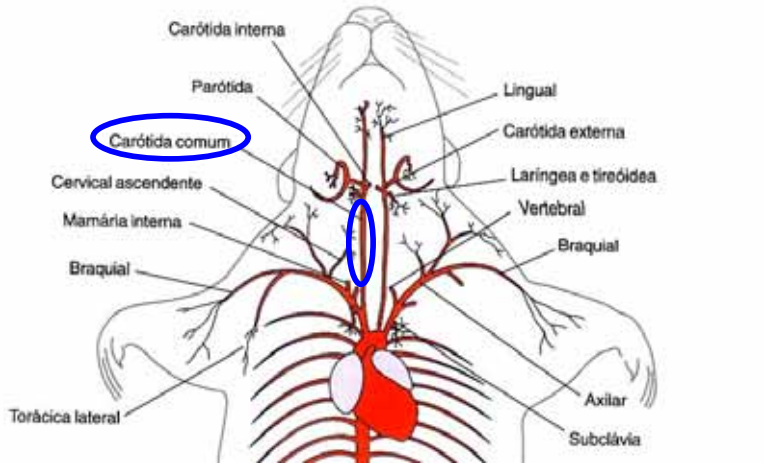


Figura 1. Ilustração do local de dissecação da carótida comum direita e introdução do cateter e fio guia (elipses em azul). Figura modificada do livro: *"Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação",* UNIFESP, Departamento de Psicobiologia, 2004.

3.3 Ecocardiograma (ECO)

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

Animais controles ou com IAo 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. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição para-esternal eixo menor com o cursor do modo-M passando pela valva aórtica. As medidas, em milímetros, do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE), espessura da parede posterior (PP), diâmetro do átrio esquerdo (AE) e diâmetro da aorta (AO) foram realizadas diretamente no monitor, por meio do cursor do próprio equipamento, durante o exame. Três a cinco ciclos consecutivos foram utilizados para a realização das medidas, utilizando-se a média aritmética dessas medidas. As imagens dos registros das câmaras ventriculares, modo M, foram arquivadas para eventuais consultas posteriores. O estudo "in vivo" possibilita avaliação da função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo além de permitir acesso aos indicadores de remodelação cardíaca como massa miocárdica e dimensão das câmaras (SANH et al., 1978).

3.4 Administração do antidepressivo

Iniciamos o tratamento em animais com a IAo subcrônica, ou seja 4 semanas após a indução da sobrecarga. Cloridrato de paroxetina hemihidratado (parox, revendedora PharmaNostra, Rio de Janeiro) foi dissolvida em salina, que serviu de controle, imediatamente antes do uso na dose de 10 mg/kg e foi injetada subcutaneamente três vezes na semana, pelo período de 4 semanas. A paroxetina diluída em água estéril foi colocada em um banho de ultrassom por aproximadamente 10 minutos antes do uso. Para o adequado controle da temperatura ou qualquer outra intercorrência, a salina dos animais controle também foi colocada pelo mesmo tempo no banho de ultrassom. O estudo foi dividido entre 4 grupos experimentais: o grupo de animais com IAo e que foram tratados (IAo + parox), o grupo de animais com IAo e que não foram tratados (IAo + controle), o grupo de animais sem IAo e que foram tratados (controle + parox) e o grupo de animais sem IAo e que não foram tratados (controle + controle).

3.5 Teste comportamental -anedonia - Ingestão de sacarose 2%

O teste de anedonia (ou anedônia) foi baseado na preferência à sacarose em relação à água em cada grupo estudado. Para tanto, foram removidos água e comida por um período de 14h, quando então água e sacarose 2% (solução palatável para os animais) foi retornada para as gaiolas em buretas graduadas para medida do volume ingerido pelo período de 1 hora. Quando as buretas graduadas foram retiradas, foram retornados para as gaiolas a ração e a água. Antes do início do tratamento com paroxetina dois testes de preferência, separados por 5 dias, foram conduzidos, o que gerou uma média da ingestão, utilizada como valor basal. Os outros testes foram realizados uma vez por semana durante o período de tratamento com o ISRS, os valores obtidos nestes testes foram comparados ao valor basal.

3.6 Teste comportamental - ansiedade -Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é um aparato que consiste em dois braços abertos (50x15cm) e dois braços fechados (50x15x40cm) elevados do solo a uma altura referente à espécie utilizada (50 cm para ratos), unidos ortogonalmente por uma plataforma central e apresentando o teto aberto (PELLOW et al., 1985). Os principais índices de ansiedade avaliados no LCE compreendiam medidas espaço-temporais de esquiva dos braços abertos (tempo gasto nos braços), enquanto a atividade locomotora foi avaliada ou pelo número total de entradas nos braços abertos ou pelo número de entradas nos braços fechados (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). Ao final do tratamento com paroxetina, na manhã do dia dos experimentos, às 8:00h, os ratos foram remanejados para o laboratório comportamental do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), unidade adjacente ao nosso biotéro, para a aclimatação dos mesmos. Os testes foram conduzidos no período da tarde entre 13:00 e 16:00h, compreendendo a fase clara do ciclo claro-escuro. Cada animal foi exposto pelo período de 5 minutos no aparato.

3.7 Preparo para a coleta do tecido

Terminado o tratamento, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (50-75 mg/rato) e perfundidos transcardicamente com salina em tampão fosfato 0,1 M (PBS - pH = 7,4, ~ 250 ml) gelada, para limpeza das câmaras cardíacas. Os ventrículos esquerdos foram coletados e armazenados em freezer -80ºC. A quantificação da

expressão de SERCA2a, PLB e α e β-MHC foram realizadas por PCR quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR).

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

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

3.8.1 Extração de RNA total

A extração do ácido ribonucleotídeo (RNA) foi realizada com Trizol (Ambion, EUA) segundo as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNase (Ambion, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico. O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanovue (GE Healthcare, EUA).

3.8.2 Análise da qualidade do RNA

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

A qualidade do RNA foi obtida pelo número da integridade do RNA (RNA IntegrityNumber, RIN), a partir da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microfluídos,

utilizando-se o sistema 2100 Bioanalyzer (Agilent, EUA; FLEIGE, S.; PFAFFL, M.W., 2006).

3.8.3 Reação de Transcrição Reversa (mRNA)

A transcrição reversa dos RNA mensageiros (mRNAs) foi realizada utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Para a reação foram utilizados 4 μL de Master Mix para a transcrição reversa ao qual foi adicionado 1 μg de RNA e o volume completado para 20 μL com água livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 25 °C por 5 min., 42 °C por 30 min. seguido da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min.

