

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TESE

**Citocinas Pró Inflamatórias, Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal e
Papel do BDNF na Mediação da Plasticidade Hipocampal no Infarto
do Miocárdio em Ratos**

Rafael Sonoda Côrtes

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLOGICAS

**CITOCINAS PRÓ INFLAMATÓRIAS, EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-
ADRENAL E PAPEL DO BDNF NA MEDIAÇÃO DA PLASTICIDADE
HIPOCAMPAL NO INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS**

RAFAEL SONODA CÔRTEZ

Sob a Orientação do Professor

Emerson Lopes Olivares

Tese desenvolvida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Fisiológicas – UFRRJ- Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis).

Seropédica, RJ

Julho de 2016

616.1237

C828c

T

Côrtes, Rafael Sonoda, 1986-

Citocinas pró-inflamatórias, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e papel do BDNF na mediação da plasticidade hipocampal no infarto do miocárdio em ratos / Rafael Sonoda Côrtes - 2016.

59 f.: il.

Orientador: Emerson Lopes Olivares.

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

Bibliografia: f. 43-59.

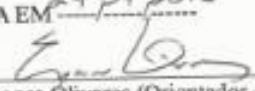
1. Infarto do miocárdio - Teses. 2. Infarto - Teses. 3. Depressão mental - Teses. 4. Ratos - Teses. I. Olivares, Emerson Lopes, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS


RAFAEL SONODA CÔRTEZ

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de Concentração em Fisiologia.

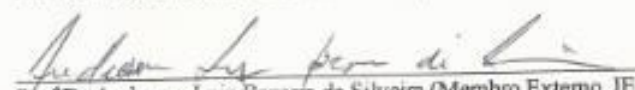
TESE APROVADA EM 29/03/2016


Prof Dr Emerson Lopes Olivares (Orientador - UFRRJ)
(Orientador)


Prof Dr José Hamilton Matheus Nascimento (Membro Externo - UFRJ)


Prof Dr Fabio Fagundes da Rocha (Membro Interno - UFRRJ)


Prof Dr Fábio da Silva de Azevedo Fortes (Membro Externo - UEZO)


Prof Dr Anderson Luiz Bezerra da Silveira (Membro Externo, IE - UFRRJ)

Dedicatória

**Dedico este tese aos meus dois
filhos, Joaquim e Heitor, os
grandes amores da minha vida.
Que sempre prevaleça o amor e
a família.**

Agradecimentos

Inicialmente agradeço a Deus, por sempre ter me guiado e me dado força e sabedoria para seguir em frente.

À minha esposa Andreza, por ter sido compreensiva em toda nossa vida juntos. Obrigado pela paciência, pelo carinho e pelas palavras nos momentos de nervosismo e ansiedade pelo término deste caminho. Te amo meu amor.

Ao meu filho Joaquim, por ter me enchido de alegria nos momentos de angústia e por sempre me deixar de bom humor. Ter apenas a ciência da sua existência é o suficiente para a minha felicidade eterna. Seu papai te ama muito.

Ao meu filho Heitor, que está por vir. Apesar de ainda não ter nascido é um dos meus maiores orgulhos. Papai te ama.

Aos meus pais, sem os quais não teria chegado até aqui. Obrigado por terem cuidado de mim e por me ajudarem a alcançar todos os objetivos. Amo vocês

A dinha e a princesa, que sempre me receberam com um carinho reconfortante e sem igual ao chegar em casa cansado dos experimentos.

Ao meu orientador, por ter me aceitado ao longo dos últimos nove anos como seu orientado. Por me despertar o senso crítico, por entender as dificuldades, por aceitar as minhas escolhas em relação a linha de pesquisa e pela parceria.

Ao Anderson e ao Claudinho. O início do experimento não seria nada sem vocês. A ajuda sempre veio “de graça”, sempre sem exigirem nada em troca. Estamos sempre juntos para o que for necessário.

Ao Professor Gleider, que mesmo sem me conhecer me aceitou de braços abertos na Fiocruz. Devo a ele grande parte dos resultados *post-mortem*. Esteve sempre aberto as novas ideias, sempre sugerindo novas formas de interpretação. Obrigado por ter disponibilizado parte da sua equipe de trabalho.

Ao Rodrigo, por ter me sugerido fazer parte do experimento na Fiocruz, por ter me apresentado ao Prof. Gleider, e por incessantemente me auxiliar na análise e interpretação dos resultados.

Ao DCFis, por ter me acolhido e por me abrigar por todos esses anos. Espero poder sempre trabalhar dentro de seus laboratórios.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A UFRRJ e a Veterinária, por terem me apresentado ao DCFis e por me transformarem no profissional que sou hoje

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana...”

Louis Pasteur

RESUMO

CÔRTEZ, Rafael Sonoda . **Citocinas pró inflamatórias, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e papel do bdnf na mediação da neurogênese hipocampal no infarto do miocárdio em ratos**. 2016. 82p Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

O infarto do miocárdio (IM) é a síndrome de maior prevalência nos dias atuais. Semelhantemente impactante, a depressão tem causado diversos prejuízos à saúde e a economia mundial. Epidemiologicamente, essas diferentes condições clínicas possuem uma relação bidirecional. Diversos estudos em ratos, nos últimos anos, associam o surgimento de sinais análogos a depressão a alterações fisiopatológicas pós IM, dentre as quais a ativação de fatores pró-inflamatórios e a hiperativação do eixo endócrino hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). O objetivo deste trabalho foi: estudar, em grupos distintos de ratos, num protocolo a curto prazo, de quatro dias e num longo, de vinte e cinco dias, as características supracitadas, além de elucidar a participação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e da neurogênese hipocampal no surgimento da depressão induzida por IM experimental, através da proteína ki-67, marcador de proliferação celular. Para tanto, ratos Wistar machos (200-250g) foram submetidos ao IM através da ligadura da artéria coronária esquerda e submetidos ao teste de preferência pela sacarose, teste do nado forçado e ao teste do campo aberto. Foram mensurados: os níveis cardíacos de TNF- α e as concentrações plasmáticas e hipotalâmicas de TNF- α e IL-1 β . Na alça endócrina, as concentrações plasmáticas de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de corticosterona e os níveis hipotalâmicos de hormônio liberador de corticotrofina (CRH). Por fim, foi mensurada as concentrações plasmáticas de BDNF para a associação com a neurogênese do hipocampo, região importante na fisiopatologia da depressão. No protocolo longo, os animais infartados apresentaram sinais análogos a depressão em comparação aos animais falso operados. Concomitantemente, apresentaram níveis elevados de TNF- α e IL-1 β , de CRH, ACTH e corticosterona e concentrações plasmáticas diminuídas de BDNF, sugerindo diminuição da proliferação de células granulares no hipocampo e, conseqüentemente, o surgimento da depressão em resposta ao IM. Embora sejam necessários mais estudos, acredita-se que este trabalho tenha impacto translacional, servindo de base experimental para o desenvolvimento de futuras estratégias farmacológicas mais eficazes para melhor qualidade e expectativa de vida de pacientes com infarto do miocárdio.

Palavras chave: Infarto, citocinas, depressão

ABSTRACT

CÔRTEZ, Rafael Sonoda. **Proinflammatory cytokines, hypothalamic-pituitary-adrenal axis and role of bdnf in mediating hippocampal neurogenesis in myocardial infarction in rats.** 2016. 82p Thesis (PhD in Physiological Sciences). Institute of Health and Biological Sciences, Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Myocardial infarction (MI) is the most prevalent nowadays syndrome. Similarly impressive, depression has caused many damages to health and the global economy. Epidemiologically, these different clinical conditions have a bidirectional relationship. Several studies in rats, in recent years, associated the emergence of analog signals depression post pathophysiological IM changes, among which the activation of pro-inflammatory factors and the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal endocrine axis (HPA). The objective of this study was: to study, in different rat groups, a short-term protocol, four days and a long, twenty-five days, the above features, besides elucidating the involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and hippocampal neurogenesis in the onset of depression induced experimental IM by ki-67 protein, cell proliferation marker. For this purpose, male Wistar rats (200-250 g) were subjected to IM through ligation of the left coronary artery and underwent preference for sucrose test and the open field test. They were measured: cardiac TNF- α , plasma and hypothalamic concentrations of TNF- α and IL-1 β . In endocrine handle, plasma concentrations of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone and hypothalamic levels of corticotropin releasing hormone (CRH). Finally, we measured plasma concentrations of BDNF to the association with the neurogenesis of the hippocampus, an important region in the pathophysiology of depression. In the long protocol, infarcted animals showed similar signs of depression compared to those operated fake animals. Concomitantly, showed elevated levels of TNF- α and IL-1 β , CRH, ACTH and corticosterone plasma levels and reduced BDNF, suggesting decreased proliferation of granule cells in the hippocampus and hence the emergence of depression in response to MI. Although further studies are required, it is believed that this study has translational impact serving experimental basis for the development of more effective future pharmacologic strategies to better quality and life expectancy of patients with myocardial infarction.

