

UFRRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO PROGRAMA
MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO

**Infarto do Miocárdio como Modelo
de Depressão em Ratos: Estudo
Seriado.**

Rafael Sonoda Côrtes

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**INFARTO DO MIOCÁRDIO COMO MODELO
DE DEPRESSÃO EM RATOS: ESTUDO
SERIADO.**

Rafael Sonoda Côrtes

Sob a Orientação do Professor

Emerson Lopes Olivares

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas com área de concentração em Fisiologia.

Seropédica, RJ

Março de 2012

616.123

C828i

T

Côrtes, Rafael Sonoda, 1986-

Infarto do miocárdio como modelo de depressão em ratos: estudo seriado / Rafael Sonoda Côrtes - 2012.

82 f.: il.

Orientador: Emerson Lopes Olivares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Bibliografia: f. 69-82.

1. Infarto do miocárdio - Teses. 2. Infarto do miocárdio - Tratamento - Teses. 3. Depressão mental - Teses. 4. Depressão mental - Tratamento - Teses 5. Serotonina - Teses. 6. Fluoxetina - Teses. 7. Experiência com animais - Teses. I. Olivares, Emerson Lopes, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

RAFAEL SONODA CÔRTEZ

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração em Fisiologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 21/03/2012



Assinatura

Emerson Lopes Olivares (DSc).UFRRJ
(Orientador)



Assinatura

José Hamilton Matheus Nascimento. (DSc.). UFRJ



Assinatura

Fábio Fagundes da Rocha (DSc.)UFRRJ

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai **Marcos Roberto Côrtes** e minha mãe **Heloísa Helena Sonoda Côrtes**, por todo o carinho e a nítida dedicação que tiveram comigo, e por me darem todo o apoio necessário para seguir meus sonhos. Vocês são meus exemplos de vida. Obrigado por tudo! Amo muito vocês!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande “mestre” EMERSON LOPES OLIVARES, por ter me aceitado como seu orientado, há 6 anos atrás, e por todos os ensinamentos dados durante todo esse tempo. Por ter me despertado todo o senso crítico científico, pela grande amizade e pela dedicação ao seu trabalho, que me fez despertar interesse cada vez maior pela área acadêmica.

A SBFis, por ter criado o programa multicêntrico, me dando a oportunidade de fazer o mestrado na área que eu mais gosto e no lugar que eu mais amo.

A UFRRJ, por ter ajudado e continuar ajudando a construir o que sou hoje, durante todo o período de graduação e pós-graduação.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas, por me dar todo o conforto e suporte para realização dos experimentos.

Ao CLAUDINHO PIT e ao ANDERSON, por todo o auxílio nos experimentos e pelos grandes amigos que são. Sem os dois eu não faria nada no laboratório. Obrigado Cláudio, pelo companheirismo desde o nosso início no DCF e pela disposição em ajudar sempre e obrigado Anderson, pela disposição, pelo bom humor diário e pelas piadas, descontraindo o ambiente e tornando o nosso trabalho cada vez mais agradável. Tamo junto!!!

A todos os companheiros e colegas de laboratório, ROBERTINHO, BRÍCIA, NAYANA, MARISSA, JORGE, LÍGIA, RAQUEL TEIXEIRA, RAQUEL NASCIMENTO, FERNANDO, RODRIGO, MONALISA, RENATA, VERÔNICA, LUCAS, IVAÍ, GUILHERME, PATRÍCIA e CAROL, por eventuais auxílios no laboratório e pela amizade. O DCF não ia ser o mesmo sem essa equipe! Não

posso esquecer a CEMA, que teve participação importantíssima no início da minha vida no laboratório!

Aos queridos professores LUÍS, ALBA, WELLINGTON, MAGDA, BRUNO, FÁBIO e FRED, por fazerem tudo acontecer no laboratório, pelo carinho e por todos os ensinamentos científicos.

Aos funcionários representados pelo FRANKLIN, VICENTE, MARIA RITA, SEU NEI, JUCA E DONA LENI, por sempre ajudarem na hora que necessitei.

Aos grandes amigos da República Birigui, BERNARDO, HUGO, MARCELO, MAYRA, MARTA e PRISCILA, por sempre me apoiarem nos momentos de desânimo, fazendo com que eu fosse trabalhar sempre com sorriso no rosto.

Aos meus grandes irmãos boladões FÁBIO, ERICK, DANIEL, PEDRO “ALDEBARAN”, JOÃO, RAFAEL, VINÍCIUS, BRUNO, DARIO e “BIFÃO”, pelos mais de dez anos da nossa família. Vocês sempre apoiaram seu irmão durante todo esse período longe. Nossas conversas me faziam sentir mais perto de casa, e me davam forças cada vez maiores de seguir esse longo caminho.

A GUÍNEVER, que fez e me ensinou toda a parte molecular do experimento. Obrigado por tudo Gui!

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos animais do laboratório, que merecem o maior respeito, pois cederam suas vidas para gerar todo conhecimento científico e permitir a realização de todos os protocolos.

A toda a minha família, que nunca deixou de me apoiar nas minhas decisões, e que me manteve sempre de cabeça erguida diante das dificuldades de trabalho.

A DEUS, que me permite viver e fazer todos os meus sonhos acontecerem. Muito obrigado pela força, proteção, saúde e humildade durante todo esse caminho.

RESUMO

SONODA-CÔRTEZ, Rafael. **Infarto do Miocárdio como modelo de depressão em ratos: Estudo seriado**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

As doenças cardiovasculares, especialmente o infarto do miocárdio (IM), representam um dos principais desafios para medicina no mundo inteiro. Estudos recentes mostram que os pacientes que apresentam algum tipo de doença cardiovascular possuem maiores chances de desenvolverem depressão. Por outro lado, indivíduos saudáveis do ponto de vista cardiovascular, mas que desenvolveram depressão são mais suscetíveis a eventos cardíacos. Assim, considerando a falta de estudos experimentais e a relação bidirecional entre o IM e a depressão, estudamos o possível efeito da insuficiência cardíaca (IC) induzida pelo IM experimental por meio da oclusão permanente da artéria coronária esquerda no comportamento padrão de ratos Wistar. Para tanto, foram utilizados o Teste do Campo Aberto (TCA), o Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e o Teste da Preferência pela Sacarose (TPS), para identificar possíveis sinais análogos à depressão e também à ansiedade de humanos, 3, 14, 35 e 63 dias após o IM. Para avaliar a influência do desequilíbrio autonômico cardíaco induzido pelo IM nas alterações comportamentais, foi realizado o estudo da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), nos mesmos dias. Finalmente, objetivando estudar a contribuição de possíveis alterações da transmissão serotoninérgica nas alterações comportamentais e autonômicas, foi administrada fluoxetina (inibidor da recaptação de serotonina, 10 mg/kg) ou veículo, ambos por gavagem, em grupos infartados e sham, durante todo o protocolo. A expressão gênica de uma das enzimas precursoras da serotonina, triptofano hidroxilase tipo 2 (TPH2), também foi estudada por PCR em tempo real em todos os grupos. O grupo infartado mostrou sinais de depressão como diminuição da atividade exploratória e anedonia, que foram quase completamente inibidas pela fluoxetina. O grupo infartado mostrou alteração no tônus simpático cardíaco percebido pelo aumento das ondas de baixa frequência na análise espectral, em relação ao sham. O tratamento com fluoxetina não alterou este parâmetro no grupo infartado. A expressão de TPH2 diminuiu no grupo infartado comparada ao sham e desta vez, o tratamento com fluoxetina normalizou este parâmetro. Baseado nos dados obtidos no presente estudo, concluímos que o IM experimental em ratos induz sinais de depressão, que são revertidos pelo tratamento com fluoxetina e que alterações no balanço autonômico cardíaco antecedem os distúrbios comportamentais, podendo assim, estar relacionado com o início dos sinais de depressão.

Palavras-chave: Infarto do Miocárdio, depressão, serotonina.

ABSTRACT

SONODA-CÔRTEZ, Rafael. **Myocardial Infarction as a model of depression in rats: A time course study**. 2012. Dissertation (Master Science in Physiological Sciences). Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Cardiovascular diseases, especially myocardial infarction, represent a major challenge to medicine in the world. Recent studies show that patients who have some type of cardiovascular disease are more likely to develop depression. Furthermore, the healthy cardiovascular standpoint, but developed depression are more susceptible to cardiac events. Thus, considering the lack of experimental studies and the bidirectional relationship between depression and MI, we studied the possible effect of heart failure- induced experimental MI by permanent occlusion of the left coronary artery in the default behavior of Wistar rats. For this purpose, we used the Open Field Test, the Test of the Elevated Plus Maze and the Test of Preference for Sucrose, to identify possible signs similar to the psychological anxiety and depression in humans, 3, 14, 35 and 63 days after MI. To evaluate the influence of cardiac autonomic imbalance induced by IM in behavioral changes, we performed a study of heart rate variability. Finally, in order to study the contribution of possible changes in serotonergic transmission in the autonomic and behavioral changes, we gave fluoxetine (serotonin reuptake inhibitor, 10 mg / kg) or vehicle, both by gavage in sham and infarcted groups throughout the protocol. The gene expression of an enzyme precursor of serotonin, tryptophan hydroxylase type 2 (TPH2), was also studied in real time PCR in all groups. The infarcted group showed signs of depression such as reduced exploratory activity and anhedonia, which were almost completely inhibited by fluoxetine. The infarcted group showed changes in cardiac sympathetic tone seen by the increase of low frequency waves in the spectral analysis, compared to sham. Treatment with fluoxetine did not alter this parameter in the infarcted group. TPH2 expression decreased in the infarcted compared to sham and this time, fluoxetine treatment normalized this parameter. Based on data obtained in this study, we conclude that the IM in rats induces signs of depression that are reversed by treatment with fluoxetine and that alterations in cardiac autonomic balance preceding behavioral disturbances may be related to the signs of depression.

Key words: Myocardial infarction, depression, serotonin.

Lista de Figuras

Figura 1 – Mecanismo de ação dos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (IRSs).....	17
Figura 2 – Esquema representativo do SNC em corte sagital, com o Núcleo Dorsal da Rafe e importantes conexões.....	18
Figura 3 – Modelos de origem na co-morbidade entre Insuficiência Cardíaca e Depressão.....	20
Figura 4 – Etapas da Análise Espectral.....	22
Figura 5 – Registros eletrocardiográficos de um animal sham ou infartado.....	31
Figura 6 – Prática do Teste de Campo Aberto no DCF.....	32
Figura 7 – Prática do Teste do Labirinto em Cruz Elevado no DCF.....	33
Figura 8 – Curvas seriadas das médias do número de quadrantes percorridos nos testes de campo aberto em todos os grupos.....	43
Figura 9 – Curvas seriadas das médias do número de passagens pelo quadrante central nos testes de campo aberto em todos os grupos.....	44
Figura 10 – Curvas seriadas das médias do tempo de inatividade total nos testes de campo aberto em todos os grupos.....	45
Figura 11 – Curvas seriadas das médias do número de <i>rearings</i> nos testes de campo aberto em todos os grupos.....	46
Figura 12 – Curvas seriadas das médias do número de groomings (A), tempo total de groomings (B) e número de bolos fecais (C) nos testes de campo aberto em todos os grupos.....	47

Figura 13 – Médias do número de <i>rearings</i> realizados no Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	48
Figura 14 – Médias das porcentagens da preferência pela sacarose em cada teste semanal, em todos os grupos.....	49
Figura 15 – Médias das potências de baixa frequência (LF) não normalizadas (A) e normalizadas (B) da análise espectral em todos os grupos, 3 dias pós-cirurgia.....	50
Figura 16 – Médias das potências de baixa frequência (LF) não normalizadas em todos os grupos, 14 dias pós- cirurgia.....	51
Figura 17 – Curva seriada das médias das potências de baixa frequência (LF) não normalizadas em todos os grupos, da primeira (três dias) a última (sessenta e três dias) análise espectral.....	52
Figura 18 – Médias dos pesos relativos dos corações de todos os grupos.....	53
Figura 19 – Média dos pesos relativos dos pulmões de todos os grupos.....	54
Figura 20 – Histopatologia.....	55
Figura 21 - Expressão da TPH2 pelo método de PCR em tempo real, em todos os grupos.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Primers utilizados no PCR em tempo real, para 36B4 e para TPH2.....	38
Tabela 2 – Mortalidade no protocolo experimental em todos os grupos.....	65
Tabela 3 – Médias da evolução do peso semanal, em relação à primeira semana, em todos os grupos.....	65
Tabela 4 – Médias de todos os parâmetros analisados no LCE, em todos os grupos.....	66
Tabela 5 – Médias dos parâmetros analisados na análise espectral realizada três dias pós- cirurgia em todos os grupos.....	66
Tabela 6 – Médias dos parâmetros analisados na análise espectral realizada quatorze dias pós- cirurgia em todos os grupos.....	67
Tabela 7 – Médias dos parâmetros analisados na análise espectral realizada trinta e cinco dias pós- cirurgia em todos os grupos.....	67
Tabela 8 - Médias dos parâmetros analisados na análise espectral realizada sessenta e três dias pós- cirurgia em todos os grupos.....	68

Lista de Siglas

5HIAA	5-hidroxiindolacético
5- HT	Serotonina
ADTs	Antidepressivos Tricíclicos
cDNA	DNA codificador
CIM	Células Intermediolaterais da Medula
CK-MB	Creatinofosfoquinase
CVD	Complexo Vagal Dorsal
CT	<i>Cycle Threshold</i> – Limiar do Ciclo
DA	Dopamina
DM	Depressão Maior
ECG	Eletrocardiograma
ECT	Eletroconvulsoterapia
EMTr	Estimulação Magnética Transcraniana Repetitiva
HD	<i>Head Deapping</i> - Imersões de cabeça
HF	<i>High Frequency</i> – Alta frequência
HVA	Ácido Homovanílico
IC	Insuficiência Cardíaca
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IM	Infarto Cicatrizado do Miocárdio
IMAOs	Inibidores da monoaminoxidase
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LF	<i>Low Frequency</i> – Baixa Frequência
MAO	Monoaminoxidase
MHFG	3- metoxi-4-hidroxifenilglicol
MVLR	Medula Ventrolateral Rostral

NDR	Núcleo Dorsal da Rafe
IRSs	Inibidores da recaptção seletiva de serotonina
NE	Noradrenalina
NPV	Núcleo paraventricular
SAP	Stretched Attend Postures - estiramentos
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SRA	Sistema Renina Angiotensina
T	Troponina
TCA	Teste do Campo Aberto
TAG	Transtorno de Ansiedade Generalizada
TH	Transtornos de Humor
TPH2	Triptofano hidroxilase tipo 2
TPS	Teste da Preferência pela Sacarose
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	02
LISTAS DE FIGURAS	03
LISTA DE TABELAS	05
LISTA DE SIGLAS	06
1-INTRODUÇÃO	10
2-JUSTIFICATIVA	24
3-OBJETIVOS	26
2.1.OBJetivos Gerais.....	27
2.2.Objetivos Específicos.....	27
4-MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Animais utilizados.....	29
4.2.Apreciação Bioética da Experimentação Animal.....	29
4.3.Tratamento.....	29
4.4.Protocolo do Estudo Cardiovascular.....	29
4.5.Protocolo do Estudo Comportamental.....	32
4.6.Protocolo do Estudo <i>post mortem</i>	34
4.7. Protocolo do Estudo Biomolecular.....	36
4.8.Análise Estatística.....	44
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	40
5. RESULTADOS	41
5.1.Mortalidade após as cirurgias.....	42

5.2. Peso dos animais.....	42
5.3. Testes Comportamentais.....	42
5.4. Análise Espectral.....	49
5.5. Patologia.....	52
5.6. Estudo Biomolecular.....	55
6. DISCUSSÃO.....	57
7. CONCLUSÃO.....	63
8. APÊNDICE	65
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

1. Infarto Cicatrizado do Miocárdio (IM)

1.1.1. Características gerais

O infarto cicatrizado do miocárdio (IM), em humanos, é definido como processo de necrose (morte tecidual) de parte do músculo cardíaco, por falta de aporte adequado de nutrientes e, principalmente, oxigênio. É causado por redução parcial ou total do fluxo sanguíneo das artérias coronárias, de magnitude e duração suficientes para não ser compensado pelas reservas celulares locais (Erhardt *et al*, 2002). Sobrevivendo a injúria, o indivíduo tem o miocárdio afetado substituído por cicatriz fibrosa neovascularizada e transmural, de características afuncionais, constituído em sua grande parte por fibrócitos e fibras colágenas (Factor, 1990).

O sintoma típico do IM é a dor/desconforto intenso retroesternal, que pode se manifestar de várias formas, como aperto, pressão, peso e queimação. Na maioria das vezes, é acompanhado por náuseas, vômitos, sudorese intensa e palidez, podendo se desenvolver para quadros mais graves, onde o paciente perde a capacidade motora neste caso, levando a óbito na maioria das vezes (Wijesinghe *et al*, 2008). Em alguns casos, ocorre o chamado IM silencioso, que só pode ser identificado, caso um exame diagnóstico seja feito no momento do exame. Nos indivíduos em que a área necrosada supera 40% de massa ventricular esquerda, o IM pode evoluir para quadros de edema pulmonar agudo, choque cardiogênico e insuficiência cardíaca (IC) (Erhardt *et al*, 2002).

Dentre todos os exames diagnósticos existentes para identificar pacientes infartados, os mais utilizados são o eletrocardiograma (ECG) e a identificação de marcadores sanguíneos de necrose, sendo os mais comuns a fração de creatinofosfoquinase-MB (CK-MB) e a troponina (T) (Kumar *et al*, 2009).

1.1.2. Dados epidemiológicos

O IM é a condição médica de maior morbidade e mortalidade no mundo e estima-se que aproximadamente sete milhões de pessoas sofram desta afecção. Em todo o mundo, o sexo masculino é o mais afetado (Hvelplund *et al*, 2012).

É nos países desenvolvidos que esta patologia possui maior incidência. Contudo, atualmente há um aumento considerável de casos em regiões em desenvolvimento como na América do Sul e no continente africano, principalmente em zonas urbanas. (Lanas *et al*, 2007; Steyn *et al*, 2005). No início da década de 90, pouco mais de 20% de todas as mortes na América Latina já haviam sido causadas por doenças cardiovasculares e a expectativa é que esse número continuasse a crescer por muitas décadas (Lanas *et al*, 2007). Atualmente, no mundo inteiro, este número chega a 24% (WHO, 2011).

Dentre todos os fatores de risco envolvidos com o IM, observa-se que a obesidade, sedentarismo, diabetes mellitus, dislipidemia, álcool, tabagismo e a hipertensão são os mais importantes (White *et al*, 2008; Steyn *et al*, 2005).

1.1.3. Fisiopatologia

1.1.3.1. Aterosclerose

Em humanos, o IM é causado principalmente pelo fenômeno conhecido como aterosclerose. Este se caracteriza por processo contínuo de formação de placas ricas em gordura, colesterol e fibras colágenas, chamadas de Ateromas, que envolvem principalmente a camada íntima de artérias coronárias de tamanho médio e grande (Kumar *et al*, 2009). Esta agregação de placas à parede arterial inicia-se na infância e progride sem manifestar sintomas durante toda a vida (McGil/ *et al*, 2000), podendo provocar oclusão parcial ou total da luz tubular, sendo altamente vulneráveis a erosões e rupturas (White *et al*, 2008; Kumar *et al*, 2009). Em tecidos que não suportam muito tempo a hipóxia ou anóxia, como cérebro e coração, esta oclusão pode trazer sequelas graves ou levar a morte.

Os fatores de risco para o infarto do miocárdio, citados anteriormente, contribuem diretamente para as lesões e disfunções no endotélio dos vasos sanguíneos, criando o ponto central do processo aterosclerótico (White *et al*, 2008; Kumar *et al*, 2009). Essa disfunção endotelial caracteriza-se principalmente por uma redução na biodisponibilidade de óxido nítrico e uma produção excessiva de endotelina 1, causando prejuízos para a homeostase vascular, aumentando da expressão de moléculas de adesão e possibilidade de formação de trombos sanguíneos devido a secreção de diversas substâncias localmente ativas (Kumar *et al*, 2009).

A progressão do processo aterosclerótico acontece por aumento de células inflamatórias que se conectam a moléculas de adesão endotelial no subendotélio vascular. Algumas destas células transformam-se em macrófagos, que oxidam basicamente lipoproteína de baixa densidade (LDL), formando filamentos de gordura. Os macrófagos ativos estimulam a liberação de fatores quimiotáticos e citocinas (proteína quimiotática de monócitos, TNF- α e interleucinas) que perpetuam o processo de recrutamento de macrófagos e células lisas músculo-vasculares, desenvolvendo cada vez mais o tamanho da placa (Kumar *et al*, 2009).

Sabe-se que os macrófagos produzem a enzima que digere a matriz extracelular, podendo provocar tanto o desprendimento quanto a ruptura da camada fibrosa da placa de ateroma, levando a redução da luz vascular e reduzindo a perfusão microcirculatória devido ao baixo fluxo coronário. É importante ressaltar que 75% dos casos fatais de infarto do miocárdio acontecem por ruptura da camada fibrosa e conseqüentemente formação dos trombos vasculares, e 25% por desprendimento da placa da parede dos vasos. (White *et al*, 2008; Kumar *et al*, 2009).

1.1.4. Tratamento

As diferentes estratégias terapêuticas do infarto relacionam-se diretamente com a ocorrência ou não da elevação do segmento ST. Em infartos sem elevação deste segmento, o objetivo da terapia antitrombótica é prevenir a trombose em longo

prazo e permitir que a fibrinólise endógena dissolva o trombo e reduza o grau de estenose coronariana (White *et al*, 2008; Kumar *et al*, 2009). Já o infarto com elevação do segmento ST, normalmente a artéria está totalmente ocluída e a técnica inicial mais apropriada é a reperfusão imediata por meio farmacológico ou por cateterismo, com o objetivo de restabelecer mais rapidamente o fluxo coronariano. No entanto, as terapias anti-isquêmicas ou as que causam hipolipoproteinemia constituem-se em outras formas terapêuticas, e são utilizadas em ambos os tipos de infarto para estabilizar as placas de atheroma ao longo do tempo (White *et al*, 2008; Kumar *et al*, 2009). Independentemente do tipo de tratamento, observa-se que a mortalidade por IM com ou sem elevação do segmento ST continua elevada, e deve-se principalmente, a evolução do quadro clínico para uma insuficiência cardíaca, levando ao óbito, a curto ou longo prazo, em mais de 50% dos pacientes (White *et al*, 2008).

1.1.5. Insuficiência Cardíaca (IC) pós IM

O tecido miocárdico sobrevivente ao IM sofre várias modificações anatomopatológicas, que podem variar de acordo com a extensão da lesão e as características do processo cicatricial, desde a fase aguda até períodos mais longos. As alterações abrangem: Hipertrofia muscular, dilatação da(s) cavidade (s) ventricular (es), doenças valvulares e formações de aneurisma. Todas estas, moduladas a curto e longo prazo por alças autonômicas e endócrinas (Sistema Renina Angiotensina- SRA, por exemplo), levam a diminuição do débito cardíaco, e caracterizam o fenômeno conhecido como “remodelamento cardíaco” (Pfeffer *et al*, 1991), levando a insuficiência cardíaca, que diminui o tempo de vida dos indivíduos afetados graças ao aumento das chances de morte súbita.

1.2. Transtornos de humor (TH)

Os TH são alterações médicas com alta incidência dentro do cenário mundial. Acometem indivíduos de todas as idades e, na maioria das vezes, os impedem de exercer as atividades do dia a dia, se prolongando por longo tempo se não forem tratadas (Uebelacker *et al*, 2004).

Há uma maior incidência dos TH em mulheres. Além de estarem envolvidos com fatores psicossociais e capacidade cognitiva de um indivíduo, fatores genéticos e ambientais podem favorecer o aparecimento de sintomas em indivíduos já predispostos (Felder *et al*, 2012)

Dentre os distúrbios comportamentais mais comuns estão o estresse, a ansiedade e a depressão (Apóstolo *et al*, 2011). Todos estes, na maioria das vezes, ocorrem em concomitância uns com os outros ou com outras injúrias, de origem endócrina, oncológica e/ou cardiovascular. (NIMH, 1999).