3.8.4 PCR quantitativo em Tempo Real

Cada amostra de cDNA foi analisada com ensaios TaqMan (Life Technologies, EUA), contendo primers e sondas de hidrólise específicos para os mRNA, especificados na tabela 1, o primer GAPDH foi utilizado como gene endógeno padrão. Para cada reação, foram utilizados 10 μL de TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X) (Life Technologies, EUA), 4 μL do produto da reação de transcrição reversa e o volume final ajustado para 20 μL com água livre de nucleases. Foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 10 min., seguido por 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 min. As reações foram realizadas no Sistema de PCR em Tempo RealViia7 (Life Technologies, EUA). A análise do perfil de expressão dos mRNAs foi realizada através do método do Cq comparativo utilizando-se o software DataAssist V3.01 fornecido gratuitamente pela empresa de insumos de laboratório Life Tecnhology. Este programa nos fornece o Ct (cicletreshold ou ciclo limiar) de cada amostra analisada. Utilizando-se o Ct é possível calcular quantos ciclos a

mais são necessários para que o gene alvo emita a mesma quantidade de fluorescência correspondente a quantidade de material genético duplicado que o gene de referência ou endógeno. A partir da diferença dos Cts dos genes endógeno e alvo obtemos o ΔCt, parâmetro utilizado nos cálculos aritméticos para atingir um resultado de quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

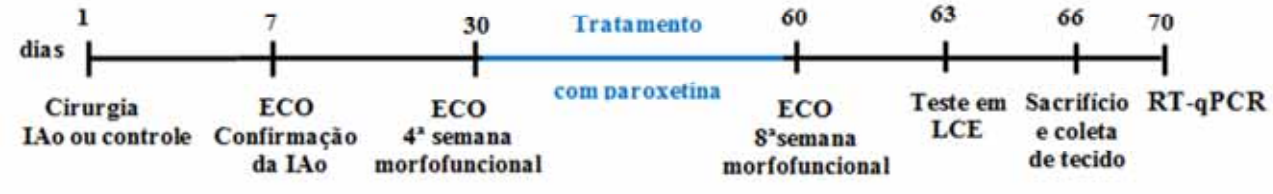
Tabela 1. Sequência dos pares de bases para cada um dos primers, segundo os pontos para a amplicação do cDNA 5' e 3', bem como seu número de referência correspondente.

Gene	*Sequência 5' -3' - sense*	*Sequência 3' -5' - antisense*	*RefSeq*
α-MHC	AGTGACAGGATGACGGATGC	TAGGCGCTCCTTCTCTGACT	NM_017239.2
β-MHC	CTCAGTCATGGCGGATCGAG	CTCCGGATTCTCCGGTGATG	NM_017240.1
SERCA2	TCTGCATGACTGAGCTTGGG	TGTGAGGAACTGAACCGACG	NM_001110139.2
PLB	CGTCAGAACCTCCAGAACCT	ATCGTGACCCTTCACGACGA	NM_022707.1
GAPDH	GCGAGATCCCGCTAACATCA	ATTCGAGAGAAGGGAGGGCT	NM_017008.3

Informaçõesextraídas do: http://goo.gl/rAsc2, AplliedBiosystems by Life Technologies para *Rattusnorvegicus*.

3.9 Desenho experimental

Abaixo temos uma representação esquemática com a linha do tempo e os procedimentos que aplicamos aos animais.



4. RESULTADOS

4.1 Dados dos exames de ECO

Na primeira semana após a indução da IAo sua presença foi confirmada pelo exame de ECO e apenas os animais com refluxo sanguíneo maior que 50% na via de saída do ventrículo esquerdo (VE) para a aorta permaneceram nos grupos, figura 2. Na quarta semana um exame completo de ECO nos forneceu os dados morfofuncionais entre os grupos. Os principais indicadores da função cardíaca utilizados foram a fração de encurtamento, calculada em porcentagem (FE%), e o índice de esfericidade do coração. A FE% indica a capacidade de contração do músculo cardíaco e é calculada pela seguinte fórmula:

FE $(\%) = \frac{DDVE - DSVE}{DDVE} * 100$, onde DDVE é o diâmetro diastólico do VE e DSVE é o diâmetro sistólico do VE.

O índice de esfericidade é calculado pela relação entre o diâmetro menor e o diâmetro maior do ventrículo esquerdo, como ilustrado na figura 3. Quanto maior for esta relação, mais esférico estaria o coração, ou seja, este índice indica o quanto um coração está hipertrofiado.

Utilizamos o teste-t para comparações entre os grupos. Como resultados parciais os ratos na 4ª semana após a cirurgia de IAo apresentaram características semelhantes, a fração de encurtamento (FE%) foi semelhante entre os grupos com IAo (IAo + parox: 44,13 ± 5,74 vs. IAo + controle: 46,50 ± 1,65), p = 0,72. Na tabela 1 temos representados os dados dos animais, e podemos notar que não houve diferenças entre os animais com a IAo em relação ao estágio da doença. Ao final das 4 semanas de tratamento com parox a FE% dos ratos com IAo que foram tratados foi preservada em relação aos animais com IAo que não foram tratados (IAo + parox: 45,67 ± 1,52 vs. IAo + controle: 31,97 ± 3,08), figura 4.

A) **B)**

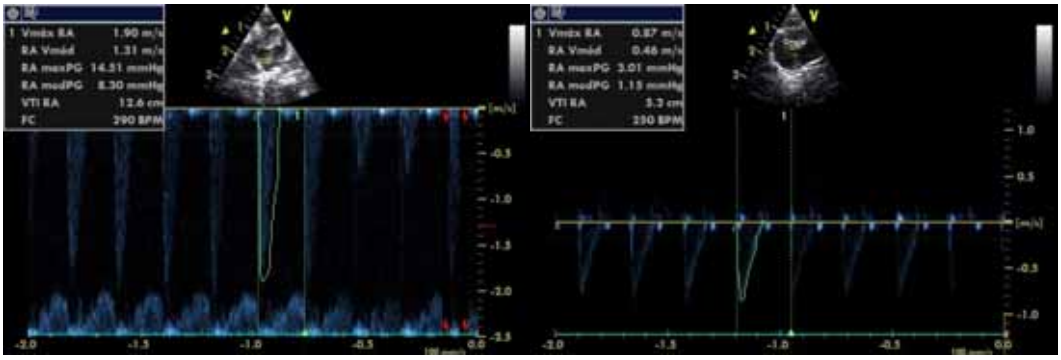


Figura 2. A) Imagem representativa do fluxo sanguíneo regurgitante na via de saída do VE de um dos animais com IAo utilizados no estudo, **B)** Imagem representativa do fluxo sanguíneo de um dos animais controle.