Keywords: Infarction, cytokines, depression

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Infarto do Miocárdio.....	3
2.1.1. Características gerais.....	3
2.1.2. Epidemiologia.....	3
2.1.3. Aterosclerose.....	4
2.1.4. Tratamento.....	5
2.1.5. Insuficiência cardíaca congestiva.....	6
2.1.6. Modelo de infarto do miocárdio experimental em ratos.....	6
2.2. Depressão.....	7
2.2.1. Características gerais.....	7
2.2.2. Epidemiologia.....	7
2.2.3. Tratamento da depressão.....	8
2.3. Epidemiologia da relação entre IM e a depressão.....	9
2.4. Fisiopatologia da relação entre IM e a depressão.....	10
2.4.1. Teoria das Monoaminas.....	10
2.4.2. Teoria neuroimuno – neuroendócrina.....	11
2.5. Neurotrifinas.....	13
2.6. BDNF.....	15
2.6.1. BDNF na depressão.....	16
2.7. Hipocampo e Depressão.....	17
2.8. A Neurogênese no Infarto do Miocárdio.....	18
3. Objetivos.....	19
3.1. Objetivos Gerais.....	19
3.2. Objetivo Específicos.....	19
4. Material e Métodos.....	20
4.1. Animais.....	20
4.2. Comitê de Ética.....	20
4.3. Grupos.....	20
4.4. Cirurgia de Infarto do Miocárdio.....	20
4.5. Eletrocardiograma.....	21
4.6. Teste do Campo Aberto.....	22
4.7. Teste da Preferência pela Sacarose.....	23
4.8. Teste do Nado Forçado.....	24
4.9. Estudo <i>post-mortem</i>	25
4.9.1. Eutanásia.....	25
4.9.2. Perfusão.....	25
4.9.3. Histopatologia do coração.....	26
4.9.4. Análise histopatológica.....	27
4.9.5. ACTH e cortocosterona plasmáticos.....	28
4.9.6. TNF- α e IL-1 β plasmáticos.....	28
4.9.7. TNF- α e IL-1 β hipotalâmicos.....	28

4.9.8. CRH hipotalâmico.....	29
4.9.9. TNF- α Cardíaco.....	29
4.9.10. Concentrações plasmáticas de BDNF.....	29
4.9.11. Imunofluorescência.....	29
4.9.12. Análise Estatística.....	30
5. Resultados.....	31
5.1.Mortalidade Cirúrgica e Pós – Cirúrgica.....	31
5.2.Histopatologia Cardíaca.....	31
5.3. Comportamento.....	31
5.3.1. Efeitos do IM no Teste de Campo Aberto nos Parâmetros exploratórios.....	31
5.3.2. Efeito do IM no Teste de Preferência pela Sacarose.....	32
5.3.3. Efeito do IM no Tempo de Imobilidade no teste do Nado Forçado.....	33
5.4.Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal.....	34
5.4.1. Efeito do IM nas concentrações plasmáticas de CRH.....	34
5.4.2. Efeito do IM nas concentrações plasmáticas de ACTH.....	34
5.4.3. Efeito do IM nas concentrações plasmáticas de corticosterona.....	35
5.5. Citocinas pró-inflamatórias.....	35
5.5.1. Efeito do IM nos níveis cardíacos de TNF- α	35
5.5.2. Efeito do IM nas concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-1 β	36
5.5.3. Efeito do IM nas concentrações hipotalâmicas de TNF- α e IL-1 β	37
5.6.Efeito do IM nas concentrações plasmáticas de BDNF.....	38
6. Discussão.....	39
7. Perspectivas.....	42
8. Referências Bibliográficas.....	43

1. INTRODUÇÃO

Esta tese discorre sobre a relação fisiopatológica entre duas importantes enfermidades que afetam a população mundial. Primeiro, o IM, que nos humanos tem a maior prevalência dentre todas as síndromes e é maior causa de morte desde o final do século passado. Segundo, a depressão psicológica que, apesar de ter também alta prevalência e antiga conceituação, tem ganhado nos últimos anos mais destaque, haja vista que sua existência tem sido cada vez mais aceita e compreendida. Juntas, tornam o trabalho atual e impactante, do ponto de vista translacional e epidemiológico.

Resumidamente, o principal objetivo do trabalho foi avaliar se o infarto do miocárdio experimental pode realmente levar a sinais análogos a depressão, e em caso positivo, elucidar os mecanismos pelos quais o IM induz ao aparecimento de sintomas depressivos. Algumas hipóteses surgiram nos últimos anos, mas sempre com o intuito de identificar mecanismos fisiopatológicos convergentes entre doença cardiovascular e alterações comportamentais, ou encontrar estratégias terapêuticas que atenuassem nessas duas condições. Entretanto, não há evidência a respeito de uma via fisiológica definida entre o surgimento do IM e o aparecimento de sinais comportamentais.

Atualmente, muito se sabe sobre a fisiopatologia das doenças cardiovasculares em geral, especificamente do IM: a causa principal, neste caso a aterosclerose, descrita neste trabalho, o remodelamento cardíaco— ocasionado por diversos mecanismos neuro-humorais de curto, médio e longo prazo— e os fármacos utilizados para tratamento. Também muito foi descrito a respeito da depressão e suas hipóteses, teorias fisiopatológicas e das formas de abordagem terapêutica, que têm sido discutidas desde a segunda metade do século passado. Apesar do dessas duas condições, pouco se sabe e se entende sobre a relação entre as mesmas.

Uma das principais teorias, em humanos, que justifica o surgimento de sintomas depressivos após eventos cardíacos é a teoria cognitiva. Um indivíduo que sofre IM e sobrevive, possui plena consciência e conhecimento sobre sua grave condição e risco, o que induz ao surgimento de sinais emotivos. Todavia, estudos em outros mamíferos trazem à tona diversos questionamentos. Em modelos de infarto, roedores apresentam sinais análogos à depressão humana, levantando a suspeita da existência de mecanismos fisiopatológicos não cognitivos envolvidos entre as duas.

As hipóteses que afirmam essa correlação sugerem pontos de convergência fisiopatológicas tanto periféricas como centrais. Por exemplo, o envolvimento de neurotransmissores monoaminérgicos, do sistema nervoso autônomo, do controle hidroeletrólítico, de alças endócrinas, como o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), da resposta inflamatória (produção de citocinas) e das neurotrofinas, hipóteses não necessariamente isoladas. Nos últimos anos, o estudo da interação entre a hiperativação do eixo HPA como condição pós-estresse causada pelo IM e a produção de citocinas pró-inflamatórias após evento isquêmico em ratos, tem mostrados resultados significativos, corroborando a evidências antigas inerentes a distúrbio cardiovascular e

depressivo.

Outro fator têm sido foco recente de estudos. As neurotrofinas, extremamente importantes para a manutenção, sobrevivência, proliferação e riqueza dendrítica de neurônios em regiões envolvidas no surgimento de sintomas comportamentais. A diminuição dos níveis periféricos e centrais destas proteínas é relatada em diversos modelos experimentais de estresse e depressão, principalmente em regiões importantes para a fisiopatologia desta última, como o hipocampo. Autores citam ainda influências das citocinas e do eixo HPA na síntese destas neurotrofinas, principalmente do fator neurotrófico derivado do cérebro, ou BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) o que influenciaria diretamente nos fenômenos envolvidos com plasticidade neuronal e sináptica.

Uma das principais limitações deste estudo foi dissociar as alterações comportamentais da dependência das alterações hemodinâmicas produzidas em resposta ao IM. Em outras palavras, poder-se-ia argumentar que as alterações comportamentais seriam meramente um reflexo da limitação motora induzida por IM e não de fatores de integração que culminariam nos sinais análogos à depressão. Embora essa hipótese não esteja completamente descartada, acredita-se que o método experimental utilizado tenha enfraquecido essa hipótese. Para tanto, utilizou-se de dois protocolos, um a curto e outro a longo prazo.

Logo, este trabalho discute a hipótese de uma nova via responsável pelo surgimento de sinais análogos a depressão após IM. Sugere-se que as alterações neuroimunes e neuroendócrinas ocorridas pós – IM induzam diretamente a modulações dos níveis de BDNF no hipocampo. Esta alteração, por sua vez, seria responsável pela diminuição da neurogênese, o que culminaria no aparecimento de sintomas análogos à depressão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Infarto do Miocárdio

2.1.1. Características gerais

O 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 lesão, 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 da isquemia. 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 mais comumente insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (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).