1.3. Depressão Maior (DM)

1.3.1. Características gerais

A DM é um transtorno psiquiátrico que afeta pessoas de todas as idades. Caracteriza-se pela perda de prazer nas atividades diárias (anedonia), apatia, alterações cognitivas (diminuição da capacidade de raciocinar adequadamente, de se concentrar ou/e de tomar decisões), psicomotoras (lentidão, fadiga e sensação de fraqueza), alterações do sono (mais frequentemente insônia, podendo ocorrer também hipersonolência), alterações do apetite (mais comumente perda do apetite, podendo ocorrer também aumento do apetite), redução do interesse sexual, retraimento social, ideação suicida e prejuízo funcional significativo (Del Porto *et al*, 1999; Seligman, 1992; Gorman, 2010). Diferencia-se do humor "triste", por se tratar de uma condição duradoura (a maior parte do dia, quase todos os dias, por pelo menos duas semanas), de maior intensidade ou mesmo por uma tristeza de qualidade diferente da tristeza habitual, acompanhada de sintomas específicos e que trazem prejuízo à vida (DSM – IV – TR).

Dentre os fatores causadores, os mais comuns são os psicossociais, relacionados principalmente com a qualidade de vida, como a perda de entes queridos, solidão, alterações de convivência e em relacionamentos no ambiente de trabalho e vida pessoal, baixos níveis de socialização e o desamparo apreendido, caracterizado pela diminuição considerável no número de comportamentos "saudáveis", resultando em vários tipos de "punições não contingentes" (Seligman, 1992). Outros fatores, como os traumas, o uso excessivo de fármacos (betabloqueadores, benzodiazepínicos, corticosteróides, anti-histamínicos, analgésicos e "antiparkinsonianos") e o vício em drogas como cocaína e maconha, constituem formas menos comuns de adquirir a DM (Del Porto *et al*, 1999).

Os transtornos de ansiedade são um conjunto de transtornos heterogêneos que incluem diferentes condições patológicas, tais como transtorno do pânico, fobia específica, fobia social, estresse pós traumático, transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno obsessivo compulsivo, transtorno de estresse agudo, transtorno de ansiedade devido a condições médicas e transtorno de ansiedade induzido por substâncias (Castillo *et al*, 2000; Gascón *et al*, 2011; Farris *et al*, 2012; DSM – IV – TR) . O TAG caracteriza-se por ansiedade e preocupação excessiva a novas situações e persistente, dificuldade de descontração e de controle das preocupações (Van der Heiden *et al*, 2011). Todas estas, na maioria das vezes, são acompanhadas por três dos sintomas: inquietação, fadiga, irritabilidade, perturbação do sono, dificuldade de concentração e tensão muscular (DSM – IV – TR). Além disso, a TAG caracteriza-se por ser o transtorno de humor de maior concomitância com a DM (Stoop *et al*, 2011). Em animais, sabe-se que, em muitos dos modelos de depressão, é comum o aparecimento de sinais análogos à ansiedade (Malkesman *et al*, 2005; Morales-Medina *et al*, 2012).

1.3.2. Dados epidemiológicos

Atualmente, a depressão é o transtorno de humor de maior prevalência. Cerca de 121 milhões de pessoas sofrem de depressão no mundo e, por ano, aproximadamente 850.000 pessoas se suicidam em casos de doença severa. (WHO, 2008). Estima-se que 28 % da população total de países desenvolvidos e 20% de países subdesenvolvidos já tenham passado por episódios depressivos.

Além disso, a respeito da parte da população que nunca passou por um episódio, 15% é susceptível de sofrer de depressão nos países desenvolvidos, número que reduz a 11 % nos países subdesenvolvidos (WHO, 2008). Na França, país com o maior número de casos, cerca de 30% da população já apresentou algum tipo de sintoma. Em 1999, as doenças mentais como um todo correspondiam a 11 % de DALYs (*Disability Adjusted Life Years* = soma de anos de vida potencialmente perdidos por mortalidade prematura ou incapacitação) no mundo ocidental, sendo a depressão a maior causa de incapacitação. Acreditava-se que a depressão atingiria o segundo lugar de DALYs, valor correspondente a aproximadamente 15% até o ano de 2020 (WHO, 2001). Atualmente, a depressão já é a segunda causa em indivíduos entre 15 e 44 anos (WHO, 2008).

Estes números tem grave impacto econômico. Na Europa, a depressão é umas das maiores causas de trabalho perdido (Ormel, 2004). Nos Estados Unidos, os custos anuais com a depressão já se aproximam dos 30 a 40 bilhões de dólares (NIMH, 2011).

A mortalidade dentre os pacientes com DM é de aproximadamente 10 %, sendo o suicídio uma das maiores contribuições para esse número. (Schloss & Henn, 2004).

1.3.3. Fisiopatologia

1.3.3.1. Teoria das Monoaminas

As principais teorias relativas à base biológica da depressão situam-se nos estudos sobre neurotransmissores cerebrais e seus receptores, embora outras áreas também estejam sob investigação. As monoaminas constituem a principal hipótese envolvendo os neurotransmissores cerebrais. Elas se dividem em catecolaminas: dopamina (DA) e noradrenalina (NE), e numa indolamina: a serotonina (5-HT).

A hipótese das monoaminas baseia-se no conceito da deficiência das mesmas, particularmente NE, 5-HT e DA, como a causa da depressão. A primeira hipótese aminérgica de Schildraut (1965) e Bunney e Davis (1965) foi denominada hipótese catecolaminérgica, pois propunha que a depressão se associava a um déficit das catecolaminas, principalmente a NE. Posteriormente, surgiram a hipótese serotoninérgica, de Van Praag e Korf (1971), e a hipótese dopaminérgica de Wilhner (1990), que tiveram grande impulso devido ao desenvolvimento da classe de antidepressivos chamados Inibidores Seletivos de Recaptação da Serotonina (IRSs) e devido ao envolvimento da DA e 5-HT nos fenômenos de recompensa cerebral (anedonia), e de estudos demonstrando que o uso continuado de antidepressivos tricíclicos (ADTs) aumenta a resposta comportamental à DA injetada no núcleo *acumbens*, que age como interface entre o sistema motor e o sistema límbico. Todas estas hipóteses derivaram inicialmente da compreensão a respeito do conhecimento sobre o mecanismo de ação dos primeiros antidepressivos: ADTs e inibidores da monoaminoxidase (IMAOs) (Graeff & Brandão, 1993; Leonard, 1997; Stahl, 1998).

Para reforçar a hipótese das monoaminas, houve outras evidências: 1- Algumas drogas, como a reserpina, que depletam esses neurotransmissores, são capazes de induzir depressão. 2 - A existência de precursores da 5-HT (L-triptofano e 5-hidroxi-triptofano) que apresentam efeito antidepressivo leve. 3 - Alguns estudos

que relataram anormalidades nos metabólitos das aminas biogênicas, como o ácido 5-hidroxiindol acético (5HIAA), o ácido homovanílico (HVA) e 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHFG) no sangue, urina e líquor de pacientes deprimidos. 4 - A redução da concentração de 5-HT e seu principal metabólito 5HIAA, que ocorre no cérebro de vítimas de suicídio, alcançando de maneira abrupta, o líquor de pacientes deprimidos. 5 - A privação aguda de triptofano, que causa recidiva em 80% dos pacientes deprimidos tratados com sucesso com os antidepressivos da classe dos ISRs (Kaplan *et al*, 1994; Graeff & Brandão, 1993).

Apesar da relevância da hipótese das monoaminas na investigação da depressão, existe certa resistência para sua aceitação, principalmente devido ao fato de que todos os medicamentos antidepressivos aumentam de imediato, as monoaminas em nível das fendas sinápticas, porém seu efeito clínico só ocorre algumas semanas depois (Oswald *et al*, 1972). Outras substâncias, como por exemplo, a cocaína, também elevam os níveis das monoaminas, mas não apresentam efeito antidepressivo (Stahl, 1998).

Para maior detalhamento da teoria das monoaminas, sugere-se os trabalhos de Baker & Dewhurst (1981), Maes & Meltzer, e Manji *et al* (2001), que revisaram e fizeram abordagens evolutivas a respeito da teoria das monoaminas. Devido as intensas pesquisas envolvendo esta teoria, os mecanismos dos principais antidepressivos utilizados atualmente estão relacionados a estes neurotransmissores.

1.3.4. Tratamento

Diversos tipos de estratégias terapêuticas são utilizados para o tratamento da DM. Dentre os tratamentos mais comuns estão os fármacos antidepressivos e a eletroconvulsoterapia (ECT) (Nemeroff & Owens, 2002). No uso dos fármacos, a demora do efeito terapêutico, a dependência química, a persistência ou recidiva dos sintomas e o alto número de suicídios constituem as principais desvantagens deste tipo de tratamento (Blier, 2003). A ECT é utilizada para indivíduos com depressão grave e que não tiveram resposta satisfatória ao tratamento medicamentoso (Salleh *et al*, 2006). A Estimulação Magnética Transcraniana repetitiva (EMTr) pode ser uma alternativa para os pacientes resistentes aos medicamentos. Devido à metodologia, só é usada em casos extremos, quando o suicídio é iminente (Fregnil & Pascual-Leone, 2011).

Dentre os fármacos descritos na literatura, os antidepressivos tricíclicos (ADTs), inibidores da monoaminoxidase (IMAOs) e os inibidores da recaptção de 5HT (IRSSs) são os mais utilizados na clínica médica (Bauman, 2007). Os ADTs (Imipramina, Clomipramina, Desipramina, Amitriptilina, Nortriptilina) atuam bloqueando a recaptção das monoaminas pelas terminações nervosas por competição pelo sítio de ligação dos seus transportadores. Possuem maior efeito sobre a NE e 5HT e menor efeito sobre a DA. Além de seus efeitos sobre as monoaminas, a maioria dos ADTs atuam como antagonistas em receptores colinérgicos muscarínicos, histamínicos e de 5HT pós-sinápticos. Causam muitos efeitos colaterais, principalmente em razão da interferência sobre o controle autonômico (Rang & Dale, 2006). Os IMAOs (Fenelzina, Tranilcipromina, Iproniazida) foram um dos primeiros fármacos introduzidos na clínica médica. Causam inibição reversível ou irreversível da enzima monoamina oxidase (MAO),

importante enzima que degrada todas as monoaminas. Por ter grande espectro de ação, também causam diversos efeitos indesejáveis (Fisar *et al*, 2010). Este fármacos foram rapidamente substituídos pelas classes mais recentes de antidepressivos.

Os IRSs (Fluoxetina, Fluvoxamina, Paroxetina, Citalopram, Sertralina) são os fármacos mais prescritos atualmente na clínica médica (Meyer, 2012). Atuam nos recaptadores pré-sinápticos de 5-HT (SERT) (Moreno *et al*, 1999), inibindo a recaptação da mesma, aumentando a concentração nas fendas sinápticas (Figura 1). Por mostrarem maior seletividade pela recaptação de 5HT em relação à NA e DA, possuem menor probabilidade que os ADTs de causarem efeitos anticolinérgicos, e são tão eficazes quanto os ADTs e IMAOs para tratarem a depressão, principalmente em casos moderados (Rang & Dale, 2006; Goodman & Gilman, 1996). Por essas características, constituem a melhor estratégia terapêutica para pacientes com DM, principalmente em casos onde há concomitância com outras doenças (Koelch *et al*, 2011).

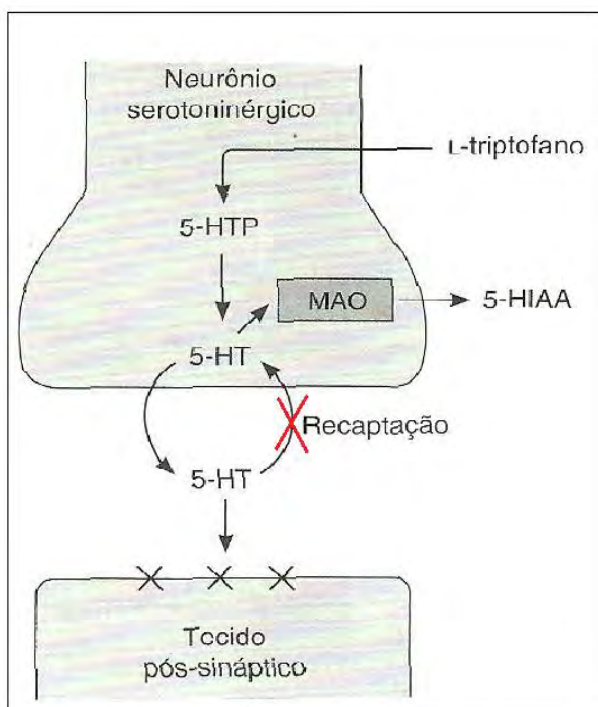


Figura 1: Mecanismo de ação dos IRSs. Estes inibem os recaptadores pré-sinápticos da 5-HT, chamados de SERT, permitindo-a permanecer mais tempo na fenda sináptica. Após um determinado período de uso, os IRSs possuem a característica de dessensibilizar o autorreceptor inibitório 5-HT_{1A} pré-sináptico, aumentando de maneira efetiva a 5-HT na fenda e a ativação de receptores pós-sinápticos, causando o efeito desejado. Matos RM, 2005.

1.3.5. Serotonina e o controle da emoção e comportamento

A 5-HT é uma indolamina, originada da hidroxilação e descarboxilação do aminoácido L- triptofano (pela enzima triptofano hidroxilase- TPH) e possui sete tipos de receptores: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇ e subtipos. Diversos estudos têm demonstrado a sua participação na fisiologia e nas

fisiopatologias do sistema cardiovascular (alterações na modulação do tônus vascular, por exemplo), do aparelho gastrointestinal, do controle das emoções e do comportamento, da função cognitiva, das funções neuroendócrinas, do controle motor e da sensibilidade à dor (Mohammad-Zadeh *et al*, 2008).

Não há dúvida da importância da 5-HT, não só em termos de modulação da atividade motora e sensorial, mas também em relação ao seu papel central na cognição e emoção e sua implicação nos transtornos afetivos, tais como ansiedade e depressão. Devido ao grande impacto que alguns estudos com serotonina tiveram em modelos de aprendizagem e controle cognitivo, muitos pesquisadores focam suas linhas para estudos funcionais envolvendo 5-HT, seus receptores e a cognição, comportamento e as emoções, em humanos.

O núcleo dorsal da rafe (NDR), presente na região da rafe mesencefálica, ventralmente a substância cinzenta periaquedutal e estendendo-se até a porção rostral da ponte mesencefálica (Abrams *et al.*, 2004), constitui o principal núcleo serotoninérgico cerebral (Figura 2) (Reis LC, 2007), possuindo projeções prosencefálicas (sistema cardiovascular e controle hidroeletrolítico) e ascendentes a todas as regiões do cérebro. Dentre estas, algumas se projetando para importantes regiões do sistema límbico: córtex orbitofrontal, giro cingulado, amígdala, núcleo caudato, núcleo *accumbens*, hipocampo e hipotálamo, este último de grande importância no controle das funções autonômicas e neuroendócrinas (Grippio AJ, 2009).

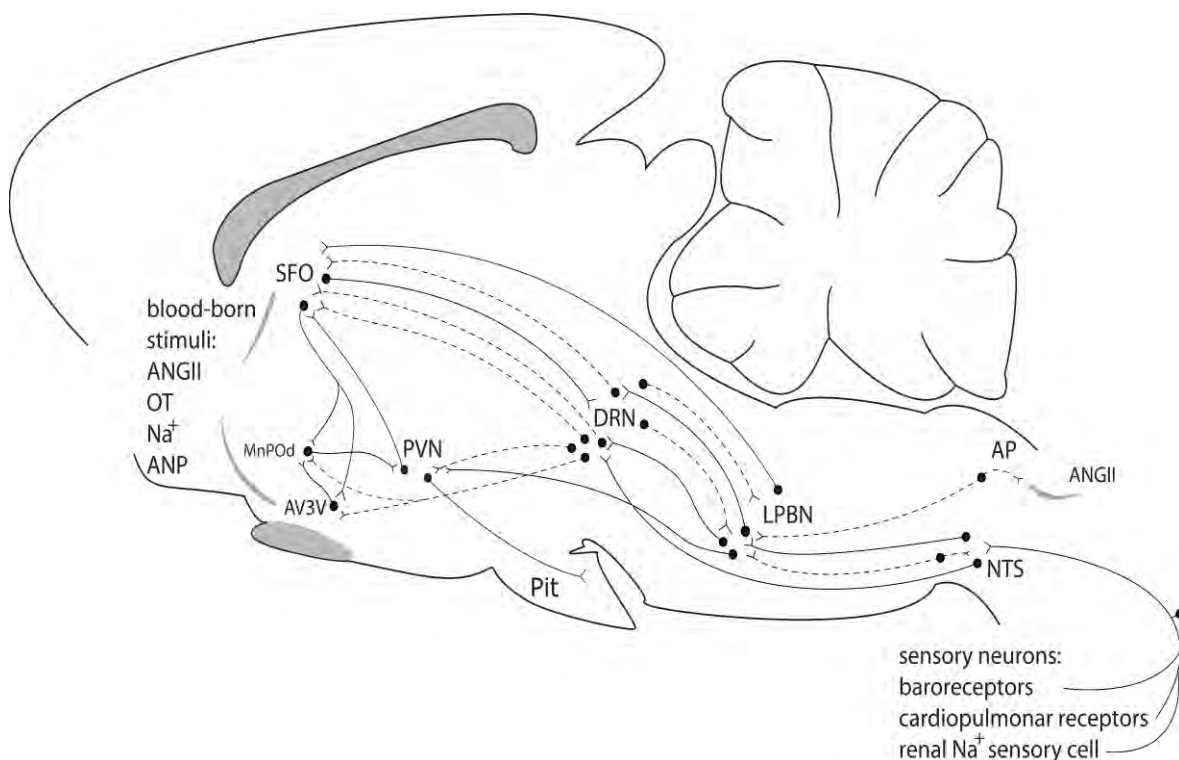


Figura 2 : Esquema representativo do SNC em corte sagital, mostrando o Núcleo Dorsal da Rafe (DRN, em inglês) e suas importantes ligações com regiões mesencefálicas e rombencefálicas. Dentre elas, o Núcleo do Trato Solitário (NTS) e o Núcleo Paraventricular Hipotalâmico (PVN, em inglês), importantes no controle autonômico cardíaco e neuroendócrino. O PVN inclui-se ao Sistema Límbico, importante na cognição e no comportamento (Reis LC, 2007).

1.4. Modelos animais de Depressão

Atualmente, não há nenhuma doença animal correspondente ou similar a depressão em homens, mas foram descritos vários trabalhos com procedimentos que produzem, em animais, estados comportamentais ou sintomas “análogos” aos típicos da depressão humana (diminuição na interação social, diminuição do ganho ou perda de peso, diminuição da atividade motora, diminuição da busca pelo prazer ou anedonia etc.) (Porsolt, 2000). Como exemplo destes procedimentos, o uso de estímulos dolorosos repetidos dos quais o animal não consegue escapar, a separação entre mãe e filho, o isolamento social, a aplicação de fármacos que causam depleção de aminas, como a reserpina, também produzem estados que se assemelham a depressão humana. Em muitos destes protocolos, os sinais são atenuados ou extinguidos pelo uso de antidepressivos.

O modelo de IM vem sendo recentemente utilizado para induzir o aparecimento de sintomas análogos à depressão em modelos animais, tendo em vista a alta relação epidemiológica entre a depressão e as doenças cardiovasculares em geral e a possível integração entre os mecanismos fisiopatológicos (neuroendócrinos e autonômicos) envolvidos no aparecimento das duas patologias (Grippe AJ, 2009). Neste modelo, os animais submetidos a testes específicos para avaliação de distúrbios comportamentais como o campo aberto, labirinto em cruz elevado e preferência pela sacarose, exibem nítida alteração nos comportamentos padrões (Wann *et al*, 2007; Prickaerts *et al*, 1996; Moffitt *et al*, 2008).

1.5. Relação entre a DM e IM

1.5.1. Estudos clínicos

Atualmente as doenças cardiovasculares em geral e a DM representam uns dos maiores problemas de saúde mundial, gerando milhares de vítimas (Johnson & Grippe, 2006). Observa-se que, muitas das vezes, o IM leva a alterações comportamentais que evoluem para a DM (Spijkerman *et al*, 2005). Somado a isto, o inverso também pode ocorrer, já que os indivíduos que apresentam sintomas comportamentais compatíveis com a DM desenvolvem um enorme risco do surgimento de doenças cardiovasculares (Johnson & Grippe, 2006).

Estudos recentes mostram que os pacientes com algum tipo de doença cardiovascular apresentam maiores chances de desenvolverem depressão quando comparados aos indivíduos saudáveis (Johnson & Grippe, 2006). Dos indivíduos que sobrevivem a um infarto do miocárdio, 45% dos casos desenvolvem Depressão (Schleifer *et al*, 1989), chegando a 50% em pacientes que apresentam insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (Freedland *et al*, 2003). Por outro lado, Pratt *et al* (1996) relataram que pessoas que não apresentavam nenhum tipo de problema cardiovascular, mas que desenvolveram depressão, foram quatro vezes mais suscetíveis a sofrer algum tipo de evento cardíaco patológico, quando comparados as que nunca tiveram alterações no humor.

Pode ser observado que especificamente a depressão é estabelecida como um fator de risco para doenças cardíacas (Johnson & Grippe, 2006), e recentemente,

Sierksma *et al* (2010) e Caraci *et al.* (2010) também a relataram como um fator independente de risco para doença de Alzheimer. Porém, o mesmo não acontece para outros tipos de doenças, como câncer (Spiegel, 1996). Em função dessa íntima relação entre depressão e infarto, alguns autores acreditam na hipótese da existência de pontos de convergência entre a etiologia ou a progressão patológica de cada doença, produzindo fatores comuns para os distúrbios cardiovasculares e psicológicos (Johnson & Grippo, 2006).

A Figura 3 mostra, segundo Johnson & Grippo (2006), as três hipóteses que explicam as origens envolvidas na co-morbidade entre a IC e a depressão.

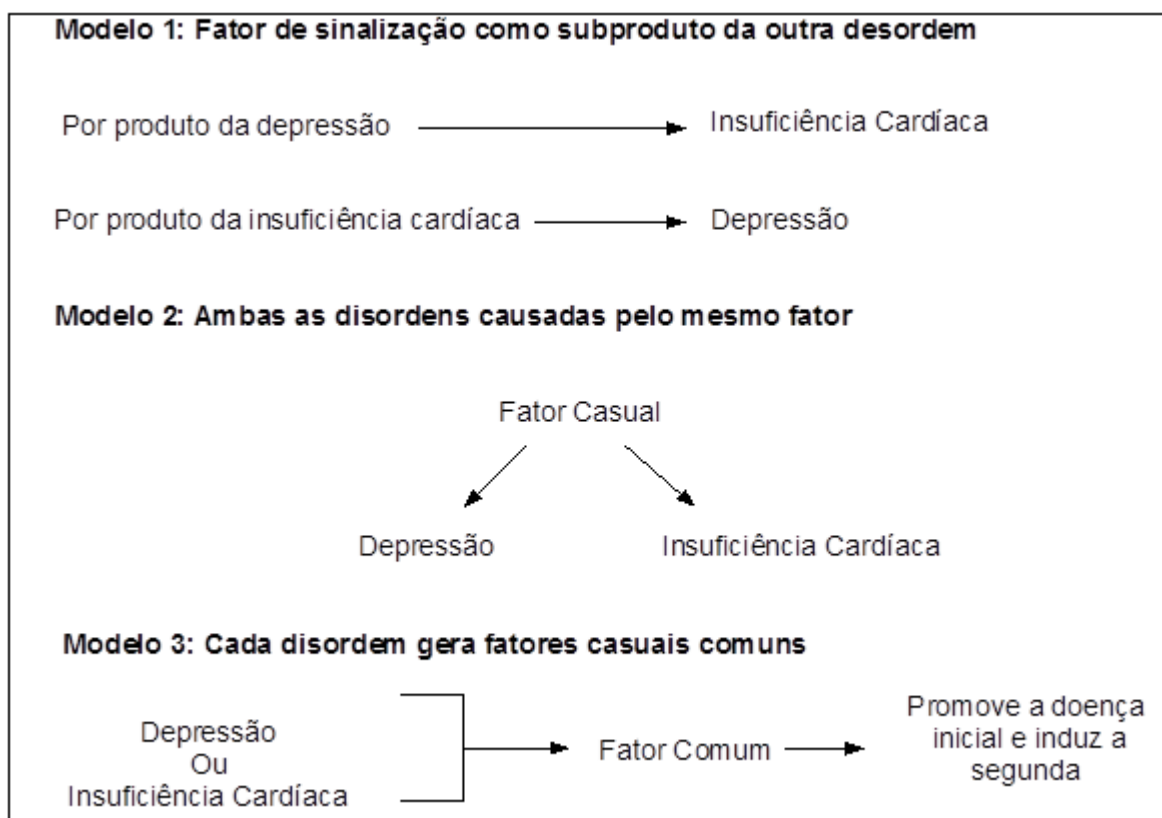


Figura 3: Na figura acima, situam-se as três possibilidades que explicam as origens envolvidas na co-morbidade entre a Insuficiência cardíaca e a depressão. Na primeira hipótese, a insuficiência cardíaca instalada leva a produção de fatores de sinalização que geram o quadro depressivo, ou vice-versa (modelo 1). Na segunda hipótese, simultaneamente, os dois distúrbios são gerados por fatores comuns (modelo 2). Na terceira e última, um determinado fator é produzido, gerando um dos distúrbios e induzindo o aparecimento do outro (modelo 3). Não necessariamente, apenas um dos modelos está correto. Traduzido de Johnson & Grippo, 2006.