A) **B)**

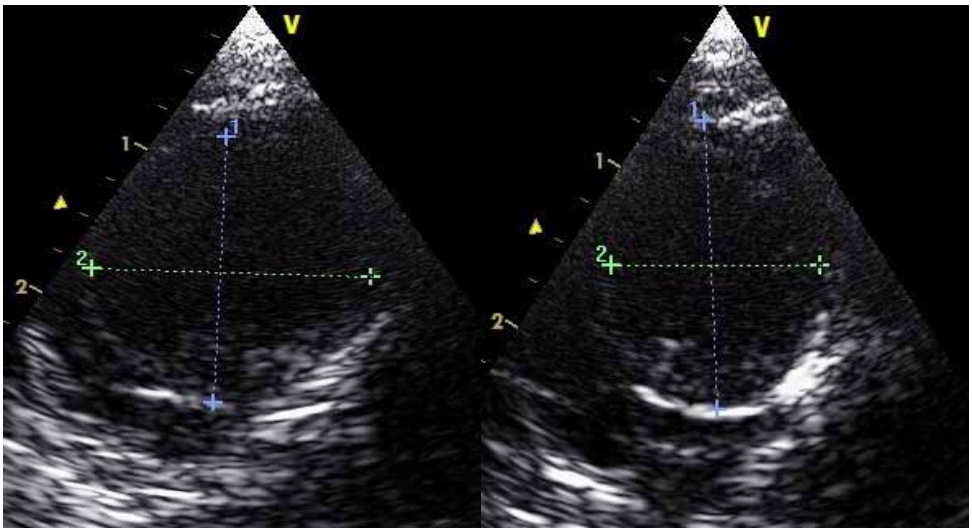


Figura 3. A) Imagem representativa do diâmetro maior em azul e diâmetro menor em verde do VE de um rato com IAo e **B)** Imagem representativa do diâmetro maior em azul e diâmetro menor em verde do VE de um rato controle.

Tabela 1. Dados morfofuncionais do coração após 4 semanas de indução da IAo, antes do tratmento com parox.

Tratamentos	***Fração de encurtamento (%)***	***Índice de esfericidade***
IAo + parox (n = 6)	44,13 ± 5,74	0,83 ± 0,03*
IAo+ controle (n = 5)	46,50 ± 1,65	0,84 ± 0,03*
Controle + parox (n = 8)	54,39 ± 1,71	0,68 ± 0,02
Controle + controle (n = 6)	47,67 ± 3,41	0,64 ± 0,02

Os dados estão expressos como média ± EPM. Teste-t foi utilizado para comparações. Fração de encurtamento = diâmetro diastólico do VE – diâmetro sistólico do VE, índice de esfericidade = eixo maior – eixo menor do coração. IAo + parox vs. IAo + controle, $p = 0,68$; IAo + parox vs. controle + parox, $p = 0,003$; IAo + controle vs. controle + controle, $p < 0,001$.

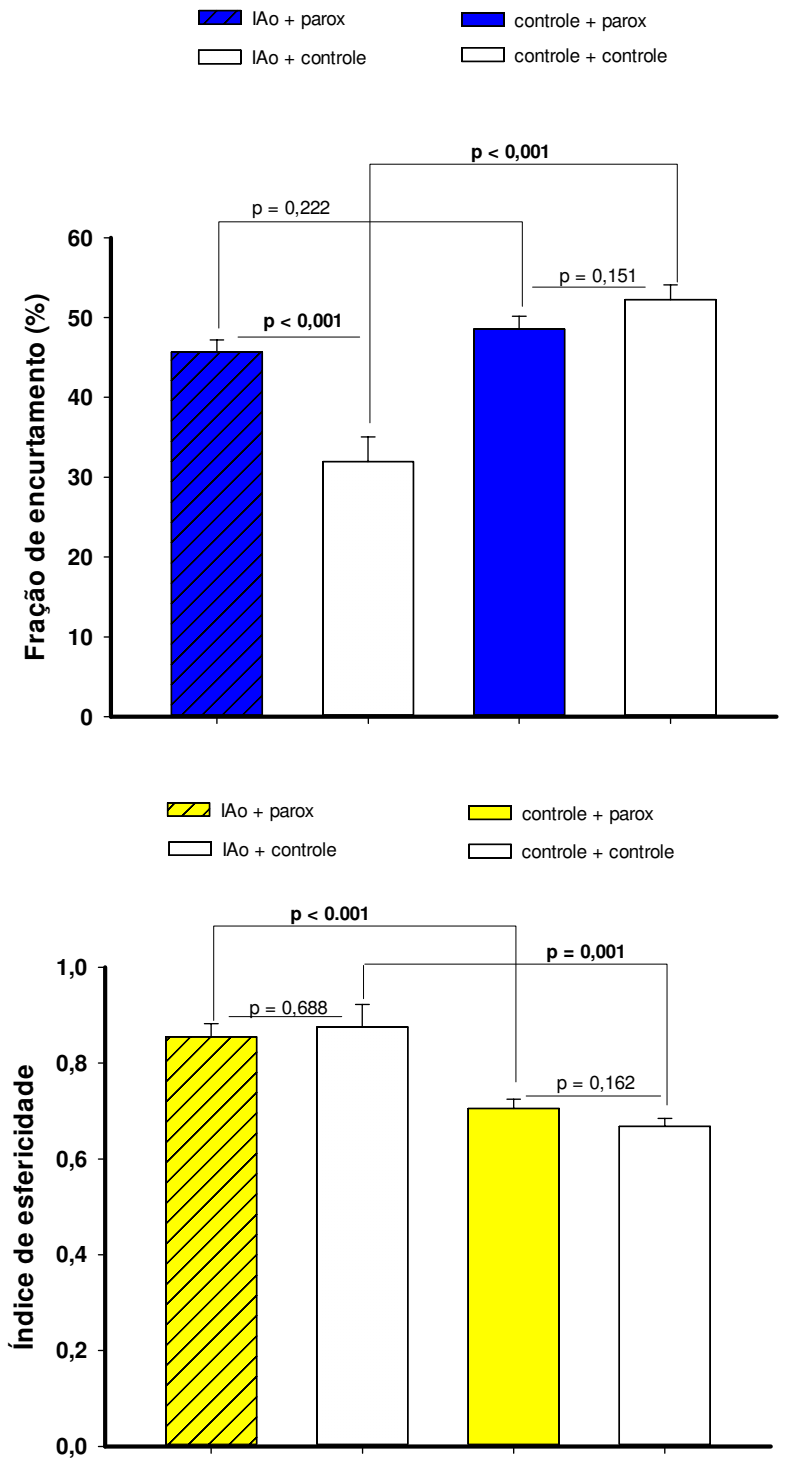


Figura 4. A) Fração de encurtamento (%) e **B)** índice de esfericidade do coração dos ratos com IAo e que receberam ou não parox por 4 semanas, término das 8 semanas pós indução da IAo. Os dados estão expressos como média ± EPM. Teste-t foi utilizado para comparações.

4.2 Teste de anedonia

Os testes de anedonia foram conduzidos semanalmente, da semana 1 antes do início do tratamento até o final do tratamento. A preferência pela sacarose foi comparada com a ingestão de água, de acordo com a fórmula: % de sacarose = ingestão de sacarose/total da ingestão x 100 (GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002). Na figura 5A, estão representados os resultados da porcentagem da ingestão de sacarose 2% e de água de todos os grupos antes e ao final do tratamento. Na figura 5B estão representados a ingestão total de solução de sacarose 2% e de água para cada semana. Não houve diferença significativa na ingestão total semanal entre os grupos em relação à água e à solução de sacarose. Os resultados do primeiro teste foram considerados valores basais da ingestão de sacarose (IAo + parox: 8,56± 1,69; IAo + controle: 10,62 ± 2,76; controle + parox: 7,85 ± 1,61; controle + controle: 7,3 ± 2,02), e foram semelhantes aos do último teste pós tratamento (IAo + parox: 9,56 ± 2,02; IAo + controle: 13,24 ± 4,8; controle + parox: 14,67 ± 2,25; controle + controle: 13,21 ± 3,22).