2.1.2. Epidemiologia

O IM é a condição médica de maior mortalidade no mundo e estima-se que, nos dias atuais, aproximadamente trinta e dois milhões de pessoas desenvolvam-na (Osvaldo & Lourenço, 2016). Países desenvolvidos possuem maior incidência, e nas últimas décadas, tem sido observado aumento considerável de casos em regiões em desenvolvimento, como na América do Sul e continente africano, principalmente em zonas urbanas (Steyn *et al*, 2005; Lanas *et al*, 2007). No início da década de 90, mais de 20% de todas as mortes por ano na América Latina já haviam sido causadas por doenças cardiovasculares e a expectativa era que esse número continuasse a crescer por muitos anos (Lanas *et al*, 2007). Atualmente, no mundo, o número total de mortes por ano chega a oito milhões (Osvaldo & Lourenço, 2016) Dentre todos os fatores de risco, observa-se que a obesidade, sedentarismo, *diabetes mellitus*, dislipidemia, álcool, tabagismo e a hipertensão são os mais importantes (OMS, 2015). A Figura 1 mostra, no

ano de 2011, em homens e mulheres, a prevalência de IM dentre as doenças cardiovasculares mais comuns (OMS, 2011).

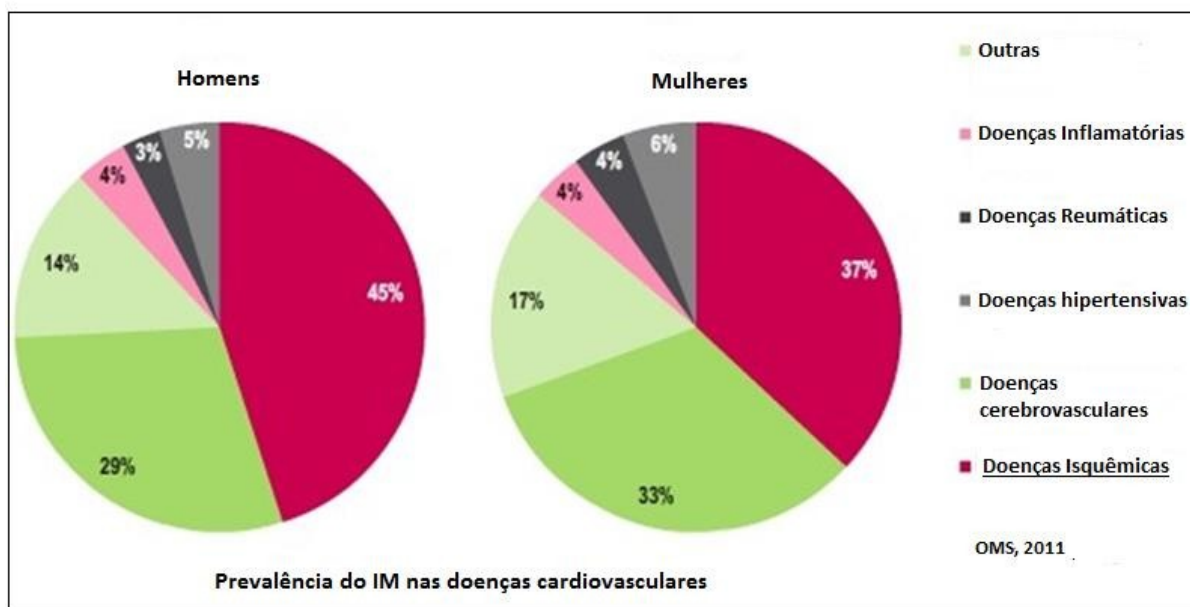


Figura 1: Prevalência do IM entre as doenças cardiovasculares no ano de 2011, separado em homens e mulheres. Adaptado de OMS, 2011.

2.1.3. 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 (McGill *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 por muito tempo condições como a hipóxia ou anóxia, como cérebro e coração, esta oclusão pode trazer sequelas graves ou levar a morte.

Os fatores de risco para o IM, citados anteriormente, contribuem diretamente para as lesões e disfunções no endotélio dos vasos sanguíneos, criando o ponto central do processo aterosclerótico (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, se transformando 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, como IL-1 β e IL-6) que perpetuam o processo de recrutamento de macrófagos e células lisas músculos-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 aproximadamente 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).

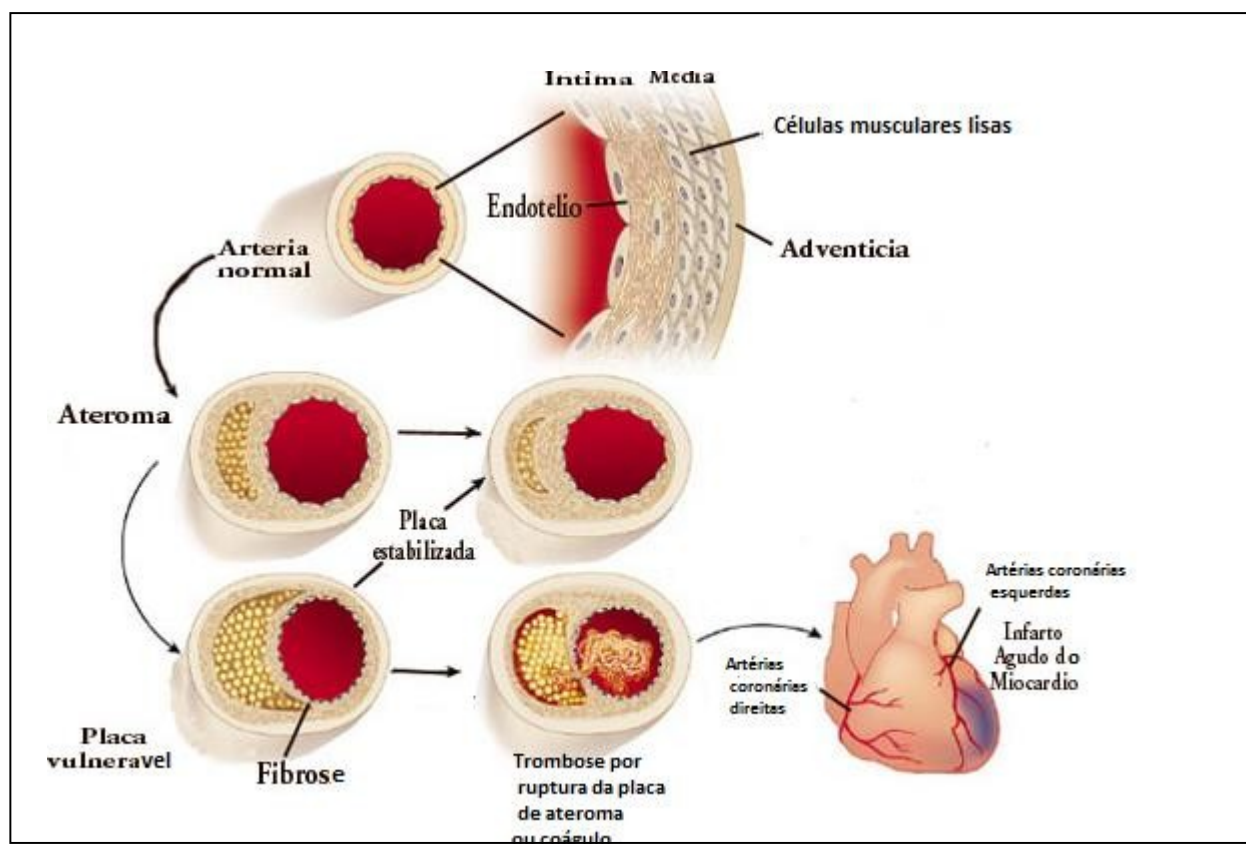


Figura 2: Fenômeno da aterosclerose. Adaptado de Dardé, 2008

2.1.4. Tratamento do infarto do miocárdio

As diferentes estratégias terapêuticas do infarto relacionam-se diretamente com a ocorrência ou não da elevação do segmento ST. Em infartos sem elevação do segmento ST 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 ateroma ao longo do tempo (White *et al*, 2008; Kumar *et al*, 2009). Contudo, independentemente do tipo de tratamento observa-se que a mortalidade por infarto do miocárdio com ou sem elevação do segmento ST continua elevado, e deve-se principalmente, a evolução do quadro clínico para insuficiência cardíaca, levando ao óbito, a longo prazo, mais de 50% dos pacientes (White *et al*, 2008)

2.1.5. Insuficiência cardíaca congestiva (ICC)

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) atrial (s) e ventricular (es), doenças valvulares e formações de aneurisma. Todas estas, moduladas a curto, médio e longo prazo por alças autonômicas e endócrinas, como o sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) e sistema renina angiotensina (SRA), 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 por aumentar as chances de morte súbita.

2.1.6. Modelo de infarto do miocárdio experimental em ratos

Em 1946, Robert F. Heimbürger escreveu pela primeira vez um modelo experimental do IM em ratos, porém o seu modelo estava baseado numa aplicação de substância no saco pericárdico. Posteriormente, Johns & Olson, em 1954, procuravam estabelecer um modelo agudo de infarto e descreveram a técnica de Heimbürger mais detalhadamente, mostrando a distribuição das artérias coronárias em diferentes animais de laboratório. Contudo, a técnica de oclusão da artéria coronária descendente anterior só foi confirmada por Kaufman, Gava e Hill, em 1959, pela publicação de dados morfológicos e histoquímicos da técnica em ratos. Tal modelo experimental ganhou um detalhamento importante a partir do trabalho de Fishbein e colaboradores, em 1978, tornando-se uma das referências mais citadas para a aplicação da técnica. A partir daí, outros estudos como os de Pfeffer e colaboradores, em 1985 e 1991 também contribuíram muito para o desenvolvimento do modelo.