1.5.2. Mecanismos serotoninérgicos

Na depressão, tanto em humanos, como em modelos animais, um dos principais fatores associados ao infarto é a redução da atividade de 5-HT, (Sole *et al*, 1980; Schins *et al*, 2005). Em modelos de estresse crônico e depressão, a baixa

atividade dos neurônios serotoninérgicos parece estar relacionada a uma menor expressão de triptofano hidroxilase-2 (TPH2) (Shishkina *et al*, 2007).

O sistema serotoninérgico interage com funções endócrinas e autonômicas, influenciando assim a regulação cardiovascular como um todo (Murphy *et al*, 1996). O núcleo paraventricular hipotalâmico (NPV), que recebe inervações do sistema serotoninérgico, possui projeções para as células intermediolaterais da medula (CIM), medula ventrolateral rostral (MVLr) e o complexo vagal dorsal (CVD), para influenciar o tônus simpático e parassimpático (Badoer, 2001). Algumas evidências relacionando 5-HT e a função cardiovascular sugerem que os vasos sanguíneos que foram danificados por hipertensão ou aterosclerose são hipersensíveis aos efeitos vasoconstritores da 5-HT (VanZwieten *et al*, 1983). Somando-se a isto, Sole *et al* (1983) observaram níveis menores de 5-HT no SNC de roedores com isquemia miocárdica. Mais recentemente, descobriu-se que uma disfunção das plaquetas sanguíneas, que são reguladas em parte pela 5-HT e podem influenciar na patogênese das doenças cardiovasculares, são encontradas em pacientes com depressão (Mossner *et al*, 2007; Glassman, 2007). Juntos, estes achados criam uma poderosa ligação entre transtornos de humor e regulação neuroendócrina e autonômica envolvendo 5-HT que podem afetar a função cardiovascular.

1.5.3. Mecanismos autonômicos

Sabe-se que a disfunção autonômica pode propiciar tanto alterações cardiovasculares, como comportamentais, levando ao quadro depressivo. A ativação de sistemas neuroendócrinos (principalmente disfunção do eixo hipotálamo – hipófise – adrenal e ativação do SRA) podem induzir mudanças no sistema nervoso autônomo, que são comuns na depressão e em doenças cardiovasculares. A depressão pode ser causada por mudanças na regulação autonômica do coração, como a ativação do SNA simpático, em conjunto com a diminuição do tônus vagal, elevações na frequência cardíaca e reduções na variabilidade da frequência cardíaca (Esler *et al*, 1982; Carney *et al*, 1995; Krittayaphong *et al*, 1997; Watkins & Grossman 1999; Pitzalis *et al*, 2001; Barton *et al*, 2007; Hausberg *et al*, 2005). Mudanças autonômicas similares são associadas com o risco de eventos cardiovasculares, como a hipertensão, hipertrofia cardíaca, e são observadas em condições cardiovasculares agudas e crônicas, incluindo aterosclerose, IM, arritmias e IC (Ryan *et al*, 1976; Dyer *et al*, 1980; Gordon *et al*, 1981).

A ativação do SNA simpático, em associação com a diminuição da influência do ramo parassimpático levam ao aumento da frequência cardíaca e diminuição da variabilidade da frequência cardíaca em repouso, e isto é considerado um indicador para o aumento dos riscos cardiovasculares (Ferrari *et al*, 2003). Curiosamente, estas mesmas alterações já foram observadas em pacientes com diagnóstico de depressão (Rechlin *et al*, 1994a,1994b; Forbes & Chaney 1980; Carney *et al*, 1988).

1.5.3.4. Estudo da variabilidade da frequência cardíaca (VFC)

O estudo da VFC, citado no item 1.5.2, é um método que permite analisar as flutuações do tônus autonômico que ocorrem durante períodos curtos ou prolongados (24h), tendo a vantagem de possibilitar uma avaliação não invasiva e

seletiva da função autonômica. Este tipo de análise recebeu grande impulso após o estabelecimento da forte relação entre VFC e mortalidade pós IM (Bigger *et al*, 1992; Kleiger *et al*, 1987). As chamadas medidas no domínio do tempo são índices obtidos de um registro contínuo de ECG, a partir do qual se determina a dispersão da duração dos intervalos entre complexos QRS normais, isto é, resultantes de despolarização sinusal. Os vários índices propostos para mensuração da VFC no domínio do tempo podem ser derivados de cálculos aritméticos, estatísticos ou geométricos (histograma R-R) (TFESC & NASPE, 1996). A VFC também pode ser avaliada através das medidas no domínio de frequência (Akselrod *et al*, 1981; Saul, 1990; Moraes e Ferlin, 1992). Estas medidas são derivadas de análise da densidade do espectro de potência que descreve a distribuição da densidade (variância) em função da frequência (TFESC & NASPE, 1996). Em outras palavras, a análise espectral decompõe a VFC em seus componentes causadores, apresentando-os segundo a frequência com que alteram a FC. Utilizando-se o método para cálculo da densidade espectral (transformação rápida de Fourier), delimitam-se, em ratos, normalmente duas faixas de frequências distintas (Pereira-Júnior, 2006): alta frequência (HF: 0,8 a 2,5 Hz), modulada pelo sistema nervoso parassimpático e gerado pela respiração (Furlan *et al*, 1990) e baixa frequência (LF: 0,2 a 0,8 Hz), modulada em grande parte pelo simpático, mas também pelo parassimpático (Saul, 1990). Esta última tem sido correlacionada também ao sistema barorreceptor e termorregulador (Kitney & Ropelman, 1980), à atividade periférica vasomotora e ao sistema renina-angiotensina (Akselrod *et al*, 1981).

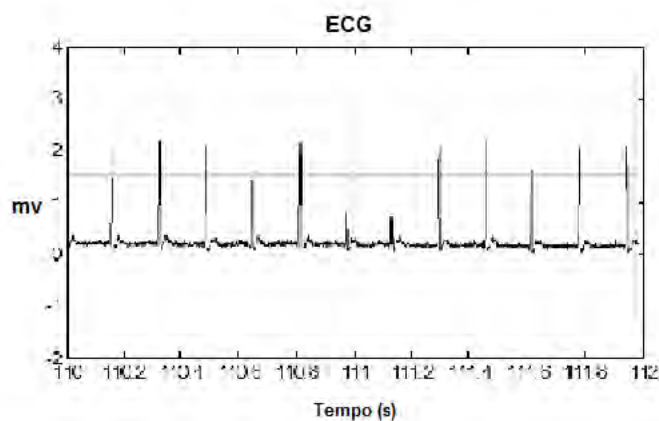


Figura 4 (Continua).

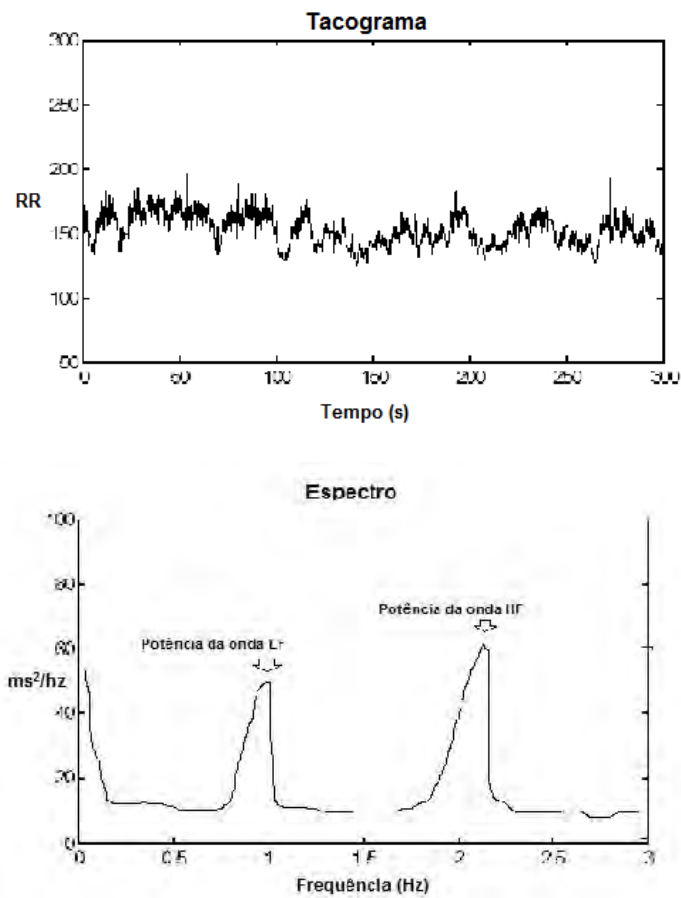


Figura 4. Continuação: Etapas realizadas numa análise espectral. Inicialmente, um registro eletrocardiográfico (ECG) realizado em tempo suficiente é usado para gerar um tacograma, isto é, um registro da VFC, representado pelos intervalos RR sucessivos. Finalmente, o tacograma é transformado por meio de um algoritmo num espectro, no qual se verificam-se as potências (amplitudes) das ondas geradas em frequências específicas, neste caso, alta (HF) e baixa (LF) (Acervo próprio).

2. JUSTIFICATIVA

Ao longo das últimas duas décadas, diversos estudos foram realizados a fim de identificar sinais análogos de depressão e ansiedade em modelos animais de injúria cardiovascular (especificamente por isquemia coronariana) e verificar os possíveis riscos de eventos cardiovasculares em modelos de transtornos de humor (em sua grande parte, com depressão). Além disso, alguns estudos tentaram identificar isoladamente os possíveis mecanismos fisiopatológicos concernentes à insuficiência cardíaca pós IM que “poderiam” estar envolvidos com a depressão, e vice-versa. Entretanto, poucos trabalhos foram desenvolvidos para investigar mecanismos fisiopatológicos causadores dos distúrbios comportamentais no modelo do IM em ratos. Associado a isto, o protocolo experimental seriado utilizado neste estudo, i.e., o mesmo grupo de animais avaliados em diferentes tempos, além de ser pouco frequente na literatura, possibilitou uma análise temporal mais racional da cadeia de eventos que culminam nos distúrbios comportamentais neste modelo de IC.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

- Identificar, por meio de testes comportamentais, sinais análogos à ansiedade e depressão em ratos submetidos à IM experimental.
- Verificar se o tratamento com antidepressivo da classe dos ISRs, durante todo o protocolo, é eficiente em inibir os possíveis sinais análogos à ansiedade e depressão induzidas pelo IM.
- Buscar mecanismos neurovegetativos e moleculares que contribuam para explicar a fisiopatologia dos possíveis distúrbios comportamentais encontrados no modelo de IM.

3.2. Objetivos Específicos

- Analisar a atividade exploratória, por meio do Teste de Campo Aberto, e sinais análogos à ansiedade e depressão, pelos Testes de Labirinto em Cruz Elevado e Preferência pela Sacarose, respectivamente, no modelo de IM induzido pela ligadura da artéria coronária esquerda em ratos.
- Verificar a participação da serotonina nas alterações comportamentais e neurovegetativas induzidas pelo IM, por meio da administração de Fluoxetina, e da quantificação do RNA_m da enzima triptofano hidroxilase tipo 2 pelo método de PCR em tempo real.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais utilizados

Oitenta ratos Wistar machos pesando entre 200 e 250 gramas foram obtidos no biotério central de criação de roedores do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ, alocados no biotério experimental do mesmo departamento e mantidos sob condições ideais (ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura ~ 21 ° C e ração e água *ad libitum*).

Foram formados quatro grupos experimentais:

- 1- Animais infartados tratados com água (grupo Infarto + Veículo, n = 15)
- 2- Animais falso – operados tratados com água (grupo Sham + Veículo, n = 12)
- 3- Animais infartados tratados com Fluoxetina (grupo Infarto + Fluox, n = 14)
- 4- Animais falso – operados tratados com Fluoxetina (grupo Sham + Fluox, n = 12)

4.2. Apreciação Bioética da Experimentação Animal

Este projeto de pesquisa esteve de acordo com as normas e conceitos éticos da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e seguiu as normas propostas pelo “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”, publicado pelo Instituto de Nacional de Saúde dos Estados Unidos (*NIH Publication No. 85-23, revised 1996*).

4.3. Tratamento

Os grupos Infarto + Fluox e Sham + Fluox da 2^a etapa do experimento foram tratados diariamente com cloridrato de fluoxetina (10 mg/kg po, Ratiopharm/Mepha, Brazil), inibidor seletivo da recaptção de serotonina (item 1.4.4), por via orogástrica utilizando método de gavagem. Nos grupos Infarto + Veículo e Sham + Veículo foram administrados água pura também por gavagem, em mesmo volume dos animais tratados, a fim de atenuar as alterações causadas pelo método (Grippio *et al*, 2006; Olivares *et al*, 2012).

4.4. Protocolo do estudo Cardiovascular

4.4.1. Cirurgia de infarto do miocárdio

Todos os animais foram submetidos à avaliação pelo eletrocardiograma (conforme item 2.3) e, 24 horas após esta avaliação, foram submetidos ao protocolo de infarto do miocárdio, como descrito por Johns & Olson (1954) e adaptado por Olivares *et al*, (2004;2007) e Trindade *et al*, (2007) .

Após anestesia com éter dietílico (*Merck*, Alemanha), os animais foram fixados em uma pequena mesa cirúrgica de cortiça, em decúbito dorsal,

tricotomizados ao nível torácico e em seguida, submetidos ao procedimento cirúrgico. A cirurgia iniciou-se a partir de uma incisão da pele de aproximadamente 1 cm de comprimento, localizada ao nível para-esternal esquerdo e a 1 cm da linha esternal média, na junção dos terços inferior e médio da distância entre a clavícula e o rebordo costal.

Em seguida, os músculos peitoral maior e menor foram divulsionados, objetivando a visualização do gradil costal esquerdo. Neste momento, foi realizada uma sutura em bolsa da pele e dos músculos, da região citada anteriormente, deixando o nó aberto até o término da cirurgia. Com o auxílio de uma pinça hemostática reta, foi feita a incisão entre o 4^o ou 5^o espaço intercostal esquerdo, através do qual o coração foi exteriorizado por meio de uma suave compressão manual torácica direita. Após a localização da artéria coronária descendente anterior esquerda, normalmente abaixo do átrio esquerdo, a mesma foi ligada com fio de seda 6-0 através de um nó duplo, o mais próximo possível de sua origem na aorta. Em seguida o coração foi recolocado rapidamente em sua posição anatômica original e o nó da sutura em bolsa finalmente fechado. Quando necessário, os animais foram submetidos à ventilação mecânica através de um pequeno ambú manufaturado, com o intuito de estimular os movimentos respiratórios espontâneos.

No caso do grupo Sham, o procedimento foi semelhante, excetuando a etapa de ligadura da artéria coronária. Neste caso, o fio de sutura foi passado pelo músculo cardíaco sem promover o nó cirúrgico (Olivares *et al*, 2004; 2007).

Logo após o término da cirurgia, foi administrado o antibiótico veterinário Pentabiótico (Fort Dodge-EUA), na dose de 30mg/100g de peso.

Após a recuperação da anestesia, isto é, com os animais exibindo atividade motora espontânea e deambulação, os mesmos foram avaliados por um período de quatro horas e posteriormente reconduzidos ao biotério, sendo mantidos com água e ração *ad libitum*. Quarenta e oito horas após a cirurgia foram submetidos novamente ao eletrocardiograma, para confirmação do infarto.

4.4.2. Avaliação eletrocardiográfica

Vinte e quatro horas antes da avaliação, os animais foram imobilizados e tricotomizados em toda a extensão torácica, sendo acoplado, a cada hemitórax, um eletrodo de espuma (3M do Brasil Ltda, Sumaré-SP, Brasil) de aproximadamente 1,5 centímetros de diâmetro. Momentos antes do registro foram conectados ao sistema de aquisição eletrocardiográfico do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ (Amplificador MP100A-CE / BIOPAC System-INC, CA, EUA) para registro do ECG. Os sinais foram adquiridos com a velocidade de 10 k-hertz e amplitude com resolução de 12 bits e, para visualização e análise dos registros, foi utilizado o software AcqKnowledge[®] (versão 3.8.1).

Todos os animais foram rigorosamente avaliados no mesmo período do dia e em posição semelhante, para obter orientação coerente e magnitude dos vetores cardíacos.

Para confirmação do infarto, foram realizados registros de 60 segundos. Os animais que apresentaram aumento acentuado na amplitude da onda Q ou presença de onda QS foram considerados infartados (Olivares *et al*, 2007). Já aqueles que mesmo após a cirurgia não apresentaram os padrões supracitados foram remanejados para grupo Sham (Figura 5).

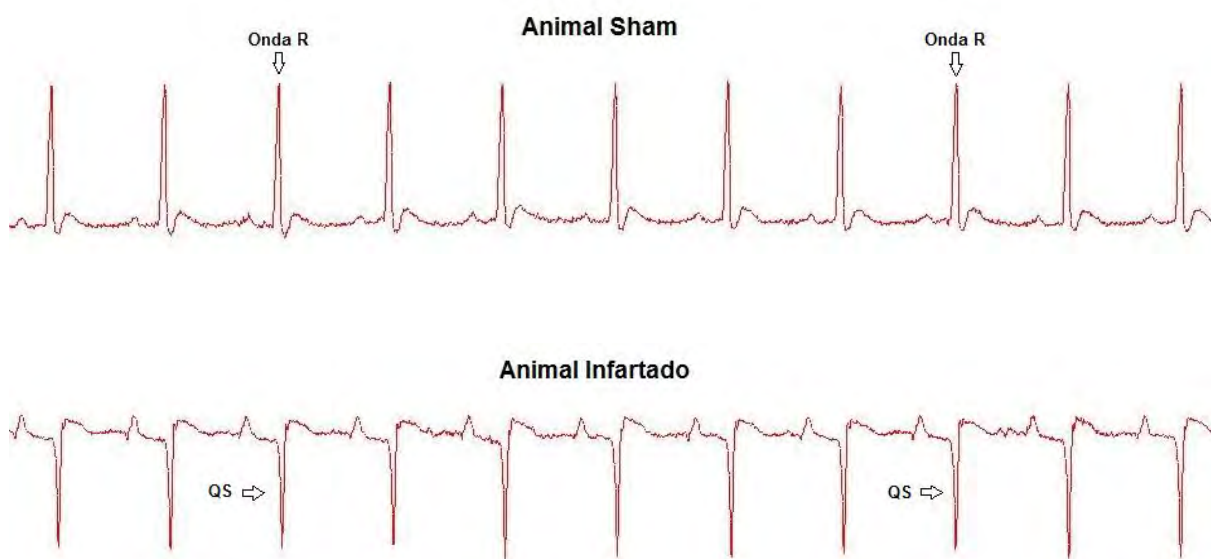


Figura 5: Duas imagens representando os registros eletrocardiográficos de um animal sham (em cima) e de outro infartado (embaixo). Um ECG normal constitui-se onda P, referente à despolarização atrial, o complexo QRS, à despolarização ventricular e a onda T, à repolarização ventricular. No IM, devido à fibrose no ventrículo esquerdo, que não transmite o impulso elétrico, a onda R some, configurando um novo complexo, desta vez chamado de QS (Acervo próprio).

4.4.2.1. Análise Espectral

Inicialmente, os animais foram submetidos ao mesmo protocolo descrito no item 4.4.2. Neste protocolo, os registros eletrocardiográficos foram de 600 segundos.

Todo o processamento dos sinais da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) foi feito utilizando algoritmos baseados em Matlab (Pereira-Júnior *et al*, 2006) do software Cardioseries (Versão1.1). Após a detecção de pico da onda R, foram gerados tacogramas de 600 segundos, contando todas as flutuações cardíacas dentro deste período de tempo (Pereira-Júnior *et al*, 2006). No domínio do tempo, os índices obtidos foram os seguintes: média do intervalo RR, desvio padrão dos intervalos RR, raiz quadrada das diferenças da média quadrada dos intervalos sucessivos RR (Pereira-Júnior *et al*, 2006; Aubert *et al*, 1999). Para análise espectral da VFC (domínio da frequência), os tacogramas foram redimensionados para intervalos iguais, pelo método de interpolação cúbica, a 10 Hz, e a tendência linear foi removida (Pereira-Júnior *et al*, 2006; Aubert *et al*, 1999). O espectro de potência foi obtido com uma decomposição rápida baseada no método de Fourier

(periodograma de Welch: 256 pontos, 50% de sobreposição, e janela Hamming). Duas faixas de frequência foram determinadas: baixa frequência (LF: 0,2-0,8 Hz), e alta frequência (HF: 0,8-2,5 Hz) e a potência (ms²) foi estimada como a área sob o espectro dentro dessas amplitudes de frequência (Pereira-Júnior *et al*, 2006; Aubert *et al*, 1999).

4.5. Protocolo do estudo Comportamental

4.5.1. Teste do Campo Aberto (TCA)

Descrito pela primeira vez por Archer em 1973, o TCA consiste num aparato quadrangular de acrílico (100 x 100 x 30 cm), com o assoalho dividido em 25 quadrantes de mesmo tamanho. Os animais foram colocados no centro do campo isoladamente e, durante 5 minutos, exploraram livremente os quadrantes. Foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: Atividade vertical, através de movimentos chamados *rearings* (levantamento sobre os membros posteriores, apoiando ou não os membros anteriores nas paredes do campo), atividade horizontal, quantificando-se os quadrantes percorridos, periféricos e central, separadamente, tempo de inatividade, número de *groomings* (autolimpezas), tempo médio de *groomings* e número de bolos fecais. Entre cada teste, a arena foi limpa com solução etanólica de 5% (Archer, 1973; Prickaerts *et al*, 1996; Van der Staay *et al*, 1990). Os testes foram realizados em sala escura (luz vermelha), isolada acusticamente e com temperatura ideal (~22°C), sendo monitorados e gravados por câmeras com infravermelho.

O TCA é amplamente utilizado para mensuração da emocionalidade e atividade exploratória (Matto & Allikmets, 1999), atividade e capacidade motora, medo (Courvoisier *et al.*, 1996) e ansiedade. É um dos testes mais utilizados, juntamente com o Teste de labirinto em cruz elevado, para avaliar a ação de drogas ansiolíticas (Prut & Belzung, 2003).



Figura 6: Prática do TCA no DCF (Acervo do DCF).