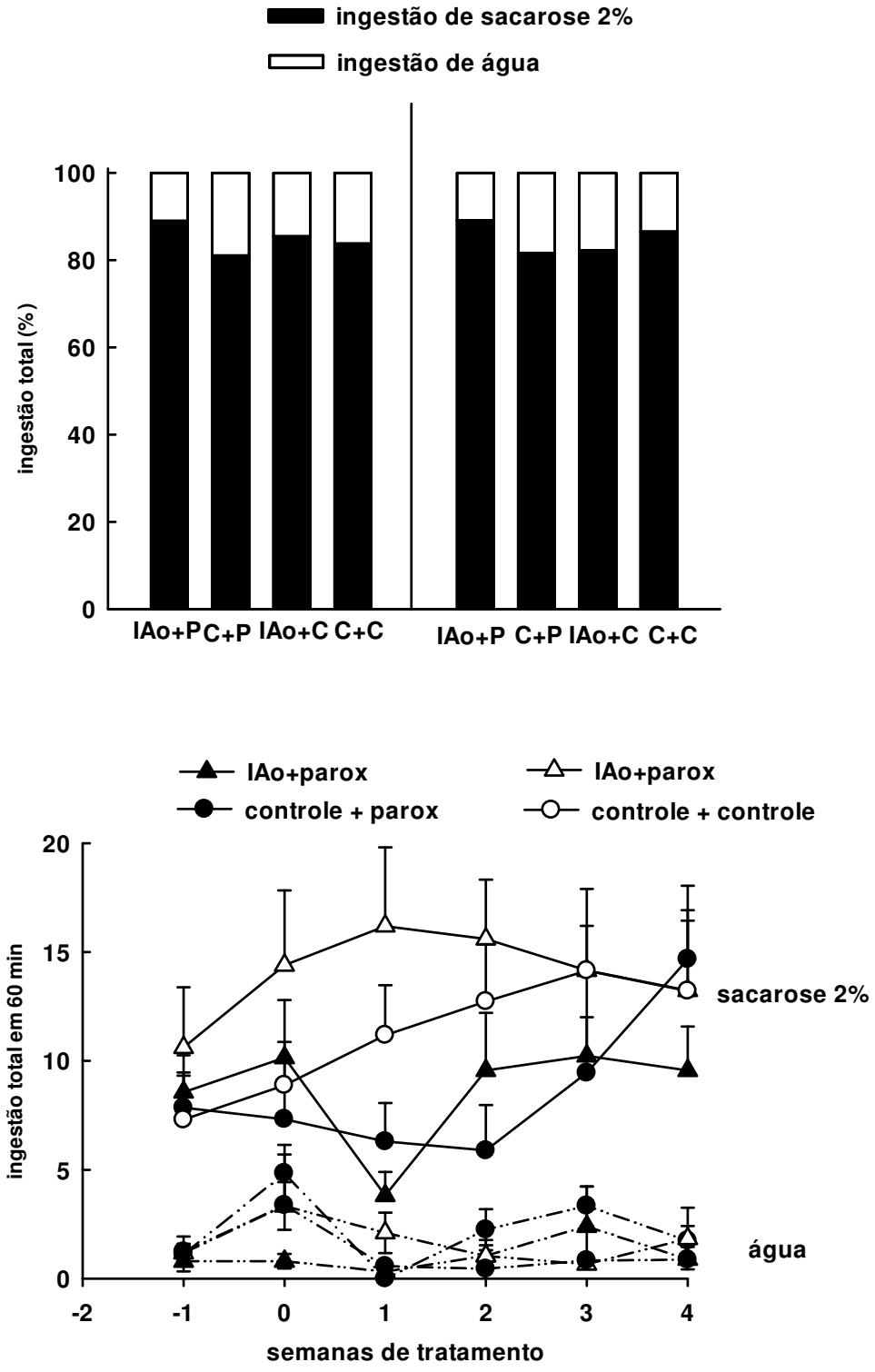


Figura 5. A) Ingestão total (%), **B)** Ingestão total em 60 minutos dos ratos com IAo e que receberam ou não parox por 4 semanas. Os dados estão expressos como porcentagem e média ± EPM. ANOVA uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos para o período basal ($p = 0,90$), ou após o tratamento ($p = 0,57$).

4.3 Teste do LCE

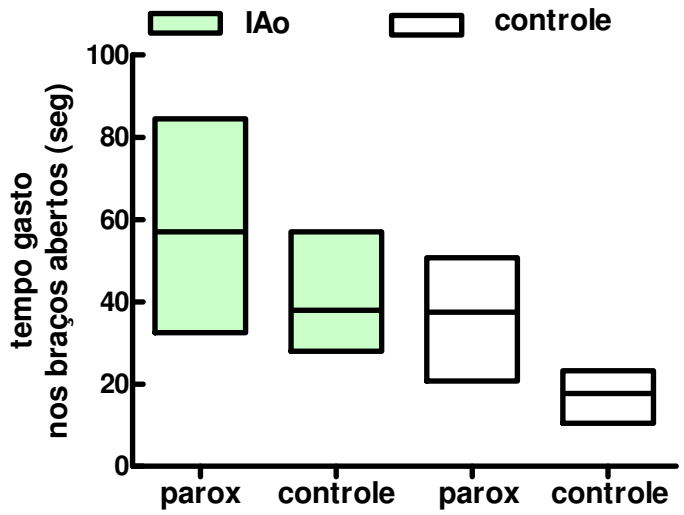
O teste de LCE foi realizado após os testes de anedonia e o último exame de ECO. Os resultados estão expressos como mediana e inter-quartil (25% - 75%) e teste de Kruskal-Wallis, não paramétrico, foi utilizado para comparações. O tempo gasto nos braços aberto do LCE não foi diferente entre os grupos [IAo + parox: 44(24,25-74,5); IAo + controle: 53(25,5-67); controle + parox: 42(36,5-82,25); controle + controle: 26(19,5-86)], (p = 0,953), figura 6A. O tempo gasto nos braços fechados também não foi diferente (p = 0,932), figura 6B. A atividade locomotora foi avaliada pelo número de entradas nos braços abertos (NEBA) e fechados (NEBF), tabela 2. Foi considerada entrada num braço ou saída dele quando o animal se deslocou com as quatro patas para dentro ou fora do braço, figura 7.

Tabela 2. Atividade locomotora dos animais no LCE.