2.2. Depressão

2.2.1. Características gerais

A depressão é um transtorno psiquiátrico que afeta pessoas de todas as idades. Caracteriza-se pela perda de prazer nas atividades diárias, apatia, alterações cognitivas

(diminuição da capacidade de raciocínio, concentração e tomada de 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, idéias suicidas 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 – V).

Dentre os fatores causadores, os mais comuns são os psicossociais, relacionados principalmente com a qualidade de vida, como a perda de familiares, solidão, alterações de convivência e em relacionamentos no ambiente de trabalho e vida pessoal, baixos níveis de socialização etc. (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 depressão (Del Porto *et al*, 1999).

2.2.2. Epidemiologia

Atualmente, a depressão é o transtorno psiquiátrico de maior prevalência. Cerca de 350 milhões de pessoas sofrem cronicamente de depressão no mundo e, por ano, aproximadamente 4 milhões pessoas se suicidam em casos de doença severa. (OMS, 2015). 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 (OMS, 2015). Na França, um dos países 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, isoladamente, atingiria o segundo lugar de DALYs, valor correspondente a aproximadamente 15% até o ano de 2020 (OMS, 2001). Atualmente, a depressão já é a segunda causa em indivíduos entre 15 e 44 anos (OMS, 2008).

Estes números tem grave impacto econômico. Na Europa e na América, 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 depressão é de aproximadamente 10 a 15 %, sendo o suicídio uma das maiores contribuições para esse número. (Schloss & Henn, 2004).

2.2.3. Tratamento da depressão

Diversos tipos de estratégias terapêuticas são utilizados para o tratamento da depressão. 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). Devido à metodologia, só é usada em casos extremos, quando o suicídeo é iminente (Fregnil & Pascual-Leone, 2011).

Dentre os fármacos descritos na literatura, os antidepressivos tricíclicos (ADTs), inibidores da monoaminoxidase (IMAOs) e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (IRSs) são os mais utilizados na clínica médica (Bauman, 2007). Os ADTs (Imipramina, Clomipramina, Desipramina, Amitriptilina, Nortriptilina) atuam bloqueando a recaptação 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 agonistas 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 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. 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 depressão, principalmente em casos onde há concomitância com outras doenças (Koelch *et al*, 2011).

Nas últimas duas décadas, novas teorias fisiopatológicas surgiram à respeito do surgimento da depressão, seja esta primária ou concomitante a outra doença. Por serem consideravelmente novas, despontam como potenciais novos focos terapêuticos.

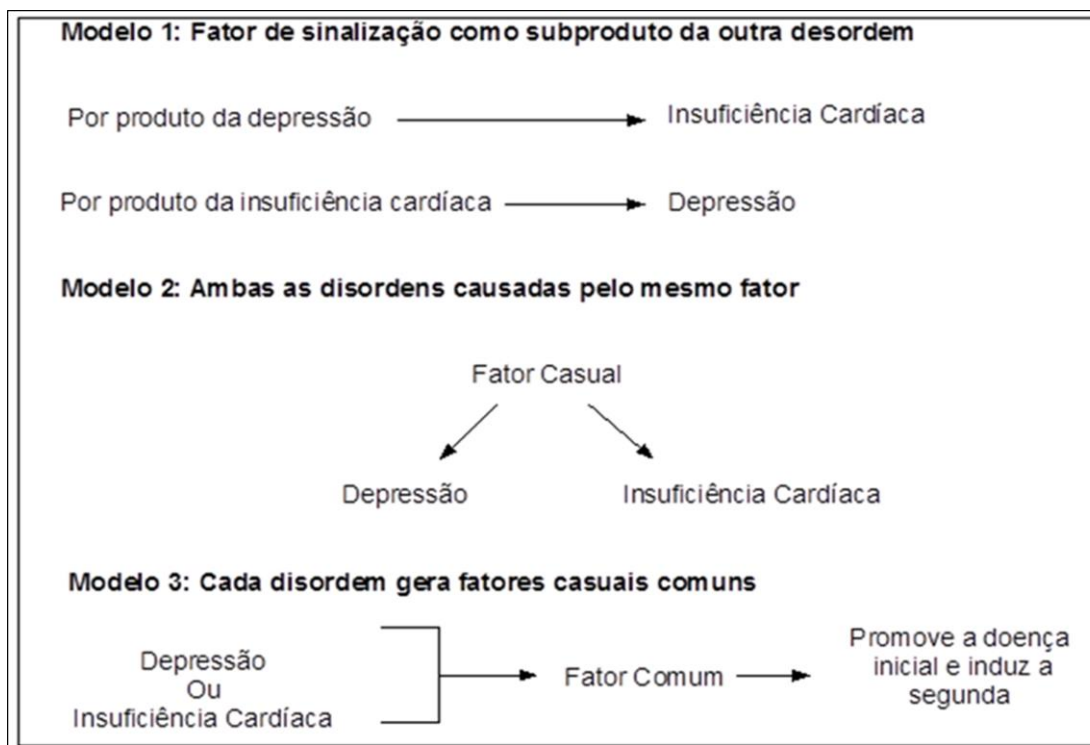
2.3. Epidemiologia da relação entre IM e a depressão

Atualmente as doenças cardiovasculares em geral e a depressão representam uns dos maiores problemas de saúde mundial, gerando milhares de vítimas (Johnson & Grippo, 2006; Kala *et al*, 2016). Observa-se que, muitas das vezes, o IM leva a alterações comportamentais que evoluem para a depressão (Kala *et al*, 2016), podendo o inverso também ocorrer, já que os indivíduos que apresentam sintomas comportamentais compatíveis com a depressão desenvolvem um enorme risco do surgimento de doenças cardiovasculares (O'Neil *et al*, 2016; Du *et al*, 2016).

Estudos recentes mostram que os pacientes com algum tipo de doença cardiovascular apresentam maiores chances de desenvolverem depressão quando comparados aos indivíduos saudáveis (Johnson & Grippo, 2006). No final da década de 1980, dos indivíduos que sobreviveram ao IM, 45% dos casos desenvolveram depressão (Schleifer *et al*, 1989). No início do século XXI, naqueles pacientes que apresentaram ICC, este número chegou a 50%, (Freedland *et al*, 2003). Por outro lado, Pratt e colaboradores, em 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.

Em função dessa íntima relação entre depressão e infarto, alguns autores estudam pontos de convergência entre a etiologia ou a progressão patológica de cada doença, em diversas linhas, descrevendo fatores comuns para os distúrbios cardiovasculares e psiquiátricos (Johnson & Grippo, 2006; Bantsiele *et al*, 2009; Almeida *et al*, 2015; Dhar & Barton, 2016).

A Figura 3 define os três modelos que levantam a hipótese da relação entre doença cardiovascular e depressão, sugerida por Johnson e Grippo (2006). Na primeira hipótese, uma lesão como causa principal da segunda. Na segunda hipótese, as duas são causadas por um fator comum. Na terceira, uma das duas afecções gera um fator comum, no qual é responsável pelo surgimento da outra.



Adaptado de Johnson & Grippo, 2006

Figura 3: As três hipóteses inerentes ao surgimento entre IM e depressão. Adaptado de Johnson e Grippo, 2006.

2.4. Fisiopatologia da relação entre IM e a depressão

2.4.1. Teoria das monoaminas

No século passado, as principais teorias relativas à base biológica da depressão situaram-se nos estudos sobre neurotransmissores cerebrais e seus receptores, embora mais recentemente outras áreas 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). Esta baseia-se no conceito da deficiência das mesmas, 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 Wilner, 1990, que tiveram grande impulso devido ao desenvolvimento dos IRSs e devido ao envolvimento da DA e 5-HT nos fenômenos de recompensa cerebral.

2.4.2. Teoria neuroimuno - neuroendócrina

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é caracterizado como o “sistema hormonal do estresse” (Johnson & Grippo, 2006). Selye e seus colaboradores, em 1955, deram início a estudos inovadores, onde observaram a existência de vias no Sistema Nervoso Central (SNC) contendo fator de liberação corticotrófico (CRH) (Ceccatelli *et al*, 1989), e que este era muito ativo em áreas como os núcleos da rafe e o lócus cerúleos. Posteriormente, o mesmo autor também demonstraria a conexão entre o estresse comportamental e o eixo HPA (Selye, 1955). É importante ressaltar que, neste eixo, o CRH exerce um papel principal no controle da liberação de hormônio adrenocoticotrófico (ACTH) pela hipófise, regulando dessa maneira a liberação de glicocorticóides e mineralocorticóides pela adrenal.