4.5.2. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Validado por Pellow *et al*, em 1985, consiste num aparato elevado de uma altura de 45 cm do piso, constituído de dois braços abertos opostos (50 x 10 x 1 cm) e outros dois braços fechados também opostos (50 x 10 x 40 cm), formando uma cruz grega. Os quatro braços são conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm). Cada animal foi colocado isoladamente, com a cabeça voltada para um dos braços fechados e, durante 5 minutos, foram registrados o número absoluto de entradas e o tempo gasto nos braços, além da frequência de entradas no braço aberto (em relação ao total de entradas em todos os braços) e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos. A entrada num dos braços é definida quando os quatro membros do animal estão por completo fora da plataforma central. O LCE é usado amplamente em roedores como protocolo para avaliação do medo e ansiedade (Prickaerts *et al*, 1996; Pellow *et al*, 1985) e para avaliação da ação de drogas ansiolíticas (Rodgers & Johnson, 1995). Também foram registrados o tempo gasto na plataforma central, o número de *head-dippings* / imersões de cabeça (HD) nos braços abertos (não protegido) e entre os braços fechados e a plataforma central (protegido), o número de *stretched attend postures* / estiramentos (SAP) e o número de *rearings*, parâmetros etológicos, utilizados para avaliação de risco, além do número de bolos fecais (Rodgers & Cole, 1993; Rodgers & Dalvi, 1997; MIKICS *et al*, 2005). O número de *rearings* e o número de entradas nos braços fechados também são parâmetros para análise da atividade exploratória.

Um aumento no tempo gasto e número de entradas nos braços abertos correlacionam-se com efeito ansiolítico.

Os testes foram realizados nas mesmas condições do item 4.5.1 e foram monitorados e gravados por câmeras com infravermelho.



Figura 7: Prática do LCE no DCF (Acervo do DCF).

4.5.3. Teste da Preferência pela Sacarose (TPS)

O TPS é um dos testes mais utilizados para diagnóstico de depressão em modelos animais. É através deste que é avaliada a presença ou não da anedonia (item 1.4.1), em outras palavras, a diminuição da busca pelo prazer (Casarotto *et al*, 2007). As mensurações foram realizadas com intervalos de uma semana, durante todo o protocolo. Durante o teste, os animais foram isolados, num período de 24 horas, em pequenas caixas com as dimensões 30x20x13 cm, nas quais eram colocadas, a livre escolha, duas garrafas idênticas, uma contendo solução de sacarose a 1% e outra de água pura (Casarotto *et al*, 2007; Sigwalt *et al*, 2011). O consumo de água e sacarose foi mensurado pelo peso das garrafas antes e após as 24 horas e, a preferência pela sacarose, calculada pela percentagem do consumo da solução de sacarose pela ingestão total de líquido (Rygula *et al*, 2005). Para prevenir os possíveis efeitos da preferência pela ingestão num dos lados da caixa, as garrafas eram trocadas de lugar no teste seguinte. Não houve privação alimentar durante os testes e, após o término, os animais foram realocados em suas caixas habituais e as soluções descartadas.

Fórmula da preferência por Solução de sacarose

$$= \frac{\text{Peso de sacarose consumido}}{\text{Peso de sacarose + Peso de água consumido}} \times 100$$

4.6. Protocolo do estudo *post-mortem*

4.6.1. Eutanásia e retirada dos órgãos

Na nona semana após a cirurgia de IM, os animais foram submetidos a eutanásia pelo método de decaptação. Os corpos foram fixados numa pequena mesa artesanal de madeira, e com auxílio de uma pinça de dissecação dente de rato e uma tesoura cirúrgica, a cavidade tóraco - abdominal foi aberta. Com uma pinça curva, coração, pulmão e fígado foram dissecados e removidos, retirando em seguida todo o excesso de tecidos adjacentes. Cada coração foi cortado em quatro fatias de mesma largura, denominadas A, B, C e D. A porção C, que possui a percentagem de área infartada mais próxima a da total (Spadaro *et al*, 1980) foi armazenada em solução de formaldeído a 10 %.

Na cabeça, após expor todo o osso craniano e abrí-lo dorsalmente com auxílio de um pequeno alicate, o cérebro, cerebelo e tronco cerebral foram expostos. Após retirá-los com uma pequena pinça curva, com uma lâmina cirúrgica foi realizado um corte sagital, dividindo os hemisférios cerebrais. Com auxílio do Atlas Paxinos & Watson, 1997 (Anteroposterior: Bregma -7.04 x -9.68 / Dorsoventral : Bregma -5.60 x -7.60 / Interaural -0.40 x 0.40), todo o NDR foi retirado, sendo

colocado posteriormente em eppendorfs de 0,5 ml. Durante o protocolo de eutanásia, os eppendorfs foram colocados em recipiente com nitrogênio líquido. Ao final de todo o protocolo, todos foram alocados no freezer -80° C do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ.

4.6.2. Histopatologia Miocárdica

Todos os cortes foram armazenados em álcool absoluto durante 24 horas, submetidos ao protocolo histotécnico, incluídos e posteriormente “emblocados” em parafina para corte em micrótomo. Após resfriamento, cortes de aproximadamente cinco µm foram fixados em lâminas histológicas, sendo posteriormente corados pela técnica de hematoxilina-eosina (Caldas *et al*, 2011). Os protocolos seguem abaixo:

Soluções:

1. Hematoxilina de Harris

Hematoxilina.....	0,5 g
Álcool absoluto.....	5,0 ml
Álumen de Potássio ou Amônio.....	10,0 g
Óxido Vermelho de Mercúrio.....	0,25 g
Água Destilada.....	100,0 ml

Dissolver a hematoxilina no álcool, e o alúmen na água quente. Misturar as duas soluções. Levar a mistura à ebulição, depois, remover o fogo e juntar o óxido de mercúrio. Aquecer, novamente, a solução até ficar de cor vermelha escura, durante um minuto; em seguida, remover do fogo o recipiente e deixa-lo esfriar rapidamente em água fria na geladeira. A solução, depois de resfriada, está pronta para uso.

2. Eosina

Eosina Y.....	0,5 g
Água Destilada.....	10,0 ml
Álcool a 95 ⁰	90,0 ml
Ácido Acético.....	1 gota

Dissolver a eosina em água destilada e depois juntar o álcool.

3. Diferenciador para a hematoxilina

Álcool a 95^o 100,0 ml

Ácido Acético Clorídrico..... 5 gotas

Método:

- Desparafinizar e hidratar os cortes;
- Hematoxilina durante 2,5 minutos;
- Água corrente;
- Diferenciar rapidamente em álcool ácido;
- Água corrente por 10 minutos para azular o corte;
- Eosina por 2 minutos
- Desidratar, clarificar e montar

4.6.2.1. Análise Histopatológica

A análise com hematoxilina-eosina foi feita usando um microscópio Nikon Eclipse E-200 (EUA). Os cortes foram gravados e armazenados com uma câmera digital e, em seguida, os arquivos digitais foram analisados com o software *ImageJ (version 1.27z, National Institute of Health, E.U.A.)* que permitiu medir o tamanho do infarto do corte C e , de forma aproximada, do ventrículo esquerdo (VE).

4.7. Protocolo do estudo biomolecular

Todo o protocolo biomolecular foi realizado no Laboratório de Endocrinologia Molecular – LEM, localizado no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, prédio de ciências da saúde, UFRJ, Ilha do Fundão, RJ.

4.7.1. Extração do RNA

Para isolamento do RNA total foi utilizado o método do TRIzol (*TRIzol Reagent, Invitrogen*, EUA). As amostras de NDR foram retiradas do freezer - 80°C e imediatamente homogeneizadas em 1 ml de TRIzol em poços de 3,5cm de diâmetro, promovendo assim a lise celular. Em seguida, as misturas foram centrifugadas por dez minutos a 12000 r.p.m. em centrífuga refrigerada (4°C), para retirada de todo o material insolúvel. Durante cinco minutos, permaneceram incubadas para dissociação dos complexos nucleoproteicos, adicionando em seguida 200 µl de clorofórmio e agitando rigorosamente por 15 segundos, ficando novamente incubadas por três minutos. Após nova centrifugação a 12000 r.p.m. durante quinze minutos, os sobrenadantes contendo o RNA total foram passados para outros tubos,

adicionando-se 500 µl de isopropanol em cada um. Durante dez minutos as misturas permaneceram incubadas, sendo centrifugadas novamente a 12000 r.p.m. por 10 minutos, permitindo a precipitação do RNA. O sobrenadante foi removido, sendo adicionado 1 ml de etanol a 75%, passando mais uma vez por centrifugação a 7400 rotações por minuto, por cinco minutos. Por fim, o sobrenadante foi removido, deixando o ependdorf contendo o RNA aberto até a evaporação de todo o etanol, sendo o RNA ressuspendido em água livre de RNase e DNase (água DEPC).

Ao final da extração a pureza do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2 % e a quantificação foi feita por leitura da absorbância em espectrofotômetro a 260 e 280 nanômetros.

4.7.2. Construção do cDNA – Transcrição Reversa

A transcrição reversa do RNAm para obtenção do cDNA foi realizada utilizando a enzima *Superscript III* (Invitrogen, EUA) e oligo-dT (Promega, EUA) usando o protocolo fornecido pelo fabricante. Inicialmente, 1 µg de RNA foi incubado com oligo-dT (iniciador da reação), dNTPs (10 mM de cada - dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Promega, EUA) e água a 65°C por 5 minutos em termociclador para anelamento. Posteriormente, foram acrescentados tampão *first strand* e DTT, fornecidos pelo kit, e a enzima, incubando novamente a 42°C por 50 minutos. A reação foi terminada após nova incubação das misturas a 70°C por 15 minutos. Os cDNAs obtidos foram armazenados a 4°C até a sua utilização.

4.7.3. PCR em Tempo Real (Real-Time PCR)

Para a reação de amplificação, o cDNA obtido foi adicionado a uma placa de reação junto com uma mistura contendo os *primers* específicos e tampão iQ SYBR Green Supermix™ (Bio-Rad, EUA), que contém 100 mM de KCl, 40 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,4 mM de cada dNTP, 50 U/mL iTaq DNA polimerase, 6 mM de MgCl₂, SYBR GreenI e 20 nM de fluoresceína. As amostras foram analisadas em duplicata na 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, EUA), que detecta mudanças na concentração das amostras por fluorescência. Após uma desnaturação à 95°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, a reação foi repetida por 44 ciclos de 95°C por 15 segundos, 1 ciclo de 60°C por 30 segundos e 1 ciclo de 70°C por 45 segundos.

A tabela 1 contém os primers utilizados para analisar a expressão do RNAm nas células do NDR para os genes da TPH₂ e 36B4, este último utilizado como controle interno.

Tabela 1: *Primers* utilizados para PCR em tempo real.

<i>Primers</i>	Sequência
36B4 For	TGT TTG ACA ACG GCA GCA TTT
36B4 Rev	CCG AGG CAA CAG TTG GGT
TPH2 Rev	GGA GAA ATT TGA GGT GTG CGT GCT
TPH2 For	ACT CTG CAT AGA GGC ATC ACA GGA

O sistema é baseado na detecção dos produtos de amplificação pelo corante, que se intercala em DNA fita dupla. O corante SYBR Green começa a emitir fluorescência assim que se liga ao DNA. Quanto mais corante ligado ao DNA, maior será a emissão de fluorescência, assim é possível acompanhar o crescimento exponencial de DNA na amostra. A medição da fluorescência foi feita pelo aparelho de Real-time PCR a 520 nm. A padronização foi realizada quantificando diferentes diluições de cDNA para os diferentes genes. No PCR em tempo real, a quantidade de fluorescência aumenta de forma exponencial com o aumento de DNA produzido. Nessa exponencial, uma linha limiar foi traçada, que foi usada para calcular o CT (*cycle threshold*) de cada amostra, ou seja, o ciclo de PCR no qual a fluorescência cruza a linha de base. O valor de CT é proporcional à quantidade inicial de amostra na reação (quanto maior a concentração do DNA de estudo, menor é o valor de CT). A quantidade de RNA utilizado para a produção de cDNA não é completamente confiável, pois a qualidade do RNA pode ser diferente ou mesmo a sua quantificação pode ter sido inexata. Para tanto, utilizamos um controle interno, ou seja, um gene que não altera sua produção nas diferentes manipulações do estudo. Assim, normalizando o gene de estudo (diminuindo o valor CT do gene controle do CT do gene de estudo), foi possível comparar diferenças entre os grupos experimentais. Com esses valores pudemos normalizar os valores de CT de amostras diferentes para uma mesma quantidade de cDNA.

Após a normalização das amostras, o grupo controle teve seu valor convertido para 1 e os outros grupos tiveram seus valores convertidos em relação a ele conforme o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Com esses valores foram feitas as análises estatísticas. O produto final de amplificação é corrido em gel de agarose, para verificação da amplificação de banda única.

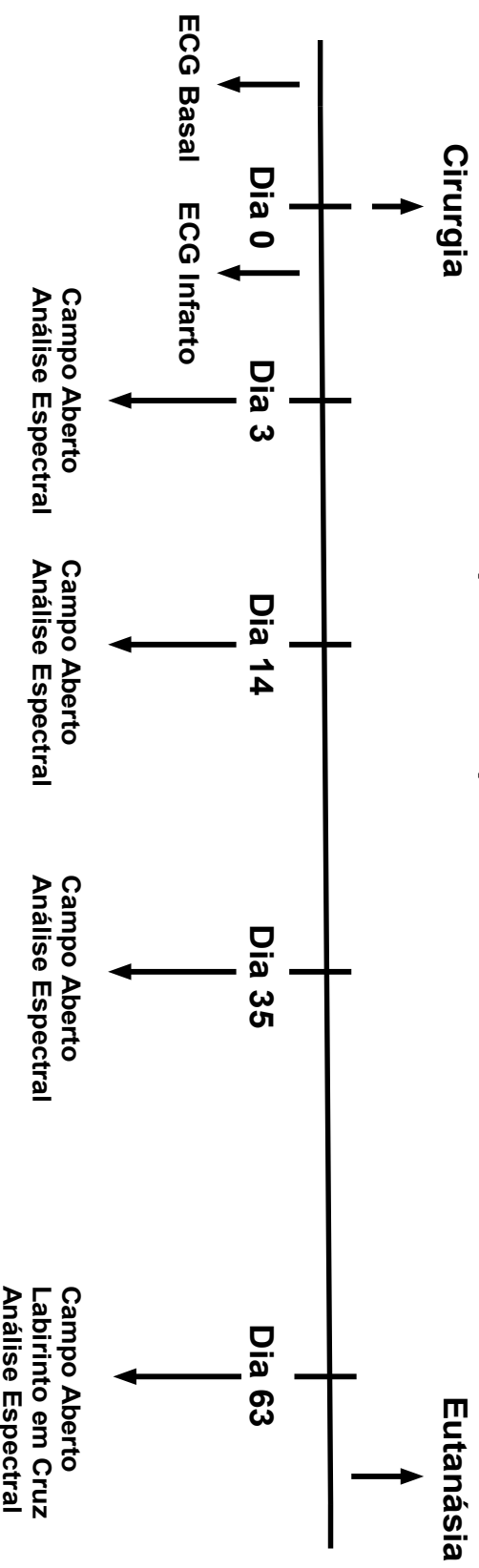
4.8. Análise estatística

A análise estatística foi usada para a comparação dos resultados apresentados pelos grupos experimentais. No caso de comparação entre os quatro grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via e o teste Bonferroni

como *post hoc*. Para a comparação de resultados dos quatro grupos em tempos diferentes, foi utilizada a análise de variância de duas vias, utilizando posteriormente também o teste de Bonferroni. Em todos os testes, o grau mínimo de significância considerado foi 95% ($p < 0,05$) e os cálculos foram realizados no computador, com auxílio do software *Graphpad Prism (version 5.0)*

Protocolo Experimental

* Teste de preferência pela Sacarose - Semanal



5. RESULTADOS

5.1. Mortalidade após as cirurgias

Antes do início do experimento, os oitenta animais destinados ao protocolo sugerido foram divididos entre os grupos infarto e sham, com $n = 56$ e $n = 24$, respectivamente. No período crítico de vinte e quatro horas após a cirurgia, nas quais os animais recuperam-se da anestesia e de todos os procedimentos cirúrgicos, a mortalidade (Tabela 2 – Apêndice 1), calculada com o número de animais sobreviventes a cirurgia, foi de 20% no grupo Infarto + Veículo (três), 28,57% no grupo Infarto + Fluoxetina (quatro) e de 10% nos grupos Sham + Veículo e Sham + Fluoxetina (um em cada).

A partir das vinte e quatro horas após a cirurgia até o final do experimento, no grupo Sham + Veículo, apenas um animal morreu, na primeira semana. No grupo Sham + Fluoxetina, não houve mortalidade nesse período. No grupo Infarto + Veículo, três animais morreram na primeira semana, um na terceira e um na quinta. No grupo Infarto + Fluoxetina, dois animais morreram na primeira semana e um na segunda.

5.2. Peso dos animais

5.2.1. Efeito do IM e das administrações de fluoxetina na evolução do peso corporal.

Na Tabela 3 (Apêndice 1) se encontram organizadas, de forma seriada, as médias das evoluções (em porcentagem) dos pesos dos grupos durante todo o protocolo experimental. O IM não alterou a evolução dos pesos, tendo em vista que o grupo Infarto + Veículo não mostrou diferenças em relação ao grupo Sham + Veículo. O grupo Sham + Fluoxetina, na semana do dia 35 pós-cirurgia, mostrou diminuição do ganho de peso em relação ao grupo Sham + Veículo ($28,48 \pm 0,34$ vs $34,38 \pm 0,73$, $p < 0,05$). Esta diferença se manteve nas quatro pesagens seguintes, até a última semana do protocolo ($47,99 \pm 0,76$ vs $56,78 \pm 1,01$, $p < 0,05$). O grupo Infarto + Fluoxetina também mostrou diferenças na evolução em relação ao grupo Sham + Veículo, na quinta semana ($27,89 \pm 1,28$ vs $34,38 \pm 0,73$, $p < 0,05$). Porém, desta vez, as diferenças significativas só se repetem nas duas últimas semanas do experimento (56 dias: $44,09 \pm 0,49$ vs $50,11 \pm 1,30$, $p < 0,05$; 63 dias: $48,48 \pm 0,59$ vs $56,78 \pm 1,01$, $p < 0,05$). O grupo Infarto + Fluoxetina não apresentou diferença em relação ao seu controle, Sham + Fluoxetina. Provavelmente, o tratamento com antidepressivo teve influências na diminuição do ganho de peso.

5.3. Testes comportamentais

5.3.1. Teste do Campo Aberto

5.3.1.1. Efeito do IM e das administrações de fluoxetina no comportamento exploratório horizontal no Teste de Campo Aberto.

A exploração dos animais no teste do campo aberto constitui-se basicamente em dois tipos: exploração horizontal, relacionada à quantidade de quadrantes totais percorridos e a exploração vertical, relacionada unicamente ao número de *rearings*. Neste protocolo, particularmente, o grupo Infarto + Veículo apresentou alterações no comportamento exploratório horizontal padrão, revelado pelo grupo Sham + Veículo, o que não foi observado no grupo Infarto + Fluoxetina (Figura 8). No teste realizado trinta e cinco e sessenta e três dias após o IM, os animais do grupo Infarto + Veículo percorreram menos quadrantes periféricos quando comparados aos animais do grupo Sham + Veículo (35 dias: $80,4 \pm 8,6$ vs $106,6 \pm 6,6$, $p < 0,01$; 63 dias: $73,29 \pm 7,40$ vs $93,89 \pm 5,80$, $p < 0,05$, respectivamente). Nos animais infartados tratados com fluoxetina, esta diferença não foi observada, sendo as médias mais próximas do grupo Sham + Veículo (35 dias: $107,4 \pm 4,5$ vs $106,6 \pm 6,6$; 63 dias: $96,00 \pm 9,31$ vs $93,89 \pm 5,80$). Tais resultados sugerem que, de alguma forma, o IM gerou alterações que culminaram na diminuição da atividade exploratória horizontal, e que o tratamento com fluoxetina foi eficaz em impedir. Por outro lado, no teste realizado trinta e cinco dias pós IM, os animais do grupo Sham + Fluoxetina mostraram aumento significativo na atividade exploratória quando comparados aos animais do grupo Sham + Veículo ($130,2 \pm 8,9$ vs $106,6 \pm 6,6$, $p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos nos testes realizados três e quatorze dias pós-cirurgia.

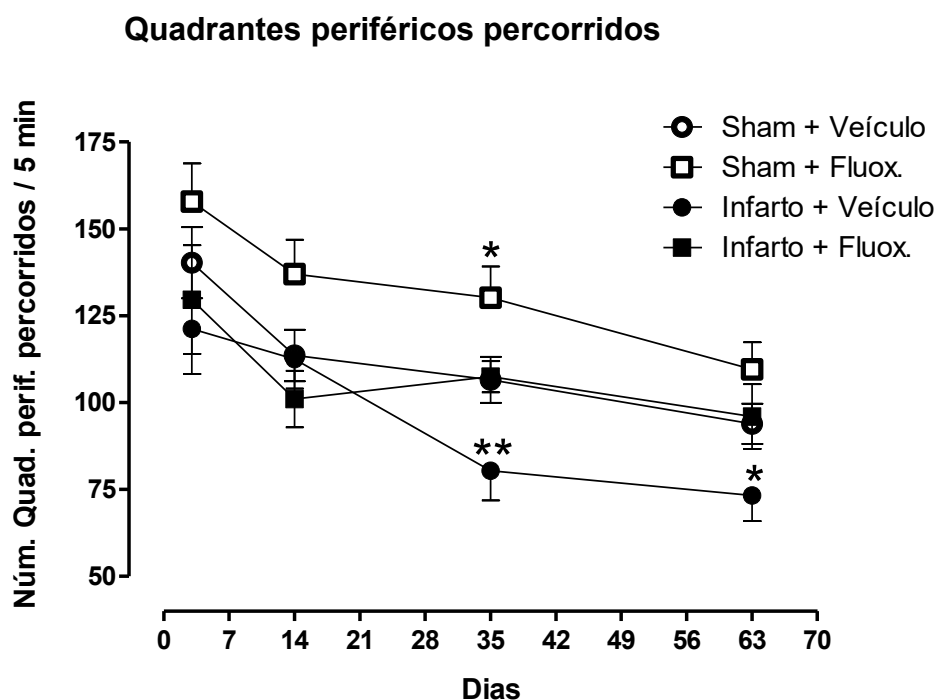


Figura 8: Número de quadrantes periféricos percorridos nos quatro testes. Note que o grupo Infarto + Veículo, trinta e cinco e sessenta e três dias pós-infarto, percorreu menos quadrantes periféricos em relação aos animais Sham + Veículo, e que o mesmo não aconteceu nos animais infartados tratados com fluoxetina.. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação aos animais do grupo Sham + Veículo no mesmo tempo de avaliação.

No teste realizado sessenta e três dias pós IM, os animais do grupo Sham + Fluoxetina realizaram maior número de passagens pelo quadrante central (Figura 9) quando comparados aos do grupo Sham + Veículo ($4,89 \pm 0,63$ vs $2,56 \pm 0,50$, $p < 0,05$), corroborando novamente as diferenças no tratamento evidenciadas acima no grupo sham nos quadrantes periféricos. Curiosamente, enquanto a fluoxetina foi eficaz em aumentar esse parâmetro no grupo sham (Sham + Fluoxetina), o mesmo não foi observado no grupo infartado (Infarto + Fluoxetina) ($2,00 \pm 0,44$ vs $2,56 \pm 0,50$).