Tratamentos	**NEBA**	**NEBF**
IAo+ parox (n = 12)	2 (1 - 2,25)	4 (1,75 - 6,25)
IAo+ controle (n = 11)	2(2-4,5)	7 (4 - 8)
Controle + parox (n = 14)	3(2- 6)	6 (3,5- 7,75)
Controle + controle (n = 11)	3 (2 - 5)	6 (5,5 - 7,75)

Os dados estão expressos como mediana e inter-quartis (25%-75%). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparações, NEBA: p = 0,431; NEBF: p = 0,569.

A)



B)

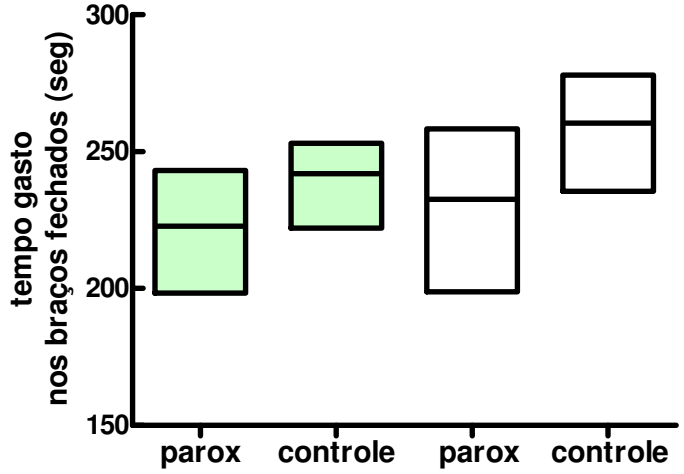


Figura 6. A) Box Plot do tempo gasto nos braços abertos, p = 0,953, **B)** Box Plot do tempo gasto nos braços fechados dos ratos com IAo e que receberam ou não parox por 4 semanas, p = 0,932. Os dados estão expressos como mediana e inter-quartis (25%-75%). Teste de Kruskal-Wallis foi feito para comparações.

A) **B)**

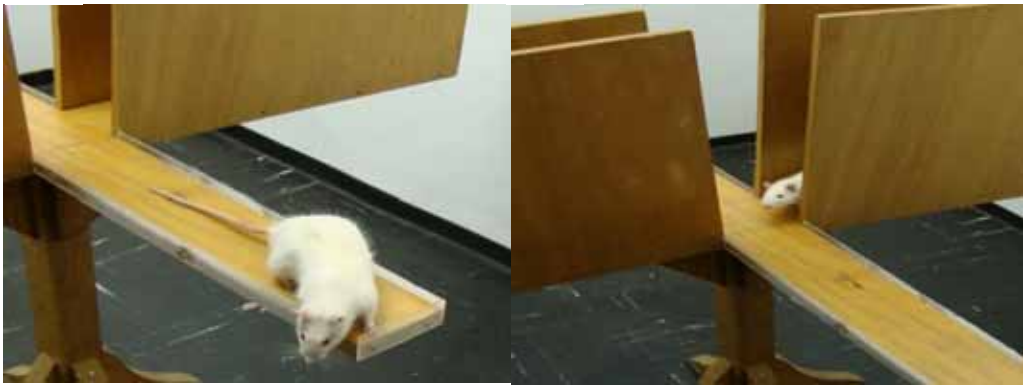


Figura 7. A) Imagem representativa de um dos animais no braço aberto, e **B)** no braço fechado.

4.4 Coleta do tecido

Após o sacrifício e a limpeza das câmaras cardíacas por perfusão transcardíaca foram coletados os corações dos animais, e as câmeras cardíacas separadas em átrio, ventrículo direito e ventrículo esquerdo, figura 8. O peso corporal dos animais foi semelhante entre os grupos. Os pesos dos átrios foram semelhantes também entre os grupos (IAo + parox vs. Controle + parox, p = 0,47; e IAo + controle vs. Controle + controle, p = 0,16). Na tabela 3 estão representados os dados dos grupos.

Tabela 3. Peso dos animais, dos átrios e dos ventrículos dos corações coletados.

Grupo	Peso (g)	Átrio/100g pc	VD/100g pc	VE/100g pc
IAo + parox (n = 6)	431,8± 16,5	0,033 ±0,004	0,092± 0,005*	0,291± 0,014*
IAo + controle (n = 5)	415,2 ± 25,1	0,033 ± 0,002	0,093± 0,010*	0,319± 0,024*
Controle + parox (n = 8)	435± 19,8	0,028± 0,003	0,071 ± 0,005	0,195± 0,005
Controle + controle (n = 6)	446,5± 18,12	0,028± 0,002	0,068± 0,005	0,196 ± 0,007

Os dados estão expressos como média ± EPM. Teste-t foi utilizado para comparações. VD: IAo + parox vs. Controle + parox, $p = 0,015$, IAo + controle vs. controle + controle, $p = 0,015$; e VE: IAo + parox vs. Controle + parox, $p = 0,004$, IAo + controle vs. controle + controle, $p < 0,001$.

A) **B)**



Figura 8. A) À esquerda, coração hipertrofiado do animal com IAo; à direita coração normal do animal controle. **B)** Corte e separação dos ventrículos direito e esquerdo para pesagem e coleta de amostra para a análise do RT- qPCR.

4.5 Expressão gênica da SERCA2a e PLB

Após extração do RNA total avaliamos a expressão gênica relativa da bomba SERCA2a e da proteína PLB. Todos os grupos expressaram a SERCA2a e a PLB em níveis semelhantes (IAo + parox: 1,59 ± 0,698 vs. IAo + controle: 1,75 ± 0,322 vs. controle + parox: 2,48 ± 0,371 vs. controle + controle: 2,66 ± 0,487 unidades arbitrárias) as diferenças não foram significativas (p = 0,091). A expressão gênica da PLB também foi semelhante entre os grupos (IAo + parox: 1,44 ± 0,313; IAo + controle: 1,89 ± 0,175; controle + parox: 2,12 ± 0,29; controle + controle: 2,35 ± 0,48 unidades arbitrárias; p = 0,07). Também não houve diferença significativa entre os grupos na proporção de SERCA2a/PLB (IAo + parox: 1,075 ± 0,101; IAo + controle: 1,171 ± 0,082; controle + parox: 1,131 ± 0,087; controle + controle: 1,112 ± 0,138 unidades arbitrárias; p =0,869). A figura 9 mostra os resultados obtidos.