Nos últimos anos, alguns grupostêm estudado o papel da responsividade ao estresse, do comportamento, da disfunção neuroendócrina, e de alterações imunológicas tanto em modelos animais de depressão (Willner 1997; Willner 2005) como em modelos de doença cardiovascular (Francis *et al*, 2001; Felder *et al*, 2003) . Estas investigações proporcionam uma visão sobre as alterações endócrinas e imunológicas que são comuns a ambos. Num estudo envolvendo o modelo de estresse crônico de restrição (*chronic mild stress*), Grippo *et al*, 2005, validaram a hipótese de disfunção neuroendócrina e neuroimune na depressão (Figura 4). A exposição de ratos machos adultos a quatro semanas de restrição e do estresse imprevisível (*unpredictable stress*) induziram ao aparecimento de sintomas análogos a depressão, como anedonia experimental (através da diminuição do consumo de solução de sacarose) e levou a disfunção do eixo HPA, à ativação do SRA e à síntese de citocinas pró-inflamatórias. Outros grupos ainda afirmam que as concentrações de citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 aumentam tanto no plasma como no SNC de roedores (Francis, 2004a; 2004b). Interessantemente, o aumento dos níveis destas citocinas correlaciona-se diretamente com o aumento dos índices de anedonia (Grippo, 2005).

Os fatos supracitados sugerem que a interação de fatores neurohumorais, tais como as citocinas, com processos centrais, como a ativação do eixo HPA, pode influenciar tanto na condição cardiovascular como em estados comportamentais, mais especificamente na depressão. A ação do TNF- α na função cardiovascular pós - IM aparece bem descrita, contribuindo para disfunção ventricular esquerda, elétrica e mecânica, surgimento da cardiomiopatia hipertrófica e dilatada e surgimento de edema pulmonar (Ono *et al*, 1998; Chung *et al*, 2003; Cush *et al*, 2004). No comportamento, pouco se definiu sobre papel do aumento da concentração destas citocinas no eixo HPA, na ativação de vias centrais específicas e no surgimento dos sinais análogos à depressão.

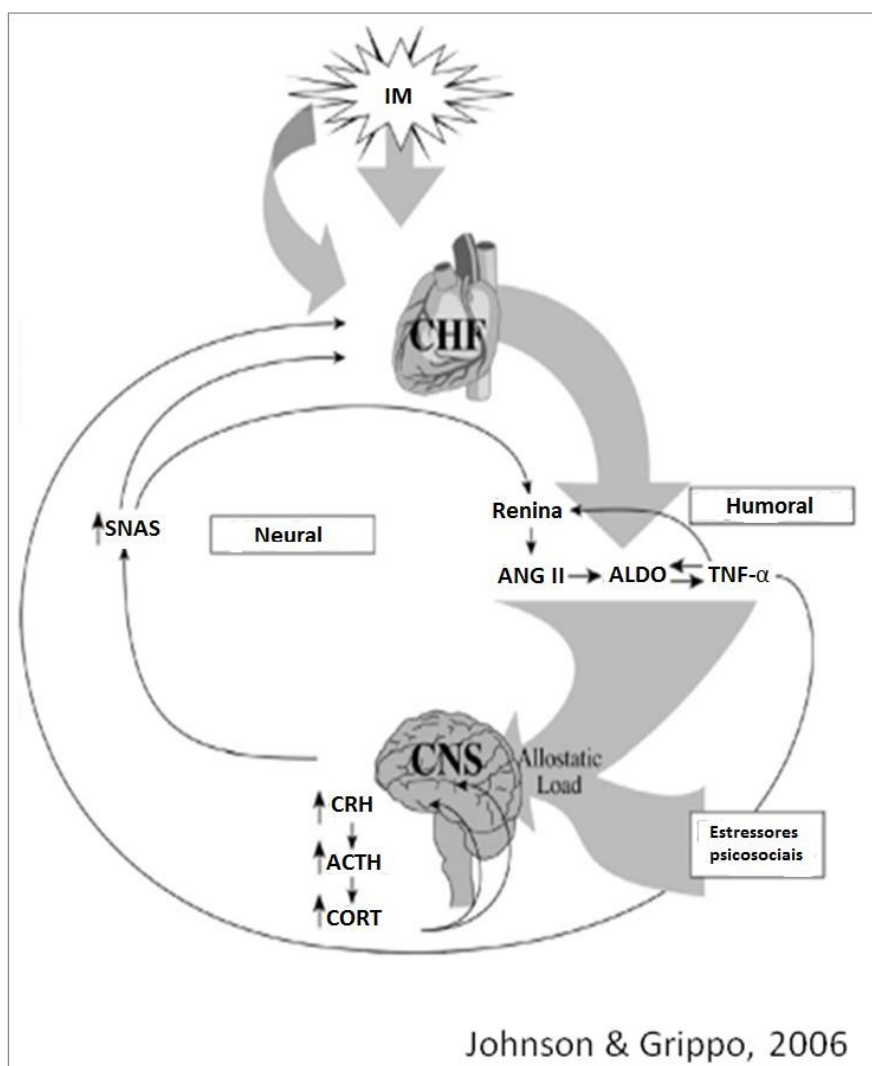


Figura 4: Via neuroimuno/neuroendócrina da depressão após injúria cardiovascular. O IM leva a ativação de fatores neurohumorais, que levam à síntese de citocinas pró-inflamatórias e à hiperativação do eixo HPA. Tais alterações em conjunto induzem ao surgimento de sinais análogos a depressão. Johnson e Grippo, 2006.

Receptores desta citocinas, mais precisamente de TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-6, têm sido encontradas no hipocampo e hipotálamo de roedores. Os caminhos de comunicação precisos entre o envolvimento cardiovascular e central ainda não foram muito bem elucidados, mas algumas rotas já foram propostas, como a participação de órgãos circumventriculares e a ação parácrina em hipocampo e hipotálamo, como mostra a figura 5 (Turnbull e Rivier, 1999). As citocinas influenciam também diretamente na ação de neurotransmissores envolvidos na fisiopatologia da depressão, como as monoaminas (Zalcman *et al*,1994;Anismam *et al*, 2008).

Adaptado de Turnbull e Rivier, 1999

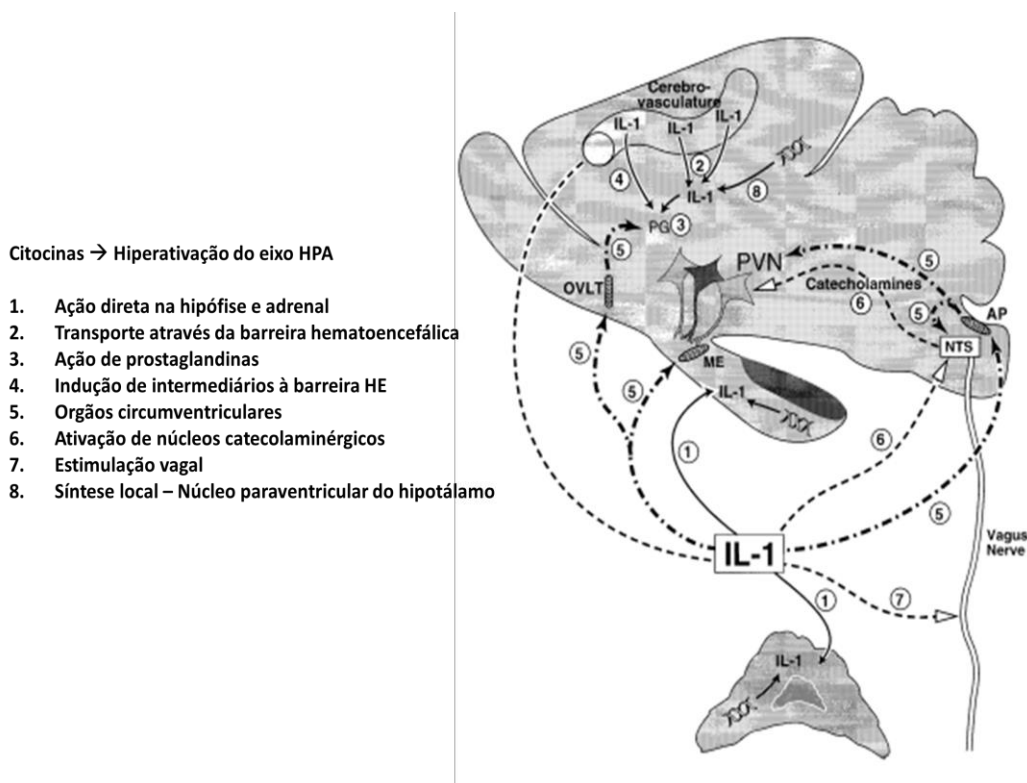


Figura 5: Vias de comunicação entre citocinas periféricas e centrais no eixo HPA. Dentre as mais estudadas, a ação direta na hipófise e adrenal, a participação de órgãos circumventriculares e, mais recentemente, a síntese local no hipotálamo. Adaptado de Turnbull e Rivier, 1999)

A hiperativação do eixo HPA em modelos de estresse agudo e crônico tornou-se uma das principais vertentes a respeito do surgimento da depressão humana (Watson e Mackin, 2007). Em roedores, modelos de estresse com níveis elevados de corticosterona demonstraram induzir comportamentos análogos a depressão em testes comportamentais, principalmente pela diminuição significativa no consumo de sacarose no teste de preferência por sacarose e pelo aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado e no teste de suspensão pela cauda (Casarotto *et al*, 2007; Crupi *et al*, 2010).