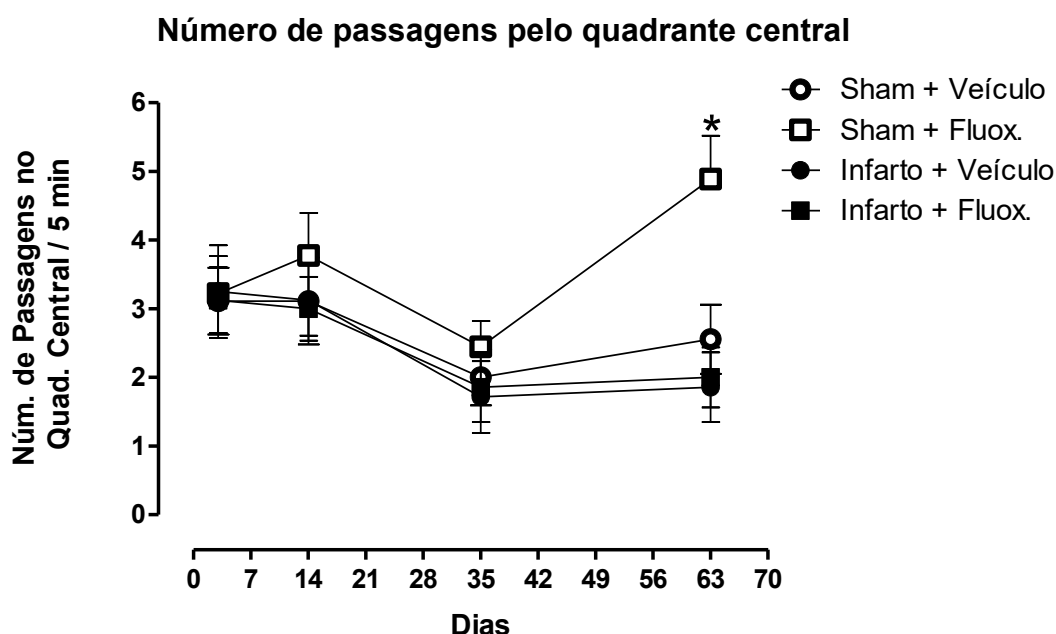


Figura 9: Número de passagens pelo quadrante central nos quatro testes realizados. Os animais do grupo Sham + Fluoxetina passaram mais vezes pelo quadrante central quando comparados ao grupo Sham + Veículo, no teste realizado sessenta e três dias pós IM. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo Sham + Veículo no mesmo tempo de avaliação.

5.3.1.2. Efeito do IM e das administrações de fluoxetina no tempo de inatividade no Teste de Campo Aberto

Na Figura 10, observam-se novamente alterações nos animais do grupo Infarto + Veículo, relacionados desta vez a exploração total do teste. Os animais deste grupo mostraram aumento significativo do tempo de inatividade em relação aos do grupo Sham + Veículo, nos testes realizados trinta e cinco ($183,2 \pm 18,57$ vs $137,3 \pm 13,15$, $p < 0,05$) e sessenta e três dias ($207,90 \pm 15,79$ vs $154,80 \pm 9,93$, $p < 0,05$) pós IM, alteração esta ocorrida provavelmente pelo menor número de quadrantes percorridos nos mesmos testes somados ao número reduzido de rearings (Figura 11). O tratamento com fluoxetina nos animais infartados impediu este aumento, haja vista que os animais deste grupo permaneceram inativos por tempos próximos aos animais dos grupos Sham + Veículo (35 dias: $130,00 \pm 12,58$

vs 137.3 ± 13.15 ; 63 dias: 151.10 ± 1.71 vs 154.80 ± 9.93) e Sham + Fluoxetina (35 dias: $130,00 \pm 12,58$ vs 119.8 ± 9.9 ; 63 dias: 151.10 ± 1.71 vs 144.40 ± 15.46).

Tempo de Inatividade Total

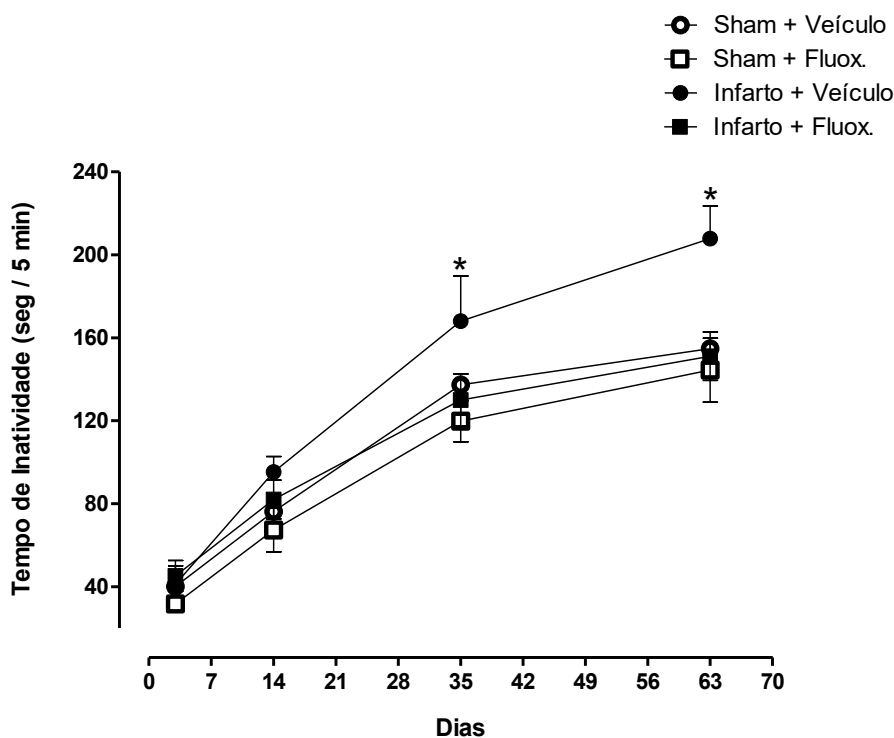


Figura 10: Tempo de inatividade nos quatro testes realizados. Trinta e cinco e sessenta e três dias pós IM, o tempo de inatividade foi menor nos animais do grupo Infarto + Veículo em relação aos animais Sham + Veículo, alteração que não ocorreu nos animais do grupo Infarto + Fluoxetina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham + Veículo no mesmo tempo de avaliação.

5.3.1.3. Efeito do IM e das administrações de fluoxetina no comportamento exploratório vertical no Teste do Campo Aberto.

O número de ambulações foi consideravelmente menor no grupo Infarto + Veículo em relação ao grupo Sham + Veículo (Figura 11), em todos os tempos de avaliação (3 dias: $27,25 \pm 3,69$ vs $36,78 \pm 3,13$, $p < 0,05$; 14 dias: $20,75 \pm 2,90$ vs $32,44 \pm 3,73$, $p < 0,01$; 35 dias: $20,29 \pm 2,88$ vs $33,56 \pm 3,72$, $p < 0,01$; 63 dias: $15,29 \pm 2,89$ vs $25,56 \pm 2,81$, $p < 0,05$). Neste caso, o tratamento com fluoxetina não reverteu as alterações observadas no grupo infartado, observando-se diferença também em relação grupo Sham + Veículo em todos os testes (3 dias $25,75 \pm 4,51$ vs $36,78 \pm 3,13$, $p < 0,05$; 14 dias: $23,25 \pm 2,70$ vs $32,44 \pm 3,73$, $p < 0,01$; 35 dias: $24,29 \pm 3,48$ vs $33,56 \pm 3,72$, $p < 0,05$; 63 dias $15,43 \pm 2,10$ vs $25,56 \pm 2,81$, $p < 0,05$) e ao seu próprio controle, Sham + Fluoxetina (3 dias: $25,75 \pm 4,51$ vs $39,44 \pm 3,53$, $p < 0,01$; 14 dias: $23,25 \pm 2,70$ vs $39,67 \pm 3,38$, $p < 0,001$; 35 dias: $24,29 \pm$

3,48 vs 36,44 ± 5,58, p < 0,01; 63 dias: 15,43 ± 2,10 vs 25,44 ± 4,19, p < 0,01) . Não houve diferenças entre os grupos controle.

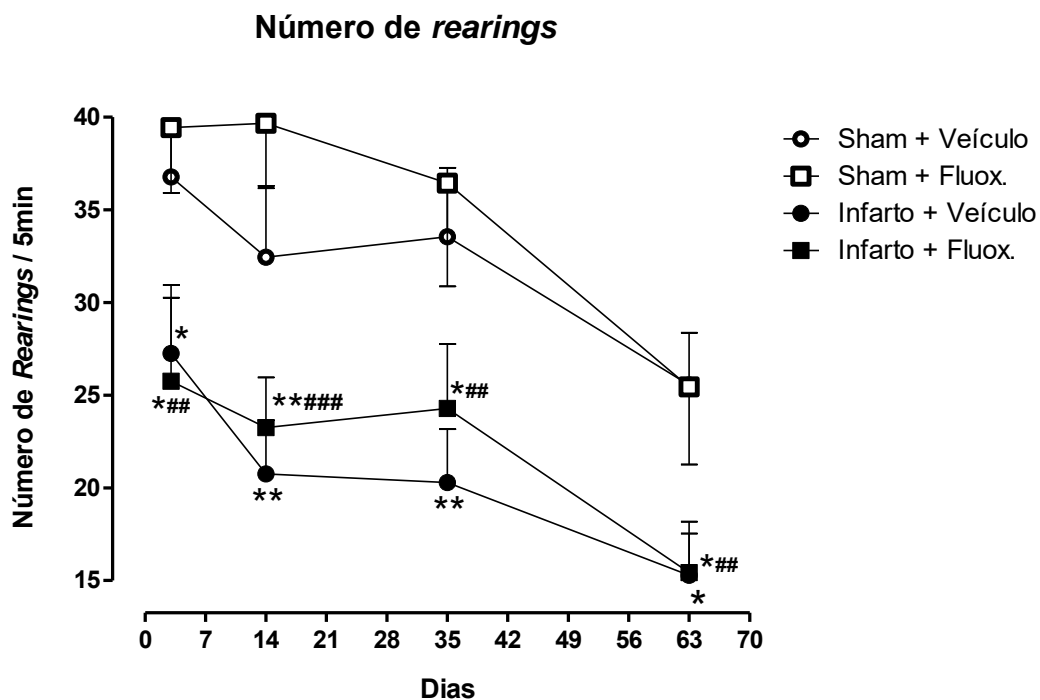


Figura 11: Número de *rearings*. Pode ser observada claramente diminuição do número de *rearings* entre os animais infartados, tratados com veículo ou fluoxetina em relação aos animais dos grupos sham. * p < 0,05 e ** p < 0,01 em relação ao grupo Sham + Veículo. ## p < 0,01 em relação ao grupo Sham + Fluoxetina no mesmo tempo de avaliação.

5.3.1.4. Efeito do IM e das administrações de fluoxetina no número de *groomings*, tempo médio de *groomings* e número de bolos fecais no Teste de Campo Aberto.

Não foram observadas alterações significativas entre os grupos em nenhum dos três parâmetros (Figura 12).

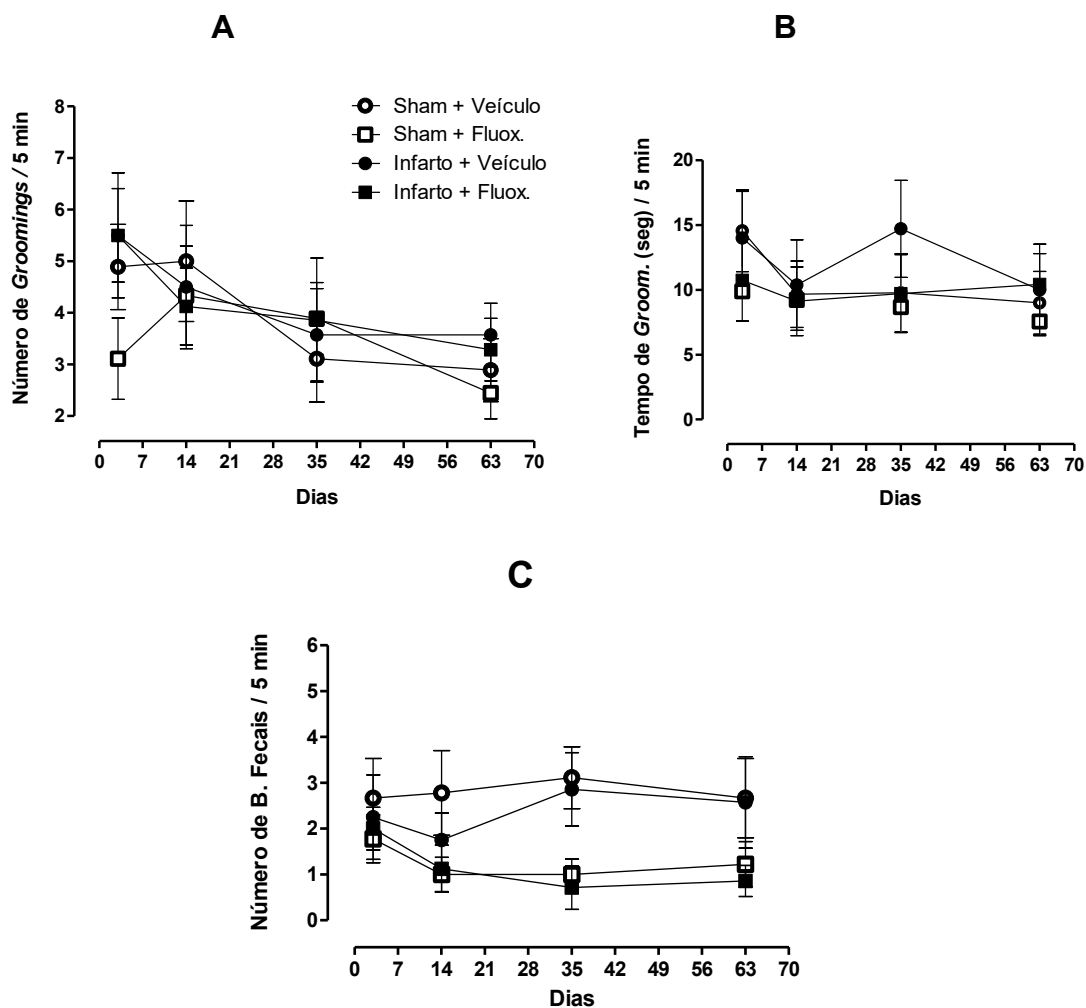


Figura 12. A: Número de *groomings*; B: Tempo médio de *groomings*; C: Número de bolos fecais. Não houve diferença significativa entre os grupos em todos os parâmetros, em nenhum dos testes realizados.

5.3.2. Efeito do IM e das administrações de fluoxetina no comportamento no LCE.

A Tabela 3 (apêndice 1) mostra todos os parâmetros analisados no LCE. Dentre todos os parâmetros relacionados à ansiedade, não houve diferença em nenhum deles entre os grupos. Nos parâmetros relacionados à atividade exploratória, apenas os *rearings* mostraram-se diferentes, num perfil similar as alterações visualizadas no teste de campo aberto. O número de *rearings* (Figura 13) realizados pelos animais dos grupos Infarto + Veículo foi consideravelmente menor quando comparados aos animais do grupo Sham + Veículo ($6,21 \pm 2,13$ vs $15,34 \pm 4,73$, $p < 0,05$), perfil semelhante aos do grupo Infarto + Fluoxetina, em relação ao grupo Sham + Veículo ($7,02 \pm 2,85$ vs $15,34 \pm 4,73$, $p < 0,05$) e o seu controle Sham + Fluoxetina ($7,02 \pm 2,85$ vs $19,60 \pm 4,99$, $p < 0,05$). Não houve diferença neste parâmetro entre os grupos controle. O número de bolos fecais foi significativamente menor nos grupos Sham + Fluoxetina e Infarto + Fluoxetina quando comparados aos grupos tratados com veículo, o que sugere influências do fármaco no número de bolos fecais liberados (vide apêndice 1).

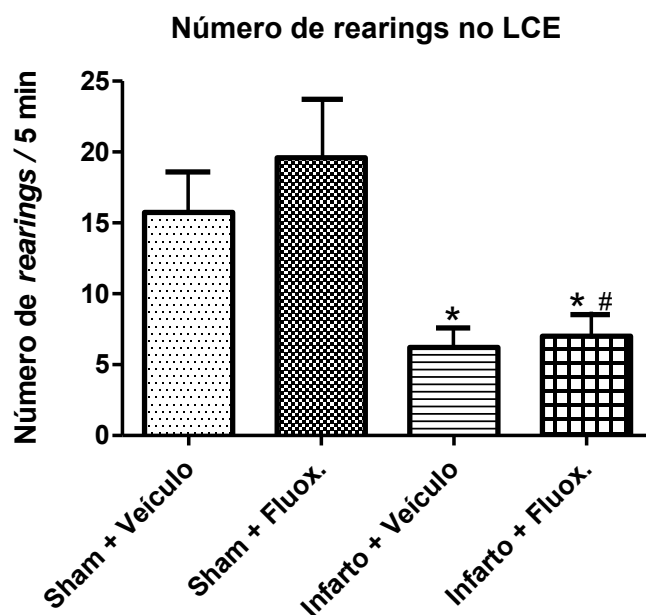


Figura 13: Número de *rearings* realizados pelos animais no LCE. Similarmente ao TCA, os animais do grupos Infarto + Veículo exploraram menos verticalmente o teste em relação ao grupo Sham + Veículo. O tratamento com fluoxetina não influenciou neste parâmetro. O grupo Infarto + Fluoxetina também realizou menos *rearings*, em relação aos dois grupos controle. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham + Veículo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham + Fluoxetina.

5.3.3. Efeito do IM e das administrações de fluoxetina no Teste de Preferência pela Sacarose.

Como mostrado na Figura 14, podem ser observadas, mais uma vez, alterações promovidas pelo infarto. Inicialmente, no teste realizado na semana do dia 28, o grupo Infarto + Veículo mostrou diminuição significativa da preferência pela solução de sacarose em relação ao grupo Sham + Veículo ($85,92 \pm 2,58$ vs $94,10 \pm 1,57$, $p < 0,01$). Essa diferença estendeu-se até a última semana do experimento ($81,10 \pm 1,99$ vs $96,58 \pm 1,24$, $p < 0,01$). O tratamento com fluoxetina novamente foi eficaz, desta vez impedindo o aparecimento da anedonia. O grupo Infarto + Fluoxetina não apresentou diferença na preferência em relação aos grupos controle, em nenhuma das mensurações.

Teste da preferência pela sacarose

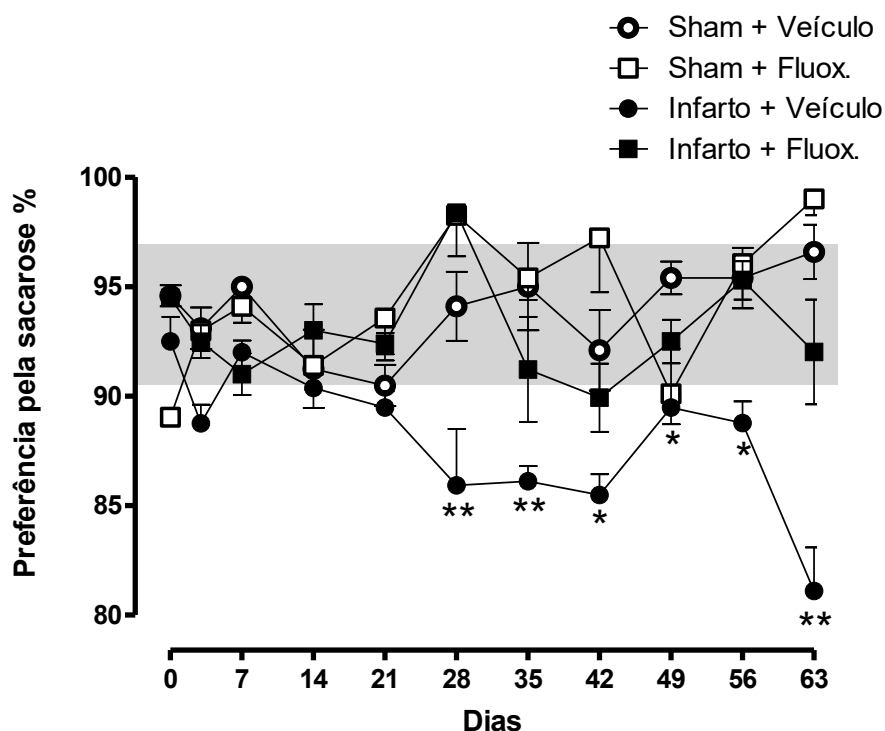


Figura 14: Teste da preferência pela sacarose. A partir do teste realizado no dia vinte e oito (quarta semana) até o último no dia sessenta e três (nona semana), o grupo Infarto + Veículo apresentou diminuição na preferência. O grupo infarto tratado com fluoxetina não apresentou diferenças em relação ao grupo Sham + Veículo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, todos em relação ao grupo Sham + Veículo. A faixa cinza representa os valores normais (médias mínimas e máximas) encontrados no grupo Sham + Veículo ao longo do experimento.

5.4. Análise Espectral

5.4.1. Efeito do IM e das administrações de fluoxetina na variabilidade da frequência cardíaca e no balanço simpátovagal.

Nos registros realizados três dias após o IM, os animais do grupo Infarto + Veículo apresentaram aumento do tônus simpático em relação aos animais do grupo Sham + Veículo, o que refletiu nas potências das bandas de baixa frequência (Figura 15A), significativamente aumentadas ($269,90 \pm 69,17$ vs $56,29 \pm 18,88$, $p < 0,05$). Estas mesmas alterações também foram observadas nos animais do grupo Infarto + Fluoxetina ($232,50 \pm 51,35$ vs $56,29 \pm 18,88$, $p < 0,05$), inclusive em relação a seu próprio controle Sham + Fluoxetina ($232,50 \pm 51,35$ vs $56,72 \pm 14,75$, $p < 0,05$) sugerindo que a fluoxetina não exerceu nenhuma influência sobre esse parâmetro. Não houve diferenças entre os grupos controle.

O aumento do tônus do SNA simpático é confirmado nos dois grupos infartados visualizando-se o gráfico B da Figura 15. Este mostra novamente os valores das potências de baixa frequência, desta vez normalizados, aumentado no

grupo Infarto + Veículo em relação ao grupo Sham + Veículo ($47,60 \pm 7,39$ vs $22,33 \pm 4,58$, $p < 0,05$). O grupo Infarto + Fluoxetina apresentou diferença para o grupo Sham + Veículo ($40,40 \pm 7,59$ vs $22,33 \pm 4,58$, $p < 0,05$) e Sham + Fluoxetina ($40,40 \pm 7,59$ vs $21,31 \pm 4,72$, $p < 0,05$).

Potência de Baixa Frequência três dias pós IM

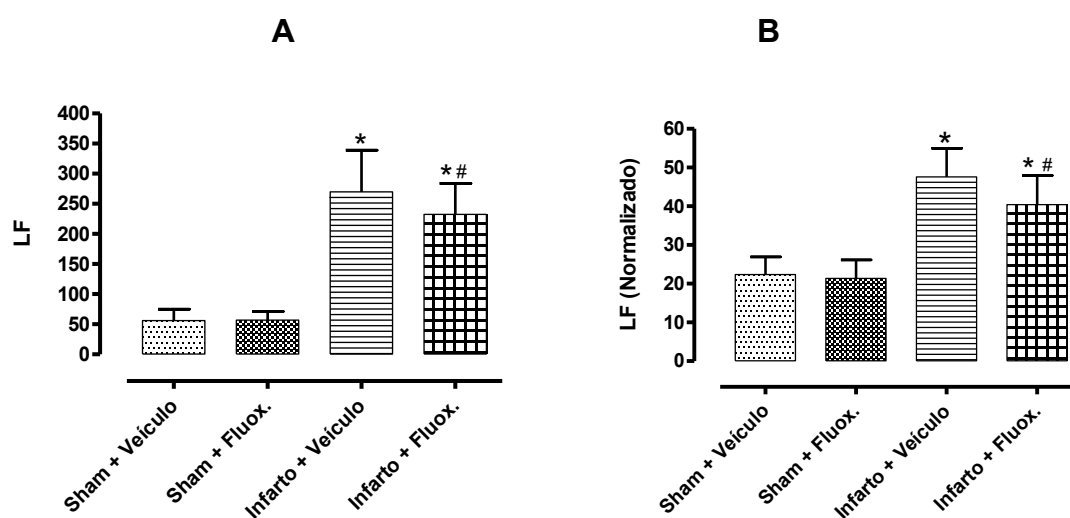


Figura 15: Média das amplitudes das ondas de baixa frequência absoluta (A: LF = *low frequency*) e em unidades normalizadas (B) três dias pós-cirurgia. Nos dois gráficos observam-se mudanças na média das amplitudes, nos dois grupos submetidos ao IM.* $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham + Veículo; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham + Fluoxetina.