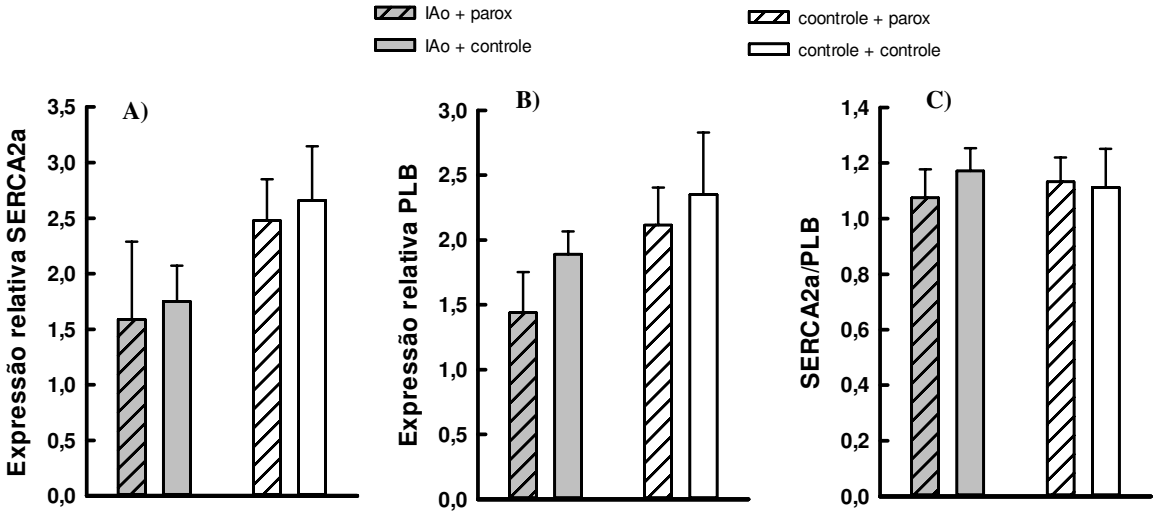


Figura 9. A) Expressão gênica relativa da SERCA2a, p = 0,091. **B)** Expressão gênica relativa da PLB, p = 0,07. **C)** Relação da expressão SERCA2a/PLB, p = 0,869, One-way ANOVA e teste-t foi utilizado para comparações.

4.6 Expressão gênica da α e β-miosina

Não houve diferença significativa entre os animais com IAo, que receberam ou não o tratamento com paroxetina, em relação à expressão gênica relativa da α-MHC (IAo + parox: 1,485 ± 0,173 vs. IAo + controle: 1,4 ± 0,094 unidades arbitrárias) ou da β-MHC (IAo + parox: 3,44 ± 0,589 vs. IAo+ controle: 4,585 ± 0,461 unidades arbitrárias). Porém a relação α/β-MHC foi reduzida no grupo IAo que não recebeu paroxetina (IAo + parox: 0,44 ± 0,07 vs. IAo + controle: 0,27 ± 0,06 unidades arbitrárias, p = 0,018).A figura 10 mostra os resultados obtidos.

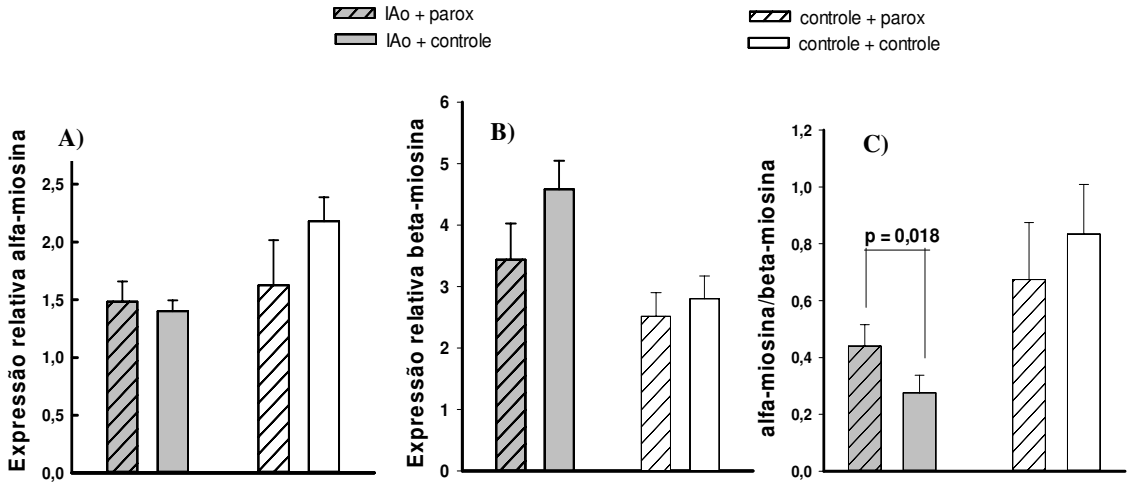


Figura 10. A) Expressão gênica relativa da α-miosina, **B)** Expressão gênica relativa da β-miosina, e **C)** Relação da expressão gênica relativa α/β-miosina. One-way ANOVA e teste-t foram utilizados para comparações.

5. DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a IAo não produziu estado de anedonia nos animais nem determinou comportamento ansiogênico, visto pelo LCE. Em adição, o tratamento com o antidepressivo não modificou os parâmetros estudados nestas condições. A paroxetina foi capaz de preservar a função sistólica dos animais com IAo em comparação aos que não receberam a droga.

A anedonia é definida como perda de interesse ou prazer ao realizar tarefas consideradas prazerosas e agradáveis, apontada como um componente essencial na depressão humana (GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002; GORWOOD, 2008). Associação entre anedonia e serotonina já foi estabelecida, sendo que diminuições na expressão de transportadores de serotonina na região hipocampal estão associadas à presença de anedonia (TANG et al., 2013). Em adição, a anedonia determina mudanças morfológicas no núcleo acumbens, região associada ao processamento de recompensas, que são revertidas pelo uso de imipramina ou fluoxetina (BESSA et al., 2013). Nossos testes foram conduzidos desde a terceira semana após a indução da IAo até ao final do tratamento com paroxetina, ou seja por 5 semanas, sendo que não houve diferenças entre o consumo da solução de sacarose. Assim, nossos dados indicam que a IAo não determina anedonia, e o tratamento com paroxetina também não altera, nem para mais ou para menos, esta condição.

O LCE é um instrumento consagrado para estudos de ansiedade em roedores. Pesquisar se um antidepressivo poderia alterar ansiedade está relacionado ao fato que aumentos de serotonina centrais colaboram para reduzir estados de ansiedade (GRAEF; ZANGROSSI, 2010). Nossos resultados mostraram que o tratamento com o antidepressivo não modificou parâmetros de ansiedade. Desta forma, a preservação da função sistólica em nossos estudos não decorreu de menor grau de ansiedade entre os grupos IAo com ou sem paroxetina. Outros fatores estão envolvidos neste efeito que não uma via direta entre a ameaça e o sistema cardiovascular. Doenças cardíacas estão correlacionadas com depressão e ansiedade (GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002; GRIPPO; JOHNSON, 2009; PENNINX et al., 2001), e animais com infarto do miocárdio apresentam ansiedade elevada (PRICKAERTS; RAAIJMAKERS; BLOKLAND, 1996). Para este modelo de IAo não existem dados na literatura sobre o aspecto de ansiedade ou de anedonia, porém os dados presentes indicam que a IAo não determina um estado ansiogênico ou perda de interesse. Clinicamente os pacientes com IAo apresentam-se assintomáticos por longos anos (BONOW et al., 1998, MAGANTI et al., 2010, TARASSOUTCHI et al., 2003), o que reforça que tal

comprometimento cardíaco não determine sintomatologia inclusive de um transtorno correlacionada à doença cardíaca, tal como a depressão. Desta forma, o tratamento com paroxetina em ratos com IAo foi capaz de preservar a função sistólica independente de aspectos centrais relacionados à ansiedade ou anedonia.