Uma das explicações atuais para a associação entre comportamento depressivo e altas concentrações de ACTH, CRH e a corticosterona, é o envolvimento direto destes hormônios na expressão de uma família de proteínas no SNC, denominadas neurotrofinas.

2.5. Neurotrofinas

Em 1953 foi identificada a primeira neurotrofina, o Fator de Crescimento do Nervo (*Nerve Growth Factor* – NGF) (Lessmann *et al.*, 2003). Esta descoberta ampliou o horizonte da neurobiologia para a identificação e elucidação de suas funções celulares. Trinta anos após a identificação do NGF, em 1982, outro protótipo foi isolado em

neurônios do sistema nervoso autônomo de porcos, chamado de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor – BDNF*). A partir de então, quatro membros adicionais da família das neurotrofinas foram identificados: Neurotrofina-3 (Neurotrophin-3 – NT-3) em 1990, Neurotrofina-4/5 (Neurotrophin-4/5 – NT-4/5) em 1991, Neurotrofina-6 (Neurotrophin-6 – NT-6) em 1994 e Neurotrofina-7 (Neurotrophin- 7 – NT-7) em 1998 (Lessmann et al., 2003).

A descoberta dos receptores das neurotrofinas ocorreu várias décadas após a identificação do NGF, e, sem dúvida, foi um avanço na neurobiologia, pois forneceu ferramentas para a busca das rotas controladas já conhecidas (Ras, Rap-1, Cdc-42-Rac-Rho, MAPK, PI-3-kinase e phospholipase-C ou PLC - figura 6C). Estas vias de sinalização intracelular moduladas pelas neurotrofinas estão envolvidas não apenas em mecanismos patológicos relacionados a doenças, como também na modulação no fenômeno de plasticidade neuronal fisiológica, no que diz respeito à sobrevivência, manutenção, riqueza dendrítica e proliferação de novos neurônios. Como exemplo, cita-se a ativação de MAPK na região do CA1 do hipocampo de roedores pelo NGF, aumentando a proliferação de células granulares (Walz et al., 2000).

A família dos receptores tirosina-quinases – Trk – é composta por três receptores que podem ser ativados por uma ou mais neurotrofinas (figura 6A): NGF, BDNF, NT-3 e NT-4/5. Os receptores do tipo TrkA, TrkB ou TrkC possuem afinidade, respectivamente, por NGF, BDNF ou NT-4/5 e NT-3. O receptor pan-neurotrofina, p75NTR (figura 6B) regula a resposta aos receptores Trk. Na presença de p75NTR, o NT-3 é muito menos efetivo em ativar a TrkA, e o NT-3 e o NT-4/5 são muito menos efetivos em ativar a TrkB. De forma oposta, a presença de p75NTR aumenta a especificidade do TrkA e do TrkB aos seus ligantes primários, NGF e BDNF, respectivamente (Huang e Reichardt, 2003). Estudos sobre as relações entre as neurotrofinas, seus receptores e os seus efeitos ainda estão em andamento e muito precisa ser compreendido, justamente devido à grande complexidade destas relações, além das cascatas específicas que os ativam.

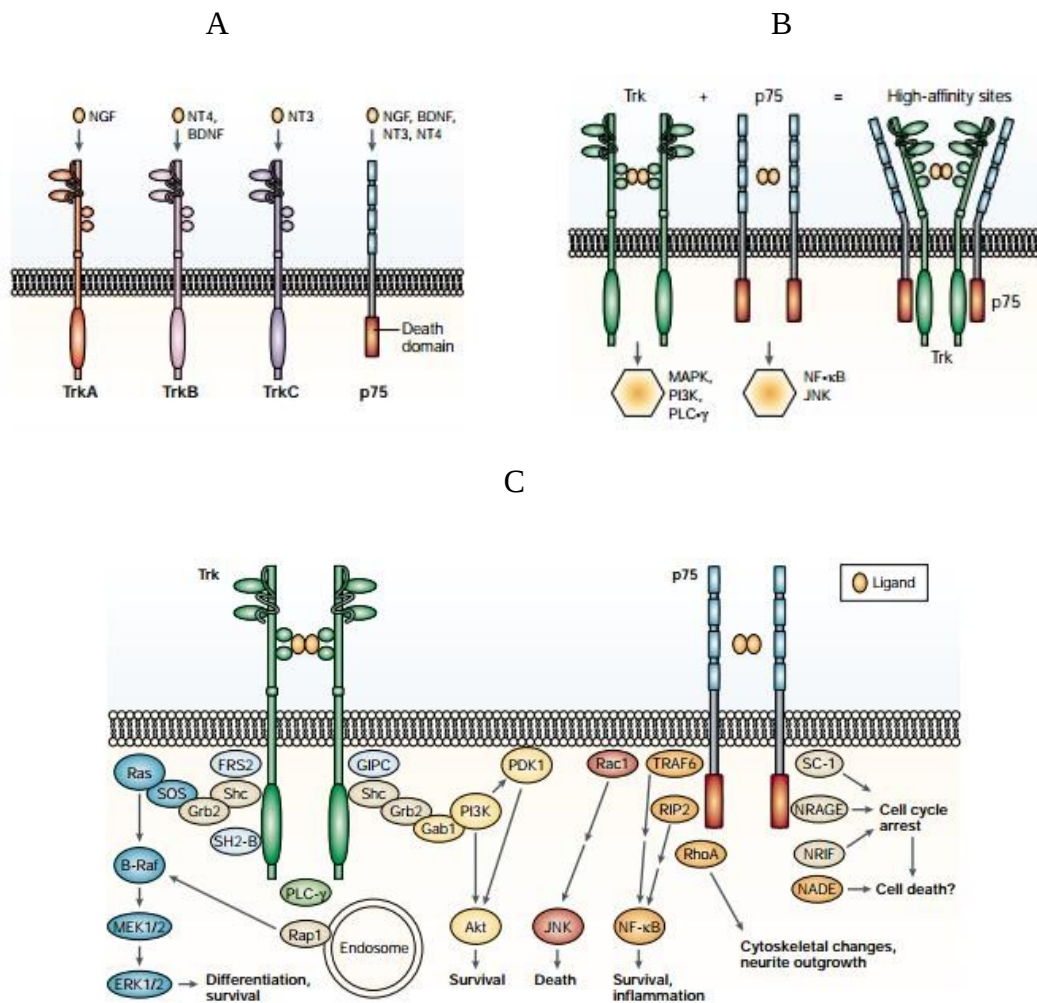


Figura 6: A: Tipos de receptores das neurotrofinas. B: Função moduladora do receptor p75 na afinidade do receptor Trk β . C: Principais vias de sinalização pós ativação de receptores do tipo Trk e p75. Adaptado de Chao *et al.*, 2003.

Diversos estudos nas últimas duas décadas têm sugerido que a indução do BDNF/TrkB é um dos mecanismos responsáveis pelos efeitos terapêuticos dos estabilizadores do humor e dos antidepressivos (Coyle e Duman, 2003; Nibuya *et al.*, 1995). Por exemplo, tem sido demonstrado que o uso de antidepressivos modulam a fosforilação do receptor TrkB e do fator de transcrição CREB, responsável pela síntese de pró - BDNF (Einat *et al.*, 2003; Rantamäki *et al.*, 2006).

2.6. BDNF

Como supracitado, o BDNF foi descoberto em 1982 (Barde *et al.*, 1982) como a segunda de uma família de moléculas com atividade neurotrófica cuja primeira a ser identificada foi o NGF (Levi-Montalcini e Hamburger, 1951). O BDNF é considerado a principal neurotrofina do SNC, sendo produzido principalmente pela glia e pelos núcleos neuronais. Tem grande expressão no hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala e cerebelo (Shimizu *et al.*, 2003). Nestas regiões, o BDNF faz a modulação de diversas

funções sinápticas, induzindo estímulo à maturação, nutrição, crescimento e integridade neuronal.

2.6.1. BDNF na depressão

Ao longo da última década, as hipóteses inerentes a depressão como resultado da diminuição dos níveis de BDNF e a ação antidepressiva deste fator têm sido altamente influentes. A administração de BDNF foi associada à atividade antidepressiva em vários modelos de depressão em roedores (Lyons *et al*, 1999; Siuciak *et al*, 1996, 1997) e, somado à isto, um aumento de sua expressão no hipocampo foi relatado em diferentes tratamentos antidepressivos (Nibuya *et al*, 1995). De modo inverso, a supressão de BDNF mostrou ter efeitos depressivos claros (Smith *et al*, 1995).