No teste seguinte, realizado quatorze dias após a cirurgia, somente os animais do grupo Infarto + Fluoxetina apresentaram aumento significativo na potência das bandas de baixa frequência, no parâmetro não normalizado (Figura 16), desta vez apenas em relação ao seu grupo controle, Sham + Fluoxetina ($249,60 \pm 58,32$ vs $76,07 \pm 27,72$, $p < 0,05$).

Potência de Baixa Frequência quatorze dias pós-IM

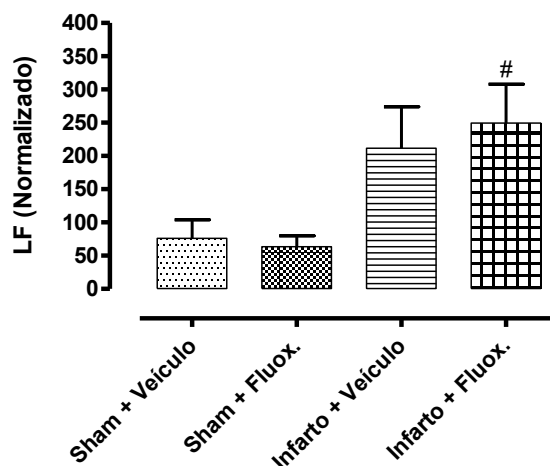


Figura 16: Gráfico referente as médias das amplitudes da onda de baixa frequência (LF) em unidades normalizadas, quatorze dia pós cirurgia. Apenas o grupo Infarto + Fluoxetina apresentou aumento significativo, em relação ao grupo Sham + Fluoxetina. # $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham + Fluoxetina.

Nos registros realizados trinta e cinco e sessenta e três dias após a cirurgia, não houve diferenças entre os grupos na amplitude das ondas de baixa frequência.

Nestes mesmos registros, não foram observadas alterações no parâmetro referente diretamente ao domínio do tempo, isto é, na variabilidade da frequência cardíaca (RMSSD) e nas amplitudes das ondas de alta frequência, mais relacionadas ao tônus parassimpático.

A Figura 17 mostra um gráfico que representa, de forma seriada, as médias das potências das bandas de baixa frequência em todos os grupos, mostrando o aumento no tônus simpático e sua posterior queda nos animais infartados.

Evolução de LF

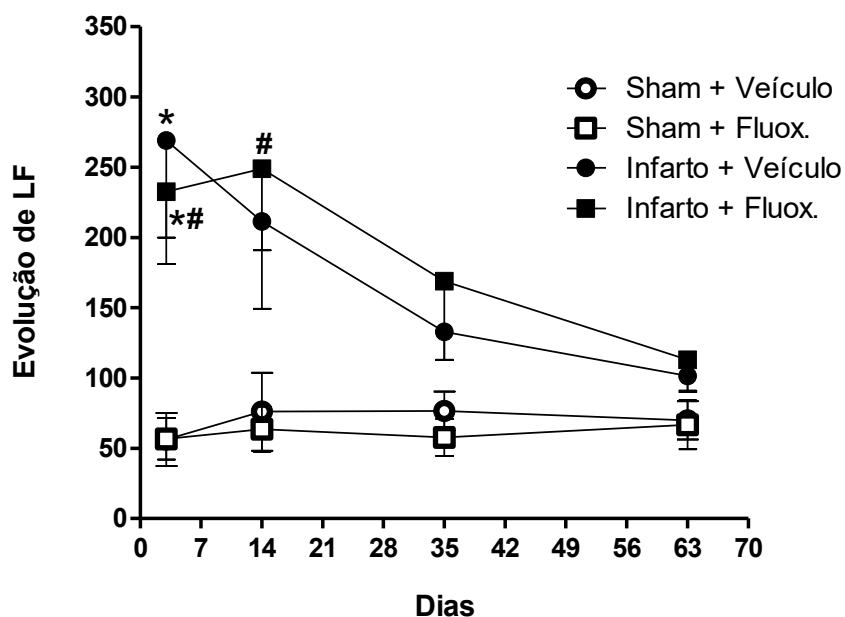


Figura 17: Médias dos valores de amplitude das ondas de LF dos grupos Infarto + Veículo e Infarto + Fluoxetina, durante todo o protocolo experimental. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham + Veículo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham + Fluoxetina

Nas tabelas 5, 6, 7 e 8 (vide apêndice), podem ser observados todos os parâmetros não significativamente diferentes entre os grupos, nos registros realizados três, quatorze, trinta e cinco e sessenta e três dias após a cirurgia. Dentre eles, os valores das médias das potências alta frequência (inclusive normalizadas), da frequência cardíaca, da variabilidade da frequência cardíaca, e da razão entre as médias de baixa frequência e alta frequência (também normalizadas), usada para verificar o predomínio do tônus simpático em relação ao parassimpático. Estão incluídos também, todos os valores de baixa frequência descritos anteriormente.

5.5. Patologia

5.5.1. Efeito do IM e das administrações de fluoxetina no peso relativo cardíaco

Na Figura 18, pode ser observado aumento do peso relativo do coração dos grupos Infarto + Veículo em relação ao grupo Sham + Veículo ($4,91 \pm 0,45$ vs $3,29 \pm 0,11$, $p < 0,01$) e Infarto + Fluoxetina também para o grupo Sham + Veículo ($5,02 \pm 0,33$ vs $3,21 \pm 0,11$, $p < 0,01$) e para o seu controle Sham + Fluoxetina ($5,02 \pm 0,33$ vs $3,21 \pm 0,09$, $p < 0,01$). A insuficiência cardíaca gerou aumento da massa do miocárdio dos animais infartados, e o tratamento com fluoxetina não influenciou neste remodelamento anatômico.

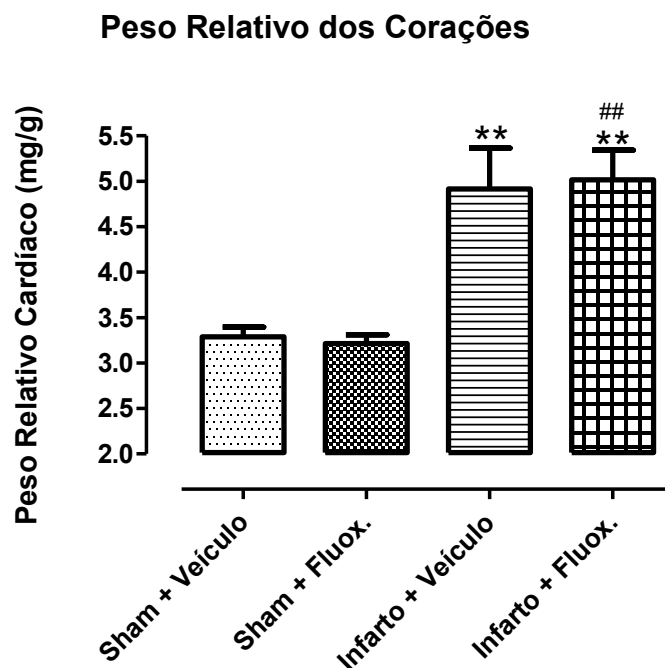


Figura 18: Média dos pesos relativos dos corações de todos os grupos. Note que o IM gerou aumento desproporcional da massa do miocárdio ao peso total dos animais infartados, e que a fluoxetina não influenciou nesta mudança. ** $p < 0,01$ em relação ao Grupo Sham + Veículo; ## $p < 0,01$ em relação ao grupo Sham + Fluoxetina.

5.5.2. Efeito do IM e das administrações de fluoxetina no peso relativo pulmonar.

O IM aumentou também do peso relativo dos pulmões (Figura 19) dos animais dos grupos Infarto + Veículo em relação ao grupo Sham + Veículo ($6,74 \pm 0,91$ vs $4,81 \pm 0,29$, $p < 0,05$) e do grupo Infarto + Fluoxetina em relação ao grupo Sham + Veículo ($6,53 \pm 0,47$ vs $4,81 \pm 0,29$, $p < 0,05$) e Sham + Fluox. ($6,53 \pm 0,47$ vs $4,81 \pm 0,29$, $p < 0,05$). Novamente, a fluoxetina não influenciou nesta mudança.

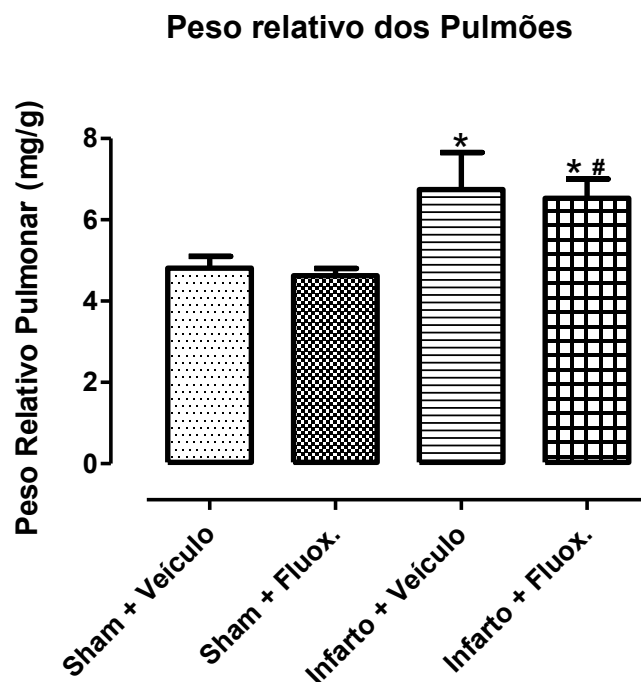


Figura 19: Média dos pesos relativos dos pulmões de todos os grupos em mg/g. Observam-se aumentos dos pesos dos animais infartados em relação aos do grupo controle, e a fluoxetina não teve influência neste parâmetro. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham + Veículo; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham + Fluoxetina.

5.5.3. Histopatologia

Nas fatias cardíacas que foram utilizadas dos animais para confecção das lâminas histológicas, o perfil macroscópico dos corações dos grupos Sham + Veículo e Sham + Fluoxetina foi semelhante, o que se repetiu entre os grupos Infarto + Veículo e Infarto + Fluoxetina, seja pela arquitetura muscular dos grupos Sham, como pelo perímetro da cicatriz fibrosa e a dilatação dos VE nos animais infartados. Para confirmar que não houve influência do antidepressivo no tamanho do infarto, foram medidos os perímetros das cicatrizes do epicárdio e endocárdio em relação ao perímetro total das duas mesmas regiões, nos dois grupos infartados, calculando-se uma média (vide material e métodos, item 4.6.1, página 51). O grupo Infarto + Veículo teve uma média de $41,68\% \pm 2,97$ ($n=3$), enquanto que o grupo Infarto + Fluoxetina teve uma média de $46,57\% \pm 3,58$ ($n=3$). Segundo Pfeffer *et al* (1979), todos estes valores se enquadram na classificação de infarto moderado.

As imagens A e B da Figura 20 representam o músculo estriado cardíaco intacto dos animais Sham, enquanto que as imagens C e D mostram a necrose de coagulação, a grande quantidade de fibrócitos e matriz fibrosa (colágeno principalmente) e infiltrado inflamatório crônico (macrófagos principalmente) que confirmam o IM nos dois grupos infartados.

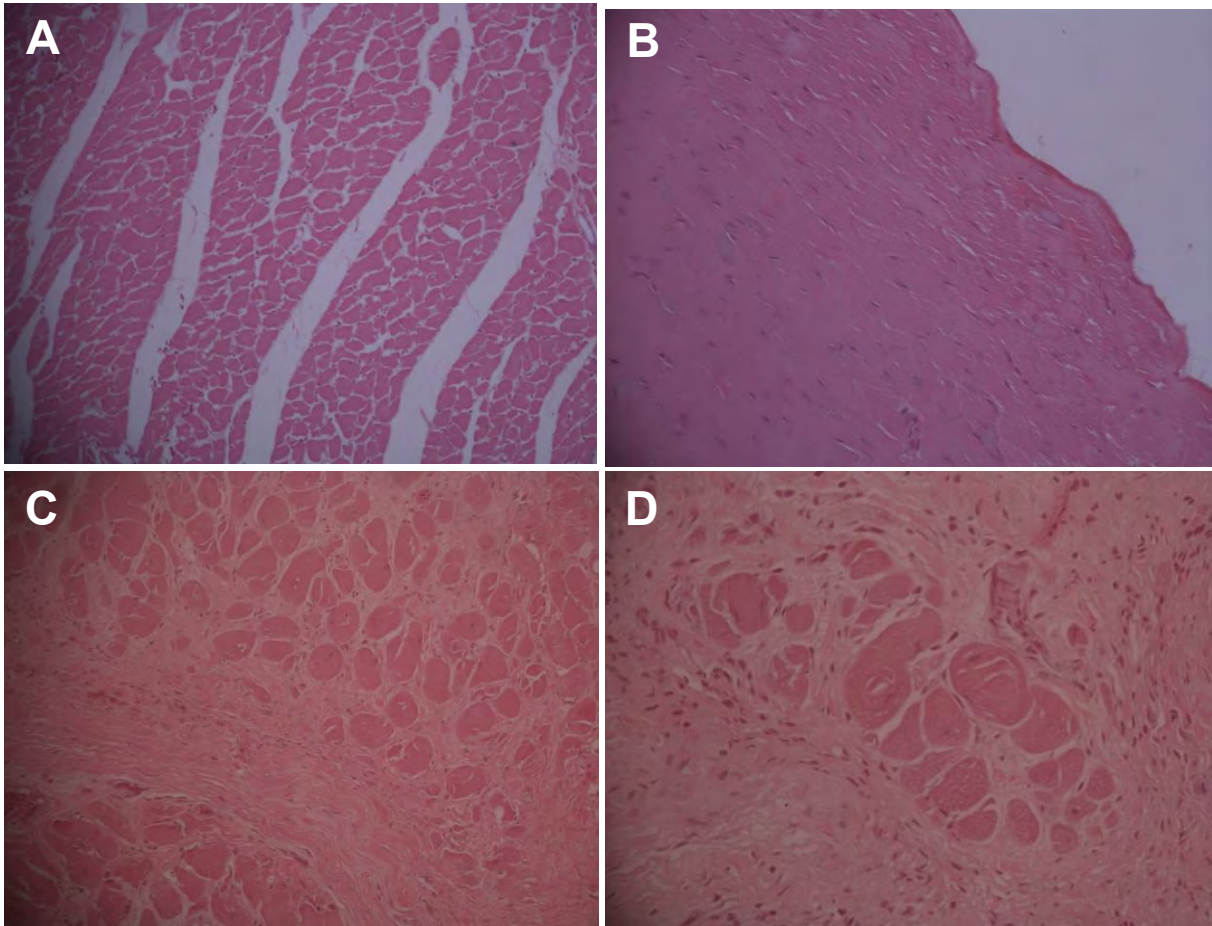


Figura 20: Histopatologia realizada no protocolo. A e B: Músculo Estriado Cardíaco sadio dos animais Sham, em corte transversal (20x) e longitudinal (40x), respectivamente. C e D: Necrose de coagulação flocular (picnose, cariorexe e cariólise) fibrócitos e fibras colágenas (rôseo claro) dos animais infartados, em cortes transversais (20 e 40x, respectivamente). Nestas últimas, observam-se ainda células inflamatórias encontradas em inflamação crônica.

5.6. Estudo biomolecular

5.6.1. Efeito do IM e das administrações de fluoxetina na expressão da enzima TPH2 no NDR.

No PCR em tempo real, para viabilizar a análise dos resultados finais, é necessário que o controle interno do teste, neste caso a expressão da proteína 36B4, não seja modificada em virtude dos procedimentos realizados, como a cirurgia de IM e administração do antidepressivo. Neste protocolo, a expressão da 36B4 não sofreu modificações entre os animais (dados não mostrados).

Em relação à expressão da enzima TPH2, os grupos experimentais apresentaram algumas peculiaridades (Figura 20). Tanto o grupo Infarto + Veículo quanto o grupo Sham + Fluoxetina apresentaram uma tendência à diminuição da expressão em relação ao grupo Sham + Veículo ($3,91 \pm 0,59$ vs $6,21 \pm 0,20$, $p =$

0,079 e $3,75 \pm 0,76$ vs $6,21 \pm 0,20$, $p = 0,061$, respectivamente). Curiosamente, o grupo Infarto + Fluoxetina apresentou uma expressão similar ao do grupo controle Sham + Veículo ($6,26 \pm 0,43$ vs $6,21 \pm 0,20$) e maior significativamente em relação ao grupo Infarto + Veículo ($6,26 \pm 0,43$ vs $3,91 \pm 0,59$, $p < 0,05$).

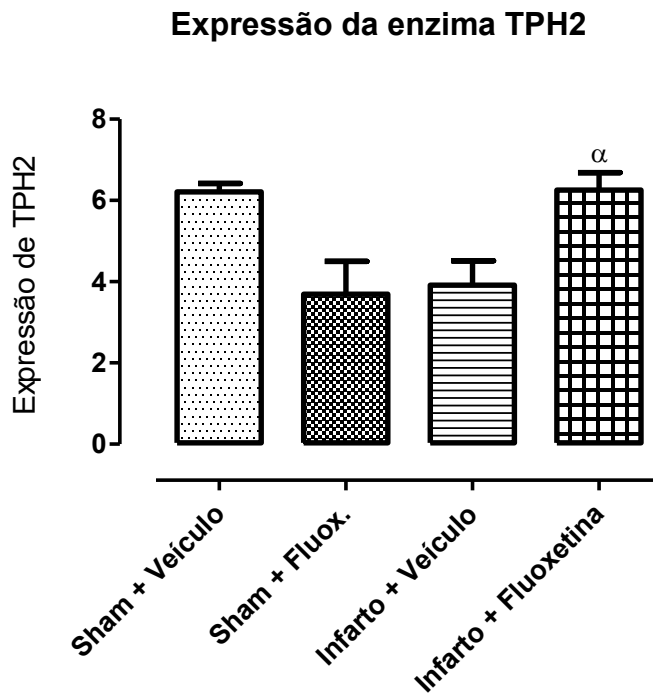


Figura 21: Quantificação do RNAm da enzima TPH2, representando sua expressão no protocolo em todos os grupos. Note que tanto a cirurgia de IM (Infarto + Veículo), como a administração de fluoxetina (Sham + Fluoxetina), tendenciou a uma diminuição da expressão da enzima. A administração de fluoxetina retornou a expressão aos níveis normais, sendo a mesma comparável aos do grupo Sham + Veículo. α – $p < 0,05$ em relação ao grupo Infarto + Veículo.

6. DISCUSSÃO

Um dos achados mais relevantes deste trabalho foi a constatação de que o IM promoveu alterações comportamentais semelhantes as encontradas em animais submetidos ao mesmo modelo de depressão por IM, como as observadas no Teste de Campo Aberto (Schoemaker & Smits, 1994; Schoemaker *et al*, 1996; Saidov & Israilov, 2002). Embora o referido teste não seja o mais adequado para a validação da depressão experimental, as alterações na atividade exploratória horizontal pela diminuição do número de quadrantes periféricos percorridos, e na atividade exploratória total pelo aumento do tempo de inatividade, nos testes realizados trinta e cinco e sessenta e três dias pós IM, podem sugerir algum déficit motivacional nestes animais. Corroborando esta hipótese, Johnson & Grippo (2006) relataram que a diminuição no comportamento locomotor voluntário pós-IM, embora possa ser o resultado de um “descondicionamento vascular”, também pode estar atribuída a inibição de processos motivacionais. Outros modelos de depressão, como, por exemplo, o de Estresse Crônico Imprevisível (“*chronic unpredictable stress*”) e o desamparo apreendido, produzem alterações semelhantes no Teste de Campo Aberto. (Liu *et al*, 2011; Rybnikova *et al*, 2007). Neste protocolo, as alterações não são confirmativas para a depressão, mas sugerem que as alterações no comportamento padrão iniciam-se num período acima de quatro semanas após o IM. Esta observação é importante, pois reforça a possibilidade de não ser diretamente uma possível dificuldade de locomoção pós IM a causadora das alterações neste parâmetro, tendo em vista que as alterações físicas já são visíveis vinte e quatro horas após a isquemia (Pfeffer *et al*, 1979).

Os animais infartados tratados com fluoxetina não apresentaram alterações em relação ao controle (falso-operado), mostrando eficácia do efeito antidepressivo da droga. O tratamento com fluoxetina influenciou também no comportamento dos animais Sham, já que estes passaram mais vezes pelo quadrante central do que os animais controle tratados com veículo, sessenta e três dias após a cirurgia. De certa forma, esse último resultado reforça a validação do tratamento no protocolo, pois é comprovado que os ISRs em tratamento crônico possuem ação ansiolítica (Liu *et al*, 2010), diminuindo portanto a responsividade ao teste naqueles parâmetros envolvidos à ansiedade. De maneira curiosa, os animais infartados (tratados ou não com fluoxetina) diminuíram significativamente o número de *rearings*, em todos os testes realizados. Apesar de alguns estudos relatarem resultados parecidos e associarem a déficit motivacional, esta alteração não pode ser diretamente associada ao comportamento pós-depressão, pois já é visualizada no primeiro teste (três dias pós IM) e não foi atenuada ou anulada pelo tratamento, podendo estar diretamente associada a dor e ao desconforto retroesternal causada pelo IM. Sabe-se que, no Modelo de IM pela ligadura da artéria coronária, a dor no músculo cardíaco está associada à produção de fatores anaeróbios, que aumentam a sensibilidade de neurônios aferentes relacionados à transmissão nociceptiva cardíaca, podendo estender-se por longo tempo (Zhang *et al*, 2011). Associada posteriormente a dor inflamatória, principalmente nas primeiras 72 horas pós IM, (Kempf *et al*, 2012), podem estar inibindo o número de *rearings* no Teste de Campo Aberto. Não houve alterações nos demais parâmetros nos testes.

Em relação ao teste do labirinto em cruz elevado, o IM não foi capaz de promover sinais análogos à ansiedade, já que não houve alterações nos parâmetros relacionados à frequência de entrada e tempo gasto nos braços abertos e nos parâmetros relacionados à análise de risco, como estiramentos (SAP), *Head Dipping* e tempo gasto na plataforma central. Naqueles envolvidos com a atividade exploratória, o número de *rearings* foi consideravelmente menor nos animais

infartados, resultado similar ao encontrado no Teste de Campo Aberto, já que novamente não houve influência do tratamento com fluoxetina. Este resultado reforça a idéia de que essa diminuição na exploração vertical é promovida por desconforto causado pela dor pós IM, ou pelas próprias limitações hemodinâmicas do modelo.

Ainda no Teste de Campo Aberto, exclusivamente, o número de bolos fecais foi reduzido nos grupos tratados com fluoxetina, independentemente do infarto. Essa condição, em outros trabalhos, é explicada pelo decréscimo na resposta autonômica, graças ao tratamento crônico com fluoxetina (Borelli *et al*, 2004), apesar de neste protocolo os animais tratados o antidepressivo não terem mostrado decréscimo na atividade simpática e/ou parassimpática. Esta influência na resposta neurovegetativa pode alterar a regulação da motilidade gastrointestinal, diminuindo a liberação de bolos fecais (Zang *et al*, 2000).

No Teste de Preferência pela Sacarose, novamente foram observadas alterações no grupo infartado sem o tratamento com antidepressivo. A partir da quarta semana, o IM levou a diminuição da preferência pela sacarose. A anedonia estendeu-se até a última mensuração realizada, podendo sugerir fortemente o surgimento da depressão. Grippo *et al* (2002) verificaram o aparecimento de anedonia no modelo de IM, através também da preferência pela sacarose e de mensurações da responsividade a estímulos elétricos no hipotálamo lateral (Grippo *et al*, 2006). Em outros modelos de depressão, ela pode também ser visualizada. Huang *et al* (2007) mostraram anedonia num modelo de depressão por estresse crônico (“*chronic mild stress*”), nos quais os animais receberam diversos estímulos estressores desagradáveis, como o estímulo doloroso na cauda, privação alimentar e hídrica, inversão de ciclo claro/escuro e choque na pata. O tratamento com antidepressivo inibiu a anedonia em todos os protocolos anteriores, além de tê-la inibido no protocolo atual. O aparecimento do resultado apenas a partir da quarta semana pós IM corrobora as alterações na exploração horizontal no teste de campo aberto, reforçando a hipótese de que a mudança no comportamento padrão tenha ocorrido após o período crítico pós-infarto, sendo causado portando principalmente pela depressão.