Um aspecto interessante diretamente envolvido com a função sistólica é a expressão gênica de proteínas envolvidas nos mecanismos de contratilidade. As concentrações de Ca^{2+} do sarcoplasma devem ser precisamente reguladas para assegurar uma ótima contração (sístole) e relaxamento (diástole) do miocárdio. A atividade da enzima SERCA ($Ca^{2+/}$ATPase do retículo sarcoplasmático) é responsável por recaptar o Ca^{2+} do sarcoplasma para o retículo sarcoplamático, cessando a contração, favorecendo o relaxamento do miocárdio. Sua atividade é regulada por meio de outra proteína a fosfolambam (PLB). Vários estudos mostram que a hipertrofia cardíaca patológica determina redução na expressão da SERCA e aumento na expressão da PLB (MATSUI et al., 1995; MEYER et al., 1995). Nós hipotetizamos que o tratamento com paroxetina poderia interferir nesta relação, porém nossos resultados mostraram que tal tratamento não altera estas proteínas regulatórias do Ca^{2+}. Ou seja, a melhora da função sistólica não é devido a alterações na expressão da SERCA ou da PLB nestas condições. Outros fatores ou outras proteínas devem ser responsáveis.

Outra possibilidade que testamos foi verificar a expressão das isoformas de proteínas diretamente relacionadas ao mecanismo contrátil, como a miosina. O coração dos mamíferos expressa duas principais isoformas da miosina: α-MHC e β-MHC que diferem entre si pela velocidade de hidrólise do ATP, sendo a isoforma α- de alta velocidade de hidrólise e a isoforma β- de baixa velocidade. A proporção destas isoformas é variável dependendo das condições hormonais ou de pressão a que o coração é submetido (MORKIN, 2000; WEISS et al., 1999). Mudanças nas proporções destas isoformas são dinâmicas dependendo das condições a que o coração é exposto, sendo que em doenças cardíacas existe uma redução na proporção α-/β-MHC, evidenciando a diminuição da eficiência do mecanismo de contração (BÁRÁNY, 1967; WEISS et al, 1999, SWYNGHEDAUW, 1986) Nossos resultados mostraram que o tratamento com paroxetina aumentou a proporção α-/β-MHC o que provavelmente refletiu a preservação da fração de encurtamento destes animais. Desta forma, o tratamento com paroxetina favorece a preservação do mecanismo contrátil do coração. Não podemos explicar o exato mecanismo deste aumento na proporção α-/β-MHC. Porém, uma das nossas hipóteses, que pretendemos continuar estudando, é que a paroxetina possa diminuir a atividade do sistema nervoso simpático para o coração, contribuindo para uma menor ativação de receptores adrenérgicos sobre o coração, o que colaboraria para

preservar a isoforma α-MHC em relação à β-MHC. Na literatura encontramos alguns estudos mostrando que o aumento de catecolaminas circulantes favorece aumentos da isoforma β-MHC (WASPE; ORDAHL; SIMPSON, 1990).

Em conclusão, nossos resultados mostraram que o tratamento de ratos com IAo com um antidepressivo ISRS, a paroxetina, não alterou parâmetros relacionados à ansiedade ou a expressão das proteínas regulatórias do Ca^{2+} (SERCA2a ou PBL). Por outro lado, o tratamento com paroxetina em ratos com IAo subcrônica favoreceu aumento na proporção das isoformas α-/β-MHC o que pode ser responsável por preservar a fração de encurtamento do coração destes animais nestas condições.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANJA, B.; VLAJINAC, H.; JAREBINSKI, M. **Socioeconomic factors in the etiology of rheumatic fever.** J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol., 32:329-35, 1988.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. **Lesions of the hypothalamus and pituitary inhibit volume expansion-induced release of atrial natriuretic peptide (ANP).** Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88, 2956–2960, 1991.

ALBANESI FILHO, F.M. **What is the current scenario for heart failure in Brazil?** Arq Bras Cardiol., 85(3):155-6, 2005.

ANDERSON, I.K.; MARTIN, G.R.; RAMAGE, A.G. **Central administration of 5-HT activates 5-HT1A receptors to cause sympathoexcitation and 5-HT2/5-HT1C receptors to release vasopressin in anaesthetized rats.** Br J Pharmacol., 107: 1020–1028, 1992.

ARSENAULT, M. et al**. Experimental aortic regurgitation in rats under echocardiographic guidance.** J Heart Valve Dis., 11(1):128-34, 2002.

BÁRÁNY, M. **ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening.** J Gen Physiol., 50, Suppl:197–218, 1967.

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 Disease).** Circ., 98(18):1949-84, Nov. 1998.

BORER, J.S. et al. **Prediction of indications for valve replacement among asymptomatic or minimally symptomatic patients with chronic aortic regurgitation and normal left ventricular performance.** Circ., 97:525–534, 1998.

BESSA, J.M. et al. **Stress-induced anhedonia is associated with hypertrophy of medium spiny neurons of the nucleus accumbens.** Transl Psychiatry., 4;3:e266, 2013.

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

BUSTIN, S.A. et al. **The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.** Clin Chem., 55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797. Epub, Feb. 2009.

CARAPETIS, J.R. et al. **The global burden of group A streptococcal diseases.** The Lancet Infectious Diseases (Vol. 5, Issue 11, Pages 685-694) DOI: 10.1016/S1473-3099 (05) 70267-X, 2005.

CAVALLERI, M.T. et al. **Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., 301(4):R958-66, 2011.

CRUZ, A.P.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. **Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze.** Pharmacol Biochem Behav., 49(1):171-6, 1994.

D'SOUZA, S.P.; DAVIS, M.; BAXTER, G.F. **Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart.** Pharmacol Ther., 101(2):113-29, 2004.

GORWOOD, P. **Neurobiological mechanisms of anhedonia.** Dialogues Clin Neurosci., 10: 291–299, 2008.

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

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H.J. **The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders.** Cent Nerv Syst Agents Med Chem., 1;10(3):207-17, 2010.

GRIPPO, A.J.; MOFFITT, J.A.; JOHNSON, A.K. **Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., 282(5):R1333-41, 2002.

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.** Stress 12: 1-21, 2009.

GROSSMAN, W.; JONES, D.; MCLAURIN, LP. **Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle.** J Clin Invest., 56(1): 56–64, 1975.

GUILHERME, L.; KALIL, J. **Rheumatic heart disease: molecules involved in valve tissue inflammation leading to the autoimmune process and anti-S. pyogenes vaccine.** Frontiers in Immunology, doi: 10.3389/fimmu.2013.00352, Oct., 2013.

GUILHERME, L.; RAMASAWMY, R.; KALIL, J. **Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease: Genetics and Pathogenesis.** Scandinavian Journal of Immunology, 66, 199–207 doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.01974.x, 2007.