Sabe-se que o BDNF pode desempenhar um papel importante na depressão induzida pela ativação de eixos neuroendócrinos, como o eixo hipotálamo - hipófise - adrenal (Dwived *et al*, 2006). Estudos *in vivo* relataram que o tratamento com corticosterona exógena provoca um significativo decréscimo na síntese de BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal (Schaaf *et al*, 1998; Dwived *et al*, 2006; Jacobsen e Mórck, 2006), regiões do SNC criticamente envolvidas na regulação das emoções, motivação, aprendizagem e memória. Estudos *in vitro* demonstraram também que o tratamento com corticosterona diminuiu significativamente a síntese de BDNF em cultura primária de neurónios do hipocampo (Li *et al*, 2007, Yu *et al*, 2004). Como exemplo, Jacobsen e Mórck, 2006, observou diminuição das concentrações plasmáticas de BDNF após vinte e um dias de tratamento com corticosterona exógena (32 mg/kg, s.c.) no hipocampo de ratos adultos. Mao *et al*, 2012, também observou diminuição das concentrações de BDNF, em ratos submetidos a administrações diárias (vinte e um dias) de corticosterona (40 mg/kg, s.c.). Além disso, após a última administração deste protocolo comportamental, foram observadas diminuição do consumo de sacarose e aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado, confirmando as alterações no comportamento.

Os antidepressivos também são capazes de aumentar os níveis séricos de BDNF (Frey *et al*, 2006). A administração crônica de antidepressivos aumenta a expressão no hipocampo e córtex pré-frontal (Duman *et al*, 2000). Os antidepressivos ISRS atuam através de mudanças adaptativas na transdução de sinal intracelular (Nestler *et al*, 2002; Gonul *et al*, 2005). Por exemplo, a serotonina tem efeitos protetores neuronais através da ativação do AMPc e CREB, que levam à expressão do BDNF (Zuccato e Cattaneo, 2007).

O ACTH e o CRH também mostraram influenciar de forma direta nos níveis de BDNF, não só pela influência na ação da corticosterona, (Tapia *et al*, 2004; Martinowich *et al*, 2007). Jeanneteau *et al*, 2012 e Dolotov *et al*, 2006, mostram níveis hipotalâmicos e plasmáticos, respectivamente, de CRH e ACTH em ratos que apresentam níveis hipocámpais diminuídos de BDNF. Tais afirmativas elucidam um importante mecanismo contra-regulatório entre estes fatores, importante para a

manutenção da homeostase (Otten *et al*, 1979; Tapia *et al*, 2004; Martinowich *et al*, 2007; Jeanneteau *et al*, 2012).

2.7. Hipocampo e a Depressão

Embora tradicionalmente relacionado a processos cognitivos como aprendizado e memória (Riedel *et al*, 2001), o hipocampo está envolvido também com a resposta ao estresse (Lathe, 2001). Ele é ativado por diferentes estressores (Lathe, 2001) e participa do processamento de informações em eventos ameaçadores (Gray e McNaughton, 2000). O hipocampo possui grande densidade de receptores para corticosterona, CRH e ACTH que, quando ativados, inibem a atividade do eixo HPA, limitando a resposta ao estresse (Herman e Cullinan, 1997). Além disso, ele também pode se tornar um alvo para os efeitos deletérios do estresse.

A exposição a estressores significantes induz remodelamento dendrítico em células piramidais hipocampais (Magarinos *et al*, 1997) e diminuição da neurogênese no giro denteado do hipocampo de animais de laboratório, incluindo primatas (Gould *et al*, 1999). Estas alterações parecem ser mediadas pelo aumento de corticosteróides que acompanha os eventos de estresse (Sapolski *et al*, 1990), já que a remoção das adrenais previne a inibição da neurogênese induzida pelo estresse (Tanapat *et al*, 2001).

Em humanos, níveis elevados de cortisol durante a vida levam a atrofia hipocampal (Lupien *et al*, 1998) e têm sido relacionado a déficit cognitivos observados em pacientes deprimidos (Sheline *et al*, 2003). Drogas antidepressivas previnem a atrofia hipocampal nesses indivíduos (Sheline *et al*, 2003). Em ratos, o tratamento crônico com essas drogas aumenta a neurogênese (Malberg *et al*, 2000; Duman *et al*, 2001) e a síntese de BDNF no hipocampo.

Recentemente foi demonstrado que o bloqueio radiológico da neurogênese hipocampal impede o desenvolvimento dos efeitos comportamentais dos antidepressivos em camundongos (Santarelli *et al*, 2003) e que animais com níveis diminuídos de BDNF ou alterações nos seus receptores não respondem a estas drogas (Saaralainen *et al*, 2003). Isto sugere que o efeito terapêutico dos antidepressivos depende da presença da neurotrofina.

Os fatos supracitados indicam que eventos estressantes teriam um efeito neurotóxico sobre o hipocampo, provavelmente mediado hiperativação do eixo HPA e pela diminuição dos níveis de BDNF, predispondo ao desenvolvimento da depressão (Brown *et al*, 1999; McEwen, 2000).

Estudos neuroquímicos e eletrofisiológicos mostram que o processo de neurogênese no hipocampo gera neurônios funcionais e integrados aos circuitos hipocampais (van praag *et al*, 2002). Eles poderiam repor a perda de outros neurônios, conferindo maior plasticidade. Os novos neurônios são mais susceptíveis a sofrerem

potencialização de longa duração no hipocampo (LTP), um fenômeno relacionado ao aprendizado e à memória (Snyder e Kee, 2001; Shors *et al*, 2001), portanto, estas novas células poderiam estar envolvidas no processamento de tarefas cognitivas (Gould *et al*, 1999). Situações de estresse poderiam, por inibir a neurogênese, prejudicar a aquisição e consolidação de respostas adaptativas que facilitariam o desempenho frente a fatores de estresse já conhecidos.

2.8. A Neurogênese no Infarto do Miocárdio

Até hoje, apenas alguns grupos relatam a influência do IM sobre a neurogênese de estruturas límbicas importantes na depressão. Hwang *et al*, 2009 relatam diminuição do número de células proliferadas no hipocampo em ratos submetidos ao IM experimental, através da técnica de imunohistoquímica para detecção de Ki-67, um fator endógeno e marcador da neurogênese. Wann *et al*, 2007, relataram aumento da apoptose em células hipocampais, pós – IM e Kaloustian *et al*, 2008, relataram estas alterações à suposta diminuição da síntese de BDNF. Experimentalmente, nenhum destes associou estas alterações a mudanças neuroimunes e neuroendócrinas, como a produção de citocinas e a hiperativação do eixo HPA. Somado a isto, não utilizaram de um protocolo a curto e longo prazo para tal elucidação em tempos distintos. Esta ausência de estudos abre uma enorme lacuna, gerando diversos questionamentos sobre o modelos de depressão pós – IM.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

- 1- Avaliar, num protocolo de quatro e outro de vinte e cinco dias, o comportamento de ratos submetidos ao IM experimental.
- 2- Quantificar, nos mesmos protocolos, a concentração de citocinas pró-inflamatórias, de hormônios do eixo HPA, e dos níveis de BDNF.
- 3- Avaliar a influência do IM e da depressão na neurogênese hipocampal.

3.2. Objetivos Específicos

- 1- Confirmar se o modelo de IM em ratos induzido por ligadura da artéria coronária esquerda induz alterações comportamentais análogas a depressão humana, através do teste de campo aberto, do teste do nado forçado, e do teste de preferência por sacarose, num protocolo realizado à curto prazo (quatro dias) e outro a longo prazo (vinte e cinco dias)
- 2- Quantificar os níveis de TNF- α no músculo cardíaco, no modelos de depressão pós-IM, nos mesmos protocolos supracitados.
- 3- Quantificar as concentrações de TNF- α e IL-1 β no plasma, nos mesmos protocolos.
- 4- Quantificar os níveis de TNF- α e IL-1 β no hipotálamo, nos mesmos protocolos.
- 5- Avaliar o perfil do eixo HPA no modelos de depressão pós-IM, através da mensuração dos níveis de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no hipotálamos e das concentrações plasmáticas de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de corticosterona, nos mesmos protocolos supracitados.
- 6 - Quantificar, no modelos de depressão pós-IM, os níveis de BDNF hipotalâmicos, nos mesmos protocolos supracitados.
- 6- Avaliar, no modelo de depressão pós-IM, a neurogênese no hipocampo, através da avaliação imunohistoquímica da proteína ki-67, marcador de proliferação neuronal, nos mesmos protocolos supracitados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Para a realização do presente estudo foram utilizados ratos machos *Wistar* (200 à 250g), obtidos do biotério central do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCFis) da UFRRJ. Todos os animais foram mantidos no biotério de experimentação do DCFis, com temperatura controlada (~22°C), exposição diária de 12 horas ao ciclo claro-escuro e livre acesso à ração e água.