Na análise espectral, foram observadas alterações na amplitude das ondas de baixa frequência nos animais infartados, nos registros realizados três dias e quatorze dias pós IM (este último, apenas nos infartados tratados com antidepressivo observou-se significância estatística). Esta onda do espectro refere-se, como visto anteriormente (vide introdução, item 2.3.1., página 34), em grande parte, à participação do SNA simpático, o que torna os resultados coerentes em relação aos demais outros estudos com análise espectral em animais infartados (Mostarda *et al*, 2010; Soeki *et al*, 2008). A Figura 11 mostrada nos resultados representa um estudo seriado da amplitude da onda LF, desde o aumento significativo do tônus simpático, na primeira semana, a queda da resposta autonômica nas semanas seguintes até a normalização dos valores até a quinta e nona semana pós IM (Figuras 9 e 10). Francis *et al* (1993) encontraram um perfil seriado parecido, mostrando queda de LF na segunda semana pós isquemia. Em relação à VFC no domínio do tempo, representado, neste protocolo, por RMSSD, é sabido, como visto anteriormente, que o IM leva a sua diminuição, sendo o aumento do tônus simpático e/ou a diminuição do tônus parassimpático (que possuem grande importância no aumento da VFC) os grandes responsáveis por estas alterações.

Reis *et al* (1998), Du *et al* (1998) e Nolan *et al* (1992) observaram diminuição da amplitude na onda de alta frequência, assim como diminuição da Variabilidade da Frequência Cardíaca no modelo de IM em ratos. Entretanto, a cirurgia de IM, neste experimento, não levou a alterações nestes dois parâmetros. Curiosamente, apesar de nos dois registros iniciais, três dias e quatorze dias pós IM, o IM ter aumentado significativamente os valores de LF e não ter alterado estatisticamente os valores de HF, as razões LF/HF (incluindo a normalizada), não foram alteradas. Provavelmente, um ligeiro aumento de HF pode ter normalizado a razão.

O estudo seriado nos permitiu sugerir, embora que de forma especulativa devido à ausência de experimentos adicionais, que as alterações no equilíbrio simpato-vagal cardíaco, mostradas aqui em favor do SNA simpático nas primeiras semanas pós IM, podem ter alguma relação com o surgimento dos distúrbios comportamentais tardios, mesmo que estes tenham aparecido apenas na quarta semana pós cirurgia. Esta hipótese se baseia no fato de que, as alterações encontradas neste protocolo são similares às encontradas em outros estudos referentes ao desbalanço autonômico em modelos de depressão (Esler *et al*, 1982; Carney *et al*, 1995). Portanto, é plausível especular que, neste caso, a hiperativação do SNA simpático deva exercer algum papel regulador do estado motivacional neste modelo de insuficiência cardíaca.

Fundamentando no fato de que o tratamento com antidepressivo não exerceu quaisquer influências sobre as alterações autonômicas (e provavelmente funcionais) no coração ao longo deste protocolo experimental nos animais infartados, pode-se mais uma vez sugerir fortemente a independência do distúrbio comportamental (depressão) das alterações hemodinâmicas, pelo menos no modelo utilizado.

Apesar da maioria dos trabalhos com IM em ratos mostrarem diminuição significativa no ganho de peso após a cirurgia, principalmente por diminuição de volume de ração ingerido (Faria *et al*, 2011) e de modelos de depressão, como o modelo de derrota social e o modelo de depressão pela administração de reserpina também mostrarem de forma evidente esta alteração (Carnevali *et al*, 2012; Krogsgaard, 1958), neste estudo não houve diferenças neste parâmetro, tendo em vista a evolução de peso similar entre os animais infartados e sham tratados com veículo. A administração de fluoxetina levou a diminuição significativa do ganho de peso, seja nos animais sham, a partir da quinta semana até a última, e nos animais infartados, na quinta e nas duas últimas semanas após as administrações do antidepressivo. Os ISRs possuem conhecida ação anorexigênica, principalmente pela diminuição da produção de neurormônios estimulantes da fome como orexina e neuropeptídeo y no hipotálamo (Gutiérrez *et al*, 2002; Nollet *et al*, 2011)

No estudo anatomopatológico, neste protocolo, o IM levou ao aumento significativo do peso relativo dos corações. Esta alteração foi similar a encontrada por diversos pesquisadores, como Olivares *et al* (2007), e caracteriza-se pelo aumento absoluto da massa do miocárdio. Após o IM, são geradas alterações fisiopatológicas que promovem o fenômeno denominado “remodelamento cardíaco”, culminando no quadro de IC (Olivares *et al*, 2007). Resumidamente, o aumento do tônus simpático e a hiperativação do Sistema Renina Angiotensina pós IM levam ao aumento considerável da pós-carga, causando direta e indiretamente um efeito inotrópico positivo (aumento da força de contração). Somados a fibrose transmural, (Trindade *et al*, 2007), promovem hipertrofia da musculatura estriada cardíaca, chamada de “hipertrofia cardíaca”.

Outra alteração que sugere a IC é o aumento significativo do peso relativo dos pulmões. Isto ocorre devido ao aumento da capacitância venosa, levando a

diminuição do retorno venoso pós IM, causando em seguida redução do fluxo na pequena circulação. Esta diminuição leva, ao longo do tempo, a um acúmulo de sangue nos vasos pulmonares, caracterizando uma congestão e finalmente o extravasamento transcápsular alveolar de fluidos. Tanto a congestão como o edema, levam ao aumento desproporcional no peso do órgão, e caracterizam uma das principais alterações secundárias a IC esquerda (Wu *et al*, 2011).

O tratamento com fluoxetina no grupo infartado não foi efetivo em reduzir os pesos relativos do coração e pulmão. Isso mostra que não houve influências do fármaco na atenuação da IC. Esta constatação é importante, pois os parâmetros comportamentais revertidos/normalizados pela fluoxetina não podem ser provavelmente atribuídos às melhoras dos parâmetros hemodinâmicos e sim a seus efeitos conhecidamente antidepressivos (centrais), como já sugerido anteriormente. Estudos hemodinâmicos para a avaliação da função cardíaca, por meio de cateterismo intraventricular, por exemplo, serão necessários para confirmar esta hipótese.

Corroborando à hipótese de que o tratamento com fluoxetina não influenciou nas alterações cardíacas, a histopatologia realizada nos animais infartados tratados com veículo ou fluoxetina foi semelhante em todas as lâminas observadas. A arquitetura da cicatriz formada entre todos os animais permaneceu a mesma, tendo em vista as características do tecido infartado, da matriz cicatricial e do infiltrado inflamatório encontrado. Além disso, o perímetro de infarto calculado entre estes mesmos animais mostrou-se dentro de um mesmo padrão de infarto do miocárdio moderado segundo um dos estudos mais citados sobre o modelo de infarto em ratos (Pfeffer *et al*, 1979).

Os resultados mostrados no estudo biomolecular mostram, em cada grupo, reações diferentes dentro do protocolo sugerido, seja pela cirurgia de infarto do miocárdio, pelas administrações de fluoxetina ou aos dois juntos. As alterações encontrada em cada grupo são elucidadas abaixo:

O grupo Sham + Fluoxetina mostrou diminuição tendenciosa da expressão da enzima TPH2 no Núcleo Dorsal da Rafe. Shishkina *et al* (2007) mostraram que a administração de antidepressivo da classe dos IRSs aumenta a concentração de 5-HT na fenda sináptica, aumentando a ativação de autoreceptores inibitórios do subtipo 5-HT_{1A} somatodentrícos, levando a um efeito contraregulatório do sistema, refletindo na diminuição da expressão da TPH2. A expressão desta neste grupo talvez não tenha sido significativamente em relação ao grupo Sham + Veículo diferente devido à dessensibilização destes mesmos autoreceptores, o que deve ter atenuado a inibição da expressão da TPH2 cronicamente (9 semanas pós-cirurgia).

O grupo Infarto + Veículo mostrou também diminuição tendenciosa da expressão da TPH2. Meier *et al* (2001) relataram diminuição das concentrações de 5-HT no modelo de IM, e associaram a fatores como a desregulação autonômica ocorrida pós IM e a disfunção do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, tendo em vista a presença de neurônios serotoninérgicos em núcleos hipotalâmicos e em regiões mesencefálicas importantes no controle autonômico, como o Núcleo do Trato Solitário. Esta diminuição levanta a hipótese de que os autoreceptores 5-HT_{1A} sejam pouco ativados na fase crônica (tardia) do infarto, provavelmente devido à depleção de 5-HT, levando ao aumento da quantidade dos mesmos (*up-regulation*) na região somatodentrítica do neurônio. Esta superexpressão de autoreceptores 5-HT_{1A} poderia então ser a responsável pela inibição da expressão da TPH2 na fase crônica do infarto. Provavelmente a não significância mostrada no grupo seja explicada pela

depleção serotoninérgica, o que deve ter diminuído o efeito inibidor do agonista endógeno (5-HT), apesar do *up-regulation* do autorreceptor 5HT1A.

Por fim, o grupo Infarto + Fluoxetina mostrou valores iguais ao grupo controle Sham + Veículo. Uma explicação plausível para este fenômeno é a hiperativação de autoreceptores 5HT1A inibidores da produção da 5-HT. Pode-se especular que o sistema inibitório, no grupo Infarto + Veículo, provavelmente por estar hipersensível (*up-regulation* do autorreceptor 5-HT_{1A}), deve ter respondido mais intensamente ao tratamento com fluoxetina nas fases iniciais do infarto, levando a dessensibilização exacerbada do sistema local, e consequente superexpressão da enzima TPH2 nas fases tardias pós-IM.

Apesar de especulativos, parece pertinente pensar nestas hipóteses, tendo em vista os conhecidos efeitos deste antidepressivo graças à dessensibilização dos autoreceptores inibitórios (Renoir *et al*, 2011). Este resultado nos permitiu concluir que, apesar dos animais infartados apresentarem tendência na diminuição da TPH2, os animais infartados tratados com fluoxetina tiveram os valores normalizados, lembrando aqueles encontrados nos controles (Sham + veículo). Curiosamente, mas não surpreendentemente, os sinais análogos a depressão, como anedonia por exemplo, foram revertidos com o tratamento com fluoxetina no grupo infartado.

Finalmente, acredita-se que estudos seriados, como este, são importantes para estabelecer relações temporais entre diferentes parâmetros e fenômenos causa-efeito que facilitam o melhor conhecimento das patologias e portanto, auxiliam no desenvolvimento de estratégias terapêuticas racionais futuras.

7. CONCLUSÃO

1. O IM levou a alterações comportamentais no Teste de Campo Aberto: Diminuição da atividade exploratória horizontal e aumento do tempo de inativação total. Causou também diminuição da exploração vertical (menor número de *rearings*). Esta última parece não estar envolvida nas alterações comportamentais, e sim no descondicionamento físico causado diretamente pela IC induzida pelo infarto do miocárdio.
2. O IM não levou a alterações dignas de nota no LCE. Isto sugere que, neste modelo, não há sintomas análogos à ansiedade nos animais. Nos parâmetros relacionados à atividade exploratória neste teste, houve diferença (diminuição) apenas no número de *rearings*, similar a encontrada no TCA, reforçando a conclusão anterior.
3. A presença da anedonia, observada a partir da quarta semana pós-infarto, (mesmo período em que as alterações no TCA foram visualizadas) Tais alterações confirmam o modelo de depressão por IM em ratos.
4. Todas as alterações relacionadas ao comportamento foram inibidas pelo tratamento com fluoxetina, revelando que as alterações comportamentais promovidas pelo Infarto do Miocárdio estão possivelmente associadas à diminuição das concentrações de 5-HT no SNC.
5. O aumento da atividade do SNA simpático, observado aqui na análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca, pode ter contribuído para o desencadeamento das alterações comportamentais induzidas pelo infarto, uma vez que aquele (hiperatividade do SNA simpático) precedeu os sinais de depressão.
6. A possível depleção serotoninérgica pós-infarto, sugerida aqui pelas alterações comportamentais e anedonia, não parece estar envolvida nas alterações do balanço autonômico cardíaco no infarto, uma vez que o tratamento com fluoxetina, embora eficaz na reversão dos parâmetros comportamentais, não influenciou o desequilíbrio simpato-vagal cardíaco.
7. A diminuição da síntese de serotonina no Núcleo Dorsal da Rafe pode estar envolvida nas alterações comportamentais induzidas pelo infarto do miocárdio, uma vez que, o tratamento com fluoxetina normalizou a expressão de TPH2 nesta região no grupo infartado tratado com antidepressivo.

8. Apêndice

Tabela 2: Número de mortes durante todo o protocolo experimental.

	24 Horas	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9
Sham + Veículo	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Sham + Fluox.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infarto + Veículo	3	3	0	1	0	1	0	0	0	0
Infarto + Fluox.	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 3: Porcentagem de ganho de peso em relação a primeira pesagem (dia 0). * $p < 0,05$ e relação ao grupo Sham + Veículo

Dias	Sham + Veículo	Sham + Fluox.	Infarto + Veículo	Infarto + Fluox.
7	9,44 ± 0,94	8,19 ± 0,95	8,48 ± 0,43	8,99 ± 1,19
14	15,59 ± 0,85	15,95 ± 0,86	14,48 ± 0,62	14,20 ± 0,95
21	21,30 ± 0,99	19,95 ± 0,74	19,48 ± 0,81	18,85 ± 0,93
28	27,04 ± 1,00	24,96 ± 0,95	25,58 ± 1,09	23,48 ± 1,39
35	34,38 ± 0,73	28,48 ± 0,34*	30,48 ± 1,29	27,89 ± 1,28*
42	40,93 ± 0,74	33,48 ± 0,84*	36,00 ± 0,99	34,00 ± 1,10
49	45,58 ± 0,55	38,59 ± 0,99*	41,38 ± 1,11	39,74 ± 1,19
56	50,11 ± 1,30	43,49 ± 0,23*	45,58 ± 1,48	44,09 ± 0,49*
63	56,78 ± 1,01	47,99 ± 0,76*	51,03 ± 2,08	48,48 ± 0,59*

Tabela 4: Parâmetros analisados no LCE. * p < 0,05 em relação ao grupo Sham + Veículo. # p < 0,05 em relação ao grupo Sham + Fluox. α p < 0,05 em relação ao grupo Infarto Veículo.

	Sham + Veículo	Sham + Fluox.	Infarto + Veículo	Infarto + Fluox.
Entradas nos braços fechados	5.333 ± 0.764	7.222 ± 0.812	3.571 ± 0.429	4.857 ± 0.799
Entradas nos braços abertos	2.667 ± 0.500	3.333 ± 0.527	2.000 ± 0.577	2.286 ± 0.420
Tempo gasto nos braços fechados	206.9 ± 16.56	184.3 ± 12.14	245.4 ± 25.43	220.0 ± 12.57
Tempo gasto nos braços abertos	15.22 ± 3.14	16.89 ± 2.03	10.71 ± 3.52	13.71 ± 1.82
Frequência de entradas nos braços abertos	33.83 ± 4.88	31.13 ± 3.74	29.44 ± 8.25	32.22 ± 3.83
% de tempo gasto nos braços abertos	5.074 ± 1.048	5.630 ± 0.677	3.571 ± 1.174	4.571 ± 0.607
Tempo gasto na plataforma central	7.667 ± 1.118	5.333 ± 0.707	9.857 ± 1.223	8.143 ± 1.204
HD não protegido	6.778 ± 0,618	7.111 ± 0.753	6.286 ± 0.521	6.571 ± 0.782
HD protegido	3.778 ± 0.493	3.222 ± 0.521	4.714 ± 0.565	4.429 ± 0.649
SAP	4.778 ± 0.777	3.556 ± 0.765	5.286 ± 0.714	4.571 ± 0.649
Rearings	15.34 ± 4.73	19.60 ± 4.99	6.21 ± 2.13 *	7.02 ± 2.85 *#
Número de groomings	1.556 ± 0.376	1.222 ± 0.323	2.000 ± 0.488	1.857 ± 0.508
Bolos fecais	2.111 ± 0.423	0.666 ± 0.236*	2.143 ± 0.594	0.714 ± 0.285*#

Tabela 5: Análise espectral realizada três dias após a cirurgia. * p < 0,05 em relação ao grupo Sham + Veículo. # p < 0,05 em relação ao grupo Sham + Veículo.

	Frequência (bpm)	RMSSD	LF	HF	LF/HF	LF (UN)	HF (UN)	LF/HF (UN)
Sham + Veículo	391 ± 9	30,75 ± 2,46	56,29 ± 18,88	117,00 ± 51,10	0,5853 ± 0,1625	22,33 ± 4,58	32,17 ± 5,76	0,7165 ± 0,0899
Sham + Fluox.	395 ± 11	24,18 ± 4,70	56,72 ± 14,75	160,90 ± 67,07	0,6035 ± 0,1474	21,33 ± 4,78	36,00 ± 5,48	0,6013 ± 0,0905
Infarto + Veículo	402 ± 6	42,62 ± 11,66	269,90 ± 69,17*	353,40 ± 129,90	0,7690 ± 0,2783	47,60 ± 7,39 *	60,80 ± 7,30	0,8707 ± 0,1977
Infarto + Fluox	399 ± 14	42,89 ± 11,20	232,50 ± 51,35 *#	423,70 ± 178,40	1,2660 ± 0,5238	40,40 ± 7,59 *#	49,40 ± 11,78	0,9474 ± 0,2109

Tabela 6: Análise espectral realizada quatorze dias após a cirurgia. # p < 0,05 em relação ao grupo Sham + Veículo.

	Frequência (bpm)	RMSSD	LF	HF	LF/HF	LF (UN)	HF (UN)	LF/HF (UN)
Sham + Veículo	387 ± 12	31,13 ± 4,27	76,07 ± 27,72	106,10 ± 30,85	0,9526 ± 0,4011	20,33 ± 3,06	29,67 ± 5,51	0,8530 ± 0,2134
Sham + Fluox.	390 ± 16	25,63 ± 3,78	63,67 ± 16,06	121,60 ± 22,78	0,6110 ± 0,1514	23,17 ± 7,33	33,00 ± 6,04	0,7282 ± 0,1926
Infarto + Veículo	404 ± 8	38,89 ± 7,54	211,5 ± 62,20	236,90 ± 60,95	0,9341 ± 0,1471	37,20 ± 3,31	43,00 ± 6,49	1,0220 ± 0,2957
Infarto + Fluox	395 ± 5	31,12 ± 6,52	249,60 ± 58,32 #	167,10 ± 41,11	1,9770 ± 0,5777	41,40 ± 7,26	26,20 ± 3,48	1,9080 ± 0,6582

Tabela 7: Análise espectral realizada trinta e cinco dias após a cirurgia.

	Frequência (bpm)	RMSSD	LF	HF	LF/HF	LF (UN)	HF (UN)	LF/HF (UN)
Sham + Veículo	382 ± 8	26,91 ± 5,85	76,53 ± 13,75	104,40 ± 33,06	1,1360 ± 0,3310	16,17 ± 2,98	31,83 ± 7,86	0,5985 ± 0,1331
Sham + Fluox.	388 ± 10	21,45 ± 2,44	57,73 ± 13,13	143,50 ± 26,59	0,5110 ± 0,1653	19,67 ± 4,70	33,50 ± 6,56	0,7347 ± 0,2012
Infarto + Veículo	397 ± 11	29,30 ± 6,59	132,90 ± 20,01	184,13 ± 37,61	0,9638 ± 0,3754	28,20 ± 4,16	35,60 ± 4,51	0,9023 ± 0,2760
Infarto + Fluox	399 ± 9	30,60 ± 7,85	169,00 ± 56,64	167,17 ± 41,11	1,3870 ± 0,5811	30,60 ± 4,13	36,80 ± 7,74	0,9194 ± 0,1266

Tabela 8: Análise espectral realizada sessenta e três dias após a cirurgia.

	Frequência (bpm)	RMSSD	LF	HF	LF/HF	LF (UN)	HF (UN)	LF/HF (UN)
Sham + Veículo	378 ± 13	21,18 ± 3,61	69,85 ± 13,53	124,70 ± 37,57	0,9093 ± 0,3020	16,00 ± 2,88	26,83 ± 5,82	0,7664 ± 0,2318
Sham + Fluox.	381 ± 9	30,94 ± 6,74	66,80 ± 17,39	131,30 ± 22,36	0,6484 ± 0,2505	19,67 ± 4,77	35,67 ± 6,14	0,6188 ± 0,1634
Infarto + Veículo	395 ± 6	25,00 ± 7,29	101,40 ± 10,36	108,50 ± 19,64	1,1040 ± 0,2564	25,20 ± 2,50	29,20 ± 5,42	1,0160 ± 0,2265
Infarto + Fluox	397 ± 8	25,78 ± 5,61	113,30 ± 23,28	154,40 ± 38,04	0,9898 ± 0,3307	27,40 ± 3,87	28,00 ± 6,35	1,3120 ± 0,3928

9. REFERÊNCIAS

Abrams JK, Johnson PL, Hollis JH, Lowry CA. Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. *Ann New York Acad Sci*; 1018: 46 - 57, 2004.

Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Barger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat cardiovascular control. *Science*; 213: 220-2, 1981.

Apóstolo JL, Figueiredo MH, Mendes AC, Rodrigues MA. *Rev Lat Am Enfermagem*; Mar-Apr; 19(2): 348-53, 2011.

Archer, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav*; May; 21(2) 205 - 235, 1973.

Aubert AE, Ramaekers D, Beckers F, Breem R, Deneff C, Van de Werf F, Ector H. The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results. *Comput Methods Programs Biomed*; 60: 197 – 213, 1999.

Badoer E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 28: 95 – 99, 2001.

Baker GB, Hiob LE, Dewhurst WG. Effects of monoamine oxidase inhibitors on release of dopamine and 5-hydroxytryptamine from rat *striatum* in vitro. *Cell Mol Biol Incl Cyto Enzymol*; 26(2):183-6, 1980.

Barton DA, Dawood T, Lambert EA, Esler MD, Haikerwal D, Brenchley C, Socratous F, Kaye DM, Schlaich MP, Hickie I, Lambert GW. Sympathetic activity in major depressive disorder: Identifying those at increased cardiac risk? *J Hypertens*; 25: 2117–2124, 2007.

Baumann P. Pharmacotherapy of depression: recent developments; Sep 19; 3(125): 2079-80, 2083-4, 2007.

Bigger JT, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Kleiger RE, Rottman JN. Frequency domain measure of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation*; 85: 164-71, 1992.

Blier P. The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies. *Eur Neuropsychopharmacol*; 13: 57-66, 2003.

Borelli KG, Nobre MJ, Brandão ML, Coimbra NC. Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of

dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. *Pharmacol Biochem Behav*; Mar; 77(3): 557-66, 2004.

Bunney WE, Davis J M. Norepinephrine in depressive reactions. *Arch. Gen. Psychiatry*; 13: 483-494, 1965.

Caraci F, Copani A, Nicoletti F, Drago F. Depression and Alzheimer's disease: neurobiological links and common pharmacological targets. *Eur J Pharmacol*; 626: 64-71, 2010.

Carnevali L, Mastorci F, Graiani G, Razzoli M, Trombini M, Pico-Alfonso MA, Arban R, Grippo AJ, Quaini F, Sgoifo A. Social defeat and isolation induce clear signs of a depression-like state, but modest cardiac alterations in wild-type rats. *Physiol Behav*; Feb 7;106(2):142-150, 2012. [Epub ahead of print]

Carney RM, Rich MW, teVelde A, Saini J, Clark K, Freedland KE. The relationship between heart rate, heart rate variability and depression in patients with coronary artery disease. *J Psychosom Res*; 32:159–164, 1988b.

Castillo AR, Recondo R, Asbahr FR, Manfro GG. Transtornos de ansiedade. *Rev Bras Psiquiatr*; 22(Supl II): 20-3, 2000.

Courvoisier H, Moisan MP, Sarrieau A, Hendley ED, Mormède P. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. *Brain Res*; 743, n. 1-2: 77-85, 1996.