GUTKOWSKA, J. et al. **Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart.** Proc Natl Acad Sci., U S A; v. 94.p.11704-9, 1997.

HAANWINCKEL, M.A. et al. **Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat.** Proc Natl Acad Sci., USA 92, 7902–7906, 1995.

HE, W. et al. U.S. Census Bureau, Current Population Reports, P23-209, **65+ in the United States: 2005**. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 2005.

HENZE, M. et al. **Persistent alterations in heart rate variability, baroreflex sensitivity, and anxiety-like behaviors during development of heart failure in the rat.** Am J Physiol Heart Circ Physiol., 295(1):H29-38, 2008.

HIGA, K.T. et al. **Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex**. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., 282(2):R537-45, 2002.

HOGG, S. **A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety.** Pharmacol Biochem Behav., 54(1):21-30, 1996.

HORIO, T. et al. **Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes.** Hypertension; v. 35.p.19–24, 2000.

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais. Gerência de Estudos e Análises da Dinâmica Demográfica. **Projeção da população do Brasil por sexo e idade para o período 2000-2060**. 2013a. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2013/default.shtm> Acesso em: 23 de outubro de 2013.

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais. **Projeção da População do Brasil e Unidades da Federação por Sexo e Idade para o período 2000-2030**. 2013b. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=sp&tema=projecao2013> Acesso em: 23 de outubro de 2013.

IUNG, B. et al. **A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease.** European Heart Journal, 24, 1231–1243, 2003.

JANKOWSKI, M. et al. **Rat heart: a site of oxytocin production and action.** Proc Natl Acad Sci., USA; v. 95. p.14558-63, 1998.

LINDEMANN, J.P.; WATANABE, A.M. **Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca21-calmodulin-dependent mechanisms.** J Biol Chem. 260:4515–4526, 1985.

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

LUO, W. et al. **Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of b-agonist stimulation.** Circ Res., 75:401–409, 1994.

DE MAGALHÃES-NUNES, A.P. et al. **Sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, affects thirst, salt appetite and plasma levels of oxytocin and vasopressin in rats.** Exp Physiol., 92(5):913-22, 2007.

MAGANTI, K. et al. **Valvular heart disease: diagnosis and management.** Mayo Clin Proc., 85(5):483-500, 2010.

MATSUI, H. et al. **Sarcoplasmic reticulum gene expression in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in rabbit.** Am J Physiol., 268:C252–C258, 1995.

MEIRA, Z.M.A. et al. **Prevalence of rheumatic fever in children from a public high school in Belo Horizonte.** Arq Bras Cardiol., Oct; 65 (4): 331-4, 2005.

MEYER, M. et al. **Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy.** Circ., 92:778–784, 1995.

MORKIN, E. **Control of cardiac myosin heavy chain gene expression.** Microsc Res Tech., 50:522–531, 2000.

MULLER-TASCH, T. et al. **Panic disorder in patients with chronic heart failure.** J Psychosom Res., 64: 299–303, 2008.

LEBOWITZ, N.E. et al. **Prevalence and Correlates of Aortic Regurgitation in American Indians: The Strong Heart Study.** Journal of the American College of Cardiology, ISSN 0735-1097 Vol. 36, No. 2, 2000.

NKOMO, V.T. et al. **Burden of valvular heart diseases: a population-based study.** Lancet vol 368: 1005–11, 2006.

OKELLO, E. et al. **Socioeconomic and Environmental Risk Factors among Rheumatic Heart Disease Patients in Uganda.** PLoS ONE 7(8): e43917. doi:10.1371/journal.pone.0043917, 2012.

OLSON, L.J.; SUBRAMANIAN, R.; EDWARDS, W.D. **Surgical pathology of pure aortic insufficiency: a study of 225 cases.** Mayo Clin Proc., 59: 835–841, 1984.

PELLOW, S. et al. **Validation of open:closed arms in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.** J Neurosci Methods, 14:149-167; 1985.

PENNINX, B.W. et al. **Depression and cardiac mortality: results from a community-based longitudinal study.** Arch Gen Psychiatry, 58(3):221-7, Mar.2001.

PLANTE, E. et al. **Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents volume overload cardiomyopathy in experimental chronic aortic valve regurgitation**. Can J Physiol Pharmacol., 82(3):191-9, 2004a.

PLANTE, E. et al. **Effectiveness of beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation.** Circ., 110(11):1477-83, 2004b.

PRICKAERTS, J.; RAAIJMAKERS, W.; BLOKLAND, A. **Effects of myocardial infarction and captopril therapy on anxiety-related behaviors in the rat.** Physiol Behav., 60(1):43-50, 1996.

RAMASAWMY, R. et al. **Association of polymorphisms within the promoter region of the tumor necrosis factor with clinical outcomes of rheumatic fever.** Molecular Immunology, 44, 1873–1878, 2007.

RIAZ, B.K. et al. **Risk factors of rheumatic heart disease in Bangladesh: a case-control study.** J Health Popul Nutr.; 31(1):70-77, Mar., 2013.

SANH, D.J. et al. **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: 1072-83,1978.

STAHL, S.M. **Psicofarmacologia dos antidepressivos**. s.l. : Martin Dunitz,. 114p, 1997

SINGH, J.P. et al. **Prevalence and clinical determinants of mitral, tricuspid, and aortic regurgitation (the Framingham Heart Study).** American Journal of Cardiology, Volume 83, Issue 6, pages 897-902, 1999.

SWYNGHEDAUW, B. **Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles.** Physiol. Rev., 66, 710–71, 1986.

TANG, M. et al. **Stress-induced anhedonia correlates with lower hippocampal serotonin transporter protein expression.** Brain Res., 4;1513:127-34, 2013.

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(8):1316-24, 2003.

TREIT, D.; Menard, J. ; Royan, C. **Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze.** Pharmacol Biochem; Behav., 44(2):463-9, 1993.

TUCKER, P. et al. **Paroxetine increases heart rate variability in panic disorder.** J Clin Psychopharmacol., 17(5):370-6, 1997.

VAN DE KAR, L.D. **Neuroendocrine pharmacology of serotonergic (5-HT) neurons.** Annu Rev Pharmacol Toxicol., 31: 289–320, 1991.

VAN DER KOOY, K. et al. **Depression and the risk for cardiovascular diseases: systematic review and meta-analysis.** Int J Geriatr Psychiatry.; 22(7):613-26, 2007.

WASPE, L.E.; ORDAHL, C.P.; SIMPSON, P.C. **The cardiac beta-myosin heavy chain isogene is induced selectively in alpha 1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes.** J Clin Invest.; 85(4):1206-14, 1990.

WEISS, A. et al. **Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved.** Proc Natl Acad Sci., USA., 96(6):2958-63, 1999.

WHO. **Rheumatic fever and rheumatic heart disease: report of a WHO expert consultation on rheumatic fever and rheumatic heart disease.** World Health Organization. Geneva, 2001.

WHO. **World Health Statistics 2013**.World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2013_Full.pdf> Acesso em: 22 de outubro de 2013. ISBN 978 92 4 156458 8, 2013.