Del Porto, José Alberto. Conceito e diagnóstico. *Rev Bras Psiquiatr*; 21 s.1 May, 1999.

DSM-IV-TR- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4th edition.

Dyer AR, Persky V, Stamler J, Paul O, Shekelle RB, Berkson DM, Lepper M, Schoenberger JA, Lindberg HA. Heart rate as a prognostic factor for coronary heart disease and mortality: Findings in three Chicago epidemiologic studies. *Am J Epidemiol*; 112: 736–749, 1980.

Du XJ, Cox HS, Dart AM, Esler MD. Depression of efferent parasympathetic control of heart rate in rats with myocardial infarction: effect of losartan. *J Cardiovasc Pharmacol*. Jun;31(6):937-44, 1998.

Erhardt L, Herlitz J, Bossaert L. Task force on the management of chest pain. *Eur Heart J*; 23 (15): 1153–76, 2002.

Esler M, Turbott J, Schwarz R, Leonard B, Bobik A, Skews H, Jackman G. The peripheral kinetics of norepinephrine in depressive illness. *Arch Gen Psychiatry*; 39: 295–300, 1982.

Factor SM. Pathophysiology of myocardial ischemia. In: Hurst JW, Schlant, RC, Rackley CE, Sonnenblick EH, Wenger NK. Ed *The Heart. Arteries and veins*. 7 ed. New York, Mc Graw, Cap. 49: 940-59, 1990.

Faria Tde O, Baldo MP, Simões MR, Pereira RB, Mill JG, Vassallo DV, Stefanon I. Body weight loss after myocardial infarction in rats as a marker of early heart failure development. ; *May*;42(4):274-80, 2011.

Farris SG, Epstein EE, McCrady BS, Hunter-Reel D. Do Co-morbid Anxiety Disorders Predict Drinking Outcomes in Women with Alcohol Use Disorders? *Alcohol Alcohol*; Jan 2. [Epub ahead of print], 2012.

Felder JN, Smoski MJ, Kozink RV, Froeliger B, McClernon FJ, Bizzell J, Petty C, Dichter GS. Neural mechanisms of subclinical depressive symptoms in women: a pilot functional brain imaging study. *BMC Psychiatry*. Sep 21;12(1):152, 2012. [Epub ahead of print]

Ferrari R, Censi S, Mastroianni F, Boraso A. Prognostic benefits of heart rate reduction in cardiovascular disease. *Eur Heart J*; 5(Suppl. G): G10–G14, 2003.

Fisar Z, Hroudová J, Raboch J. Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressants and mood stabilizers. *Neuro Endocrinol Lett*; 31(5): 645-56, 2010.

Furlan R, Guzzetti S, Crivellaro W et al. Continuous 24-hour assessment of neural regulation of systemic arterial pressure and RR variabilities in ambulant subjects. *Circulation*; 81: 537-47, 1990.

Forbes LM, Chaney RH. Cardiovascular changes during acute depression. *Psychosomatics*; 21: 472–477, 1980.

Freedland KE, Rich MW, Skala JA, Carney RM, Davila-Roman VG, Jaffe AS. Prevalence of depression in hospitalized patients with congestive heart failure. *Psychosom*; Med 65: 119-128, 2003.

Fregnil F, Pascual-Leone A. Estimulação magnética transcraniana: uma nova ferramenta para o tratamento da depressão? *Rev. Psiq. Clín*; 28 (5): 253-265, 2001.

Gascón MR, Capitão CG, Casseb J, Nogueira-Martins MC, Smid J, Oliveira AC. Prevalence of anxiety, depression and quality of life in HTLV-1 infected patients. *Braz J Infect Dis*; Dec; 15(6): 578-82, 2011.

Glassman AH. Depression and cardiovascular comorbidity. *Dialogues Clin Neurosci*; 9: 9–17, 2007.

Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9^a. ed. Rio Janeiro, Guanabara Koogan, 1996.

Gordon D, Guyton JR, Karnovsky N. Intimal alterations in rat aorta induced by stressful stimuli. *Lab Invest*; 45: 14–27, 1981.

Gorman JM. Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. *Depress Anxiety*; 4(4): 160-8, 1996-1997.

Graeff F G & Brandão M L. *Neurobiologia das doenças mentais*, São Paulo: Lemos Editorial, 1993.

Grippe AJ, Beltz TG, Weiss RM, Johnson AK. The effects of chronic fluoxetine treatment on chronic mild stress-induced cardiovascular changes and anhedonia. *Biol Psychiatry*. Feb 15; 59(4): 309-16, 2006. Epub 2005 Sep 9.

Grippe AJ, Francis J, Weiss RM, Felder RB, Johnson AK. Cytokine mediation of experimental heart failure-induced anhedonia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; Mar;284(3):R666-73, 2003.

Gutiérrez A, Saracíbar G, Casis L, Echevarría E, Rodríguez VM, Macarulla MT, Abecia LC, Portillo MP. Effects of fluoxetine administration on neuropeptide y and orexins in obese Zucker rat hypothalamus. *Obes Res*; Jun;10(6):532-40, 2002.

Hausberg M, Hillebrand U, Kisters K. Addressing sympathetic overactivity in major depressive disorder. *J Hypertens*; 25: 2004–2005, 2007.

Hvelplund A, Galatius S, Madsen M, Sørensen R, Madsen JK, Iversen AZ, Tilsted HH, Helqvist S, Mortensen PE, Nielsen PH, Prescott E, Abildstrøm SZ. Significance of the invasive strategy after acute myocardial infarction on prognosis and secondary preventive medication: a nationwide study of 6364 women and 11,915 men. *J Invasive Cardiol*; Jan; 24(1): 19-24, 2012.

Johns TNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction: I. Method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*; 140: 675-682, 1954.

Johnson AK, Grippe AJ. Sadness and broken hearts: neurohumoral mechanisms and co-morbidity of ischemic heart disease and psychological depression. *J Physiol Pharmacol*; 57 Suppl 11: 5-29, 2006.

Kaplan HI, Sadock BJ & Grebb JA. Synopsis of Psychiatry; 7th ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994.

Kato T. Recent progress in mood disorder research. Brain Nerve; Feb; 64(2): 119-29, 2012.

Kitney RI, Rompelman O. The Study of Heart Rate Variability. Oxford: Clarendon Press, 1980.

Kleiger RE, Miller JP, Bigger JT, Moss AJ and the Multicenter Post-Infarction Research Group. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after myocardial infarction. Am J Cardiol; 59: 256-62, 1987.

Krittayaphong R, Cascio WE, Light KC, Sheffield D, Golden RN, Finkel JB, Glekas G, Koch GG, Sheps DS. Heart rate variability in patients with coronary artery disease: Differences in patients with higher and lower depression scores. Psychosom; Med 59: 231–235, 1997.

Krogsgaard AR. Side-effects of reserpine in the treatment of essential hypertension: with special reference to weight gain and mental depression. Acta Med Scand; Dec 20;162(6):465-74, 1958.

Koelch M, Pfalzer AK, Kliegl K, Rothenhöfer S, Ludolph AG, Fegert JM, Burger R, Mehler-Wex C, Stingl J, Taurines R, Egberts K, Gerlach M. Therapeutic Drug Monitoring of Children and Adolescents Treated with Fluoxetine. Pharmacopsychiatry; Nov 15. [Epub ahead of print], 2011.

Kummar A, Cannon CP. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. Mayo Clin Proc; 84: 917-938, 2009.

Lanas F, Avezum A, Bautista LE, Diaz R, Luna M, Islam S, Yusuf S. Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America: the INTERHEART Latin American study. Circulation; 115: 1067-1074, 2007.

Livak KJ & Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25, 402-, 2001.

Liu J, Garza JC, Bronner J, Kim CS, Zhang W, Lu XY. Acute administration of leptin produces anxiolytic-like effects: a comparison with fluoxetine. Psychopharmacology (Berl); Jan;207(4):535-45, 2010. Epub 2009 Oct 13

Liu Q, Li B, Zhu HY, Wang YQ, Yu J, Wu GC. Glia atrophy in the hippocampus of chronic unpredictable stress-induced depression model rats is reversed by electroacupuncture treatment. *J Affect Disord*; Feb;128(3):309-13, 2011.

Malkesman O, Braw Y, Zagoory-Sharon O, Golan O, Lavi-Avnon Y, Schroeder M, Overstreet DH, Yadid G, Weller A. Reward and anxiety in genetic animal models of childhood depression. *Behav Brain Res*; Oct 14; 164(1): 1-10, 2005.

Manji HK, Duman RS. Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the development of novel therapeutics. *Psychopharmacol Bull*. Spring; 35(2): 5-49, 2001.

Matto V, Allikmets L. Acute and chronic citalopram treatment differently modulates rat exploratory behavior in the exploration box test: no evidence for increased anxiety or changes in the [3H]raclopride binding. *Pharmacology*; v. 58, n. 2, 59-69, 1999.

Mattos RM. Efficacy of tadalafil associated with once-weekly fluoxetine in premature ejaculation(Tese). *Pesquisa em base de dados*, documento 415021, 2005.

McGill HC, Jr., McMahan CA, Herderick EE, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr*; 72: 1307S-1315S, 2000.

Meier CR, Schlienger RG, Jick H. Use of selective serotonin reuptake inhibitors and risk of developing first-time acute myocardial infarction. *Br J Clin Pharmacol*; Aug;52(2):179-84, 2001.

Meyer JH. Neuroimaging markers of cellular function in major depressive disorder: implications for therapeutics, personalized medicine, and prevention. *Clin Pharmacol Ther*; Feb; 91(2): 201-14, 2012.

Mikics, E, Barsy, B, Barsvári B, Haller J. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. *Horm Behav*; 48, n. 2: 152-62, 2005.

Mohammad-Zadeh LF, MOSES L, GWALTNEY-BRANT, SM Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther*; 31, n. 3: 187-99, 2008

Moraes RSF, Ferlin EL. Variabilidad de la frecuencia cardíaca. Utilidad del análisis espectral para evaluar el sistema nervioso autónomo. *Rev Arg Cardiol*; 60: 77-80; 1992.

Morales-Medina JC, Dumont Y, Benoit CE, Bastianetto S, Flores G, Fournier A, Quirion R. Role of neuropeptide Y Y₁ and Y₂ receptors on behavioral despair in a rat

model of depression with co-morbid anxiety. *Neuropharmacology*; Jan;62(1): 200-8. Epub 2011 Jul 23, 2012.

Mossner R, Mikova O, Koutsilieri E, Saoud M, Ehli AC, Müller N, Fallgatter AJ, Riederer P. Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers: Biological markers in depression. *World J Biol Psychiatry*; 8: 141–174, 2007.

Mostarda C, Rodrigues B, Vane M, Moreira ED, Rosa KT, Moraes-Silva IC, Lacchini S, Casarini DE, De Angelis K, Irigoyen MC. Autonomic impairment after myocardial infarction: role in cardiac remodelling and mortality. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; Apr; 37(4): 447-52, 2010. Epub 2009 Oct 29.

Murphy DL, Aulakh C, Mazzola-Pomietto P, Briggs NC. Neuroendocrine responses to serotonergic agonists as indices of the functional status of central serotonin neurotransmission in humans: A preliminary comparative analysis of neuroendocrine endpoints versus other endpoint measures. *Behav Brain Res*; 73: 209–214, 1996.

Nemeroff CB, Owens MJ. Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci Suppl*; 5: 1068-1070, 2002.

NIMH- National Institute of Mental Health. Depression research at the National Institute of mental Health. 1999. Citado [2006 Março 30]. Disponível em: URL: <http://www.nimh.nih.gov/publicat/depresfact.cfm>.

NIMH- National Institute of Mental Health. Health topics, 2011. Disponível em: URL: <http://www.nimh.nih.gov/health/topics/depression/governmentinvolvement.index.shtml>.

Nolan J, Flapan AD, Capewell S, MacDonald TM, Neilson JM, Ewing DJ. Decreased cardiac parasympathetic activity in chronic heart failure and its relation to left ventricular function. *Br Heart J*. 1992 Jun;67(6):482-5.

Nollet M, Gaillard P, Minier F, Tanti A, Belzung C, Leman S. Activation of orexin neurons in dorsomedial/perifornical hypothalamus and antidepressant reversal in a rodent model of depression. *Neuropharmacology*; Jul-Aug;61(1-2):336-46, 2011. Epub 2011 Apr 23.

Olivares EL, Costa ESRH, Werneck-de-Castro JP, Pinho-Ribeiro V, Silva MG, Ribeiro KC, Mattos EC, Goldenberg RC, Campos de Carvalho AC, Masuda MO Cellular cardiomyoplasty in large myocardial infarction: can the beneficial effect be enhanced by ACE-inhibitor therapy? *Eur J Heart*; 9: 558-567, 2007.

Olivares EL, Ribeiro VP, Werneck de Castro JP, Ribeiro KC, Mattos EC, Goldenberg RC, Mill JG, Dohmann HF, dos Santos RR, de Carvalho AC, Masuda MO. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 287: H464-470, 2004.

Ormel, J. Impact of mental disorders on disability and quality of life in Europe: results from the European Study of Mental Disorders. *Psychiatrica Scandinavica; Supplementum*; 110 (suppl 421): p 36, 2004.

Oswald I, Brezinova LE & Dunleavy DLF. On the slowness of action of tricyclic antidepressant drugs. *Br. J. Psychiatry*; 120, 673-677, 1972.

Paxinos, G & Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA, Academic Press, 1997.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149-167, 1985.

Pereira-Junior PP, Chaves EA, Costa ESRH, Masuda MO, de Carvalho AC, Nascimento JH. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. *Eur J Appl Physiol*; 96: 487-494, 2006.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. ; *Apr*;44(4):503-12, 1979.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol*; 260: H1406-1414, 1991.

Pitzalis MV, Iacoviello M, Todarello O, Fioretti A, Guida P, Massari F, Mastropasqua F, Russo GD, Rizzon P. Depression but not anxiety influences the autonomic control of heart rate after myocardial infarction. *Am Heart J*, 141:765–771, 2001..

Pratt LA, Ford DE, Crum RM, Armenian HK, Gallo JJ, Eaton WW. Depression, psychotropic medication, and risk of myocardial infarction. Prospective data from the Baltimore ECA follow-up. *Circulation*; 94:3123-3129, 1996.

Prickaerts J, Raaijmakers W, Blokland A. Effects of myocardial infarction and captopril therapy on anxiety-related behaviors in the rat. *Physiol Behav*; 60:43-50, 1996.

Porsolt RD. Animal models of depression: utility for transgenic research. *Rev Neurosci*;11(1):53-8, 2000.

PRUT L, BELZUNG C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviours: a review. *Eur J Pharmacol*; 463, n. 1-3: 3-33, 2003.

RANG, H. P., DALE, J. M., RITTER, J. M., et al. Rang and Dale's: Pharmacology. 6ed. Nova Iorque: Churchill/Livingstone, 2006

Rechlin T, Weis M, Spitzer A, Kaschka WP. Are affective disorders associated with alterations of heart rate variability? *J Affect Disord*; 32:271–275, 1994b.

Renoir T, Zajac MS, Du X, Pang TY, Leang L, Chevarin C, Lanfumey L, Hannan AJ. Sexually dimorphic serotonergic dysfunction in a mouse model of Huntington's disease and depression. *PLoS One*; 6(7): e22133, 2011. Epub 2011 Jul 8.

Reis, Amália Faria dos. Disfunção parassimpática, variabilidade da frequência cardíaca e estimulação colinérgica após infarto agudo do miocárdico. *Arq. Bras. Cardiol.*; vol.70, n.3, pp. 193-199, 1998.

REIS LC. Role of the serotonergic system in the sodium appetite. *An Acad Bras Cienc*; 79, n. 2: 261-83, 2007.

RODGERS, R.J; COLE, J.C. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behavior in mice. *Physiol Behav*; 54, n. 4: 729-36, 1993.

Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev*; 21, n. 6: 801-10, 1997.

Rodgers RJ, Johnson NJT. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*; 52, n. 2: 297-303, 1995.

Ryan C, Hollenberg M, Harvey DB, Gwynn R. Impaired parasympathetic responses in patients after myocardial infarction. *Am J Cardiol*; 37:1013–1018, 1976.

Rybnikova E, Mironova V, Pivina S, Tulkova E, Ordyan N, Vataeva L, Vershinina E, Abritalin E, Kolchev A, Nalivaeva N, Turner AJ, Samoilov M. Antidepressant-like effects of mild hypoxia preconditioning in the learned helplessness model in rats. *Neurosci Lett*; May 7;417(3):234-9, 2007. Epub 2007 Feb 22.

Rygula R, Abumaria N, Flugge G, Fuchs E, Ruther E, Havemann-Reinecke U. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res*; 162:127–34, 2005.

Saidov AB, Israilov RI. Morphological characteristics of cardiomyocyte death in the experimental myocardial infarction in rats with various emotional reaction. *Morfologiya*; 122(4):50-2, 2002.

Sanders BJ, Lawler JE. The borderline hypertensive rat (BHR) as a model for environmentally-induced hypertension: a review and update. *Neurosci Biobehav Rev*; Summer;16(2):207-17, 1992.

Saul JP. Beat-to-beat variations of heart rate reflect modulation of cardiac autonomic outflow. *NIPS*; 5: 32-7, 1990.

Salleh MA, Papakostas I, Zervas I, Christodoulou G. Eletroconvulsoterapia: critérios e recomendações da Associação Mundial de Psiquiatria. *Rev. Psiq. Clín*; 33 (5): 262-267, 2006

Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*; 122: 509-522, 1965..

Schins A, Van Kroonenburgh M, Van Laere K, D'Haenen H, Lousberg R, Crijns H, Eersels J, Honig A. Increased cerebral serotonin-2A receptor binding in depressed patients with myocardial infarction. *Psychiatry Res*; 139:155-163, 2005.

Schleifer SJ, Macari-Hinson MM, Coyle DA, Slater WR, Kahn M, Gorlin R, Zucker HD. The nature and course of depression following myocardial infarction. *Arch Intern Med*; 149:1785-1789, 1989.

Schloss P, Henn FA. New insights into the mechanisms of antidepressant therapy. *Pharmacology & Therapeutics*; 102:47-60, 2004.

Schoemaker RG, Smits JF. Behavioral changes following chronic myocardial infarction in rats. *Physiol Behav*; Sep;56(3):585-9, 1994.

Schoemaker RG, Kalkman EA, Smits JF. 'Quality of life' after therapy in rats with myocardial infarction: dissociation between hemodynamic and behavioral improvement. *Eur J Pharmacol*; Feb 29;298(1):17-25, 1996.

Seligman MEP. Helplessness. On development, depression and death, 1992. New York, W.H. Freeman and Company (Trabalho original publicado em 1975)

Shishkina GT, Kalinina TS, Dygalo NN. Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect. *Neuroscience*; 150:404-412, 2007.

Sierksma AS, van den Hove DL, Steinbusch HW, Prickaerts J. Major depression, cognitive dysfunction and Alzheimer's disease: is there a link? *Eur J Pharmacol*; 626:72-82, 2010.

Soeki T, Kishimoto I, Schwenke DO, Tokudome T, Horio T, Yoshida M, Hosoda H, Kangawa K. Ghrelin suppresses cardiac sympathetic activity and prevents early left

ventricular remodeling in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; Jan;294(1):H426-32, 2008. Epub 2007 Nov 16.

Sole MJ, Hussain MN, Lixfeld W. Activation of brain catecholaminergic neurons by cardiac vagal afferents during acute myocardial ischemia in the rat. *Circ Res*; 47:166-172, 1980.

Sole MJ, Versteeg DH, de Kloet ER, Hussain N, Lixfeld W. The identification of specific serotonergic nuclei inhibited by cardiac vagal afferents during acute myocardial ischemia in the rat. *Brain Res* 265:55–61, 1983.

Spadaro J, Fishbein MC, Hare C, Pfeffer MA, Maroko PR. Characterization of myocardial infarcts in the rat. *Arch Pathol Lab Med*; 104:179-183, 1980.

Spiegel D. Cancer and depression. *Br J Psychiatry*; Suppl:109-116, 1996.

Spijkerman T, de Jonge P, van den Brink RH, Jansen JH, May JF, Crijns HJ, Ormel J. Depression following myocardial infarction: first-ever versus ongoing and recurrent episodes. *Gen Hosp Psychiatry*; 27:411-417, 2005.

Stahl SM. *Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações clínicas*. Rio de Janeiro: MEDSI – Editora Médica e Científica Ltda, 1998.

Steyn K, Sliwa K, Hawken S, Commerford P, Onen C, Damasceno A, Ounpuu S, Yusuf S. Risk factors associated with myocardial infarction in Africa: the INTERHEART Africa study. *Circulation*; 112:3554-3561, 2005.

Stoop CH, Spek VR, Pop VJ, Pouwer F. Disease management for co-morbid depression and anxiety in diabetes mellitus: design of a randomised controlled trial in primary care. *BMC Fam Pract*; Dec 15; 12: 139, 2011.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation*; 93: 1043-65, 1996.

Trindade DC, Trindade RC, Marassi MP, Martins OP, Costa-e-Sousa RH, Mattos EC, Marinho-Jr A, Reis LC, Olivares EL. Role of renin-angiotensin system in development of heart failure induced by myocardial infarction in rats. *An Acad Bras Cienc*; 79:251-259, 2007.

Uebelacker LA, Keitner GB, Ryan CE, Miller IW. Characterizing the long-term course of individuals with major depressive disorder. *The Journal of Nervous and Mental Disease*; 192: 65-68, 2004.

Van der Heiden C, Muris P, van der Molen HT. Randomized controlled trial on the effectiveness of metacognitive therapy and intolerance-of-uncertainty therapy for generalized anxiety disorder. *Behav Res Ther*; Feb; 50(2): 100-9, 2012. Epub 2011 Dec 21.

Van der Staay FJ, Kerbusch S, Raaijmakers W. Genetic correlations in validating emotionality. *Behav Genet*; 20:51-62, 1990.

Van Praag HM & Korf J. Endogenous depression with and without disturbances of 5-hydroxytryptamine metabolism: a biochemical classification? *Psychopharmacol*; 19: 148-152. 1971.

van Zwieten PA, Blauw GJ, van Brummelen P. Pathophysiological and pharmacotherapeutic aspects of serotonin and serotonergic drugs. *Clin Physiol Biochem*; 8(Supp. 3): 1-18, 1990..

Watkins LL, Grossman P. Association of depressive symptoms with reduced baroreflex cardiac control in coronary artery disease. *Am Heart J*; 137:453-457, 1999.

White HD, Chew DP. Acute myocardial infarction. *Lancet*; 372:570-584, 2008.

WHO - World Health Organization: Fifty-fourth World Health Assembly- Ministerial round tables- Mental health 2001. Citado [2006 Março30]. Disponível em: URL: www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA54/ea54d4.pdf.

WHO - World Health Organization : CVD prevention and control : missed opportunities. *Cardiovascular diseases*, 2011. Disponível em URL: www.who.int/cardiovascular_diseases/en/.

WHO-World Health Organization: The global burden of disease, 2008. Disponível em URL: http://www.who.int/disabilities/world_report/2011/report.pdf.

Willner, P. Animal models of depression: an overview. *Pharmacology and Therapeutics*; 45: 425-455, 1990.

Wu J, Guo Z, Wang LL, Zhang RL. Degeneration of sensory afferent nerves enhances pulmonary inflammatory alterations in acute myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Pathol*; Jun 9, 2011. [Epub ahead of print].

Wijesinghe M, Perrin K, Ranchord A, Simmonds M, Weatherall M, Beasley R. Routine use of oxygen in the treatment of myocardial infarction: systematic review. *Heart*; 95 (3): 198-202. Epub 2008 Aug 15..

Zhang RL, Guo Z, Wang LL, Wu J. Degeneration of capsaicin sensitive sensory nerves enhances myocardial injury in acute myocardial infarction in rats. *Int J Cardiol*; Apr 5, 2011. [Epub ahead of print].

Zhang Y, Raap DK, Garcia F, Serres F, Ma Q, Battaglia G, et al. Long-term fluoxetine produces behavioral anxiolytic effects without inhibiting neuroendocrine responses to conditioned stress in rats. *Brain Res*; 855:58–66, 2000.