4.2. Comitê de ética

A presente investigação foi submetida e aprovada pelo comitê de ética institucional da UFRRJ (COMEP-UFRRJ – 23083.004741 / 2012-19) 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. Grupos

Neste experimento, foram formados dois grupos, em dois protocolos distintos. Um grupo infartado e outro falso-operado (sham), num protocolo de quatro dias e os mesmos dois grupos num protocolo de vinte e cinco dias:

Protocolo de 4 dias ⇨ Sham (n = 16)

 Infarto (n = 14)

Protocolo de 25 dias ⇨ Sham (n = 15

 Infarto (n = 14)

4.4. Cirurgia de infarto do miocárdio

O IM foi realizado como descrito por Johns & Olson (1954) e Selye *et al* (1960) e modificado por Olivares *et al* (2004; 2007; 2012). Após anestesia com isofluorano (Forane ® *Abbott Laboratories*, Argentina) em saturação aproximada de 5% para indução e 2% para manutenção em aparato inalatório com bomba respiratória artificial e máscara inalatória manufaturada, os animais foram fixados numa pequena mesa cirúrgica de madeira revestida por fórmica em decúbito dorsal. Após tricotomia ampla em nível torácico, os animais foram submetidos à incisão da pele ao nível para-esternal esquerdo de aproximadamente 11 cm de comprimento, localizada 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 dissecados objetivando a visualização do gradil costal esquerdo. Neste momento, foi realizada sutura em bolsa da pele e dos músculos da região, deixando o nó aberto até o término da cirurgia. Com o auxílio de uma pinça hemostática (Kelly 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 esquerda, 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 em sua posição anatômica original e o nó da sutura em bolsa foi finalmente fechado. Após a cirurgia, os animais foram submetidos à ventilação mecânica através de um pequeno ambú manufacturado, com o intuito de estimular os movimentos respiratórios espontâneos. No caso do grupo controle (animais falso-operados / 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.

Para a analgesia e antibioticoterapia, foram administrados 10mg/kg do analgésico opioídeo Cloridrato de Tramadol (Genéricos Hipolabor) e 0,2mL/rato de Pentabiótico Veterinário[®] (Fort Dodge Saúde Animal), respectivamente. Após a recuperação da anestesia, isto é, com os animais exibindo atividade motora espontânea e deambulação, os mesmos foram reconduzidos ao biotério.



Figura 7: Exteriorização do coração na cirurgia de infarto do miocárdio, realizada através da ligadura da artéria coronária esquerda. Zornoff *et al*,2009.

4.5. Eletrocardiograma (ECG)

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, para análise em derivação D1. Imediatamente após a cirurgia, e ainda sob efeito anestésico, os animais foram conectados ao sistema de aquisição eletrocardiográfico do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ (Amplificador DP-311/Warner Instruments, Interface Powerlab/ADInstruments), para registro do ECG. Os sinais foram adquiridos com a velocidade de 10 k-hertz e amplitude com resolução de 32 bits e, para visualização e análise dos registros, foi utilizado o software Labchart 6.

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

Para confirmação do infarto, foram realizados registros de 30 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 descartados.

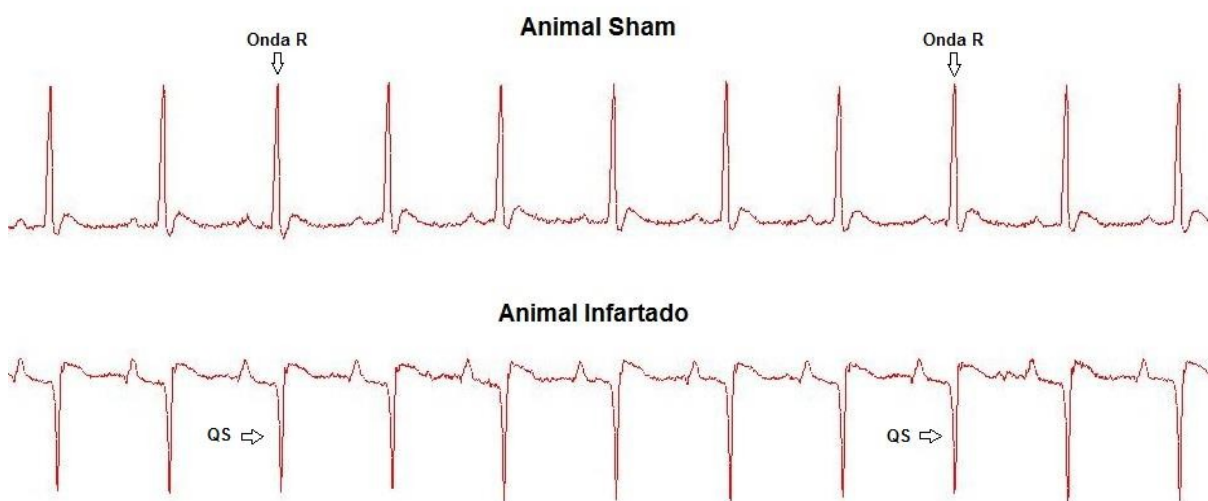


Figura 8: Duas imagens representando os registros eletrocardiográficos de um animal sham (em cima) e de outro infartado (embaixo). Um ECG normal constitui-se onda P, referente à despolarização atrial, o complexo QRS, à despolarização ventricular e a onda T, à repolarização ventricular. No IM, devido à fibrose ventricular esquerda, a onda R não aparece, configurando um novo complexo, desta vez chamado de QS (Acervo próprio).

4.6. 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 vinte e cinco quadrantes de mesmo tamanho (Figura 9). Os animais foram colocados no centro do campo isoladamente e, durante cinco minutos, exploraram livremente os quadrantes. O quadrante foi computado logo que o rato o cruzou com ambas as patas traseiras. Foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: atividade horizontal, quantificando-se os quadrantes percorridos, periféricos e central, separadamente e o tempo de inatividade. 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 tecnologia 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 (Prut & Belzung, 2003). 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).

Neste experimento, os testes foram realizados um dia antes do término dos protocolos, ou seja, um dia antes da eutanásia dos animais (três ou vinte e quatro dias)



Figura 9: Prática do TCA no DCF (Acervo próprio).

4.7. 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, em outras palavras, a diminuição da busca pelo prazer (Rygula *et al.*, 2005). As mensurações foram realizadas nas quatro semanas que antecederam a cirurgia, para habituação ao teste, entre o primeiro e o segundo dia pós - IM no protocolo curto e entre o vigésimo segundo e vigésimo terceiro dia pós – IM no protocolo longo. Durante o teste, os animais foram isolados, num período de vinte e quatro 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 volume das garrafas antes e após as vinte e quatro 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, no período de habituação. Não houve privação alimentar durante os testes e, após o término, os animais foram realocados em suas caixas habituais e as soluções descartadas.

4.8. Teste do nado forçado

O teste de nado forçado foi realizado em duas etapas: um pré-teste, que consiste em 15 minutos no aparato, vinte e quatro horas antes e do teste em si, conforme descrito originalmente por Porsolt (1978). O teste consiste em colocar cada animal num tanque cilíndrico de plástico (45 cm de altura diâmetro × 25 cm) preenchido com 30 cm de água mantida entre 22-25°C (Wann *et al*, 2007; Porsolt *et al*, 1978), durante o tempo máximo de 6 minutos (Figura 10). O avaliador marcou o tempo gasto nadando e o tempo de imobilidade (Wann *et al*, 2007; Porsolt *et al*, 1978).

O uso do nado forçado é relatado na literatura em experimentos envolvendo exercício físico, condicionamento e em modelos comportamentais para indução à depressão (Stevenson *et al*, 1964; Castagné *et al*, 2011). Neste experimento, foi utilizado como modelo de avaliação da depressão. A principal característica que o inclui como tal é a desistência do animal em querer escapar da água, característica essa classificada como desistência a vida, sinal análogo a depressão psicológica humana (Borsini *et al*, 1988)

Neste experimento, o pré-teste foi realizado no segundo dia pós – IM no protocolo curto e no vigésimo terceiro dia pós – IM no protocolo longo.



Fonte: INEC, USP

Figura 10: A: Ilustrativo do teste do nado forçado INEC, USP. B: Prática do teste no DCFis (acervo próprio).

4.9. Estudo *post-mortem*

4.9.1. Eutanásia

No quarto dia (curto prazo) e no vigésimo quinto dia (longo prazo) pós-IM, os animais foram eutanasiados pelo método de decaptação em guilhotina. Após centrifugação do sangue em 3.360 g, as amostras de plasma foram armazenadas em eppendorfs e posteriormente acondicionadas em freezer -20°C do DCFis. Os tecidos,

(hipotálamo, hipocampo e coração) foram armazenados também em ependofs e acondicionados em freezer -80°C. O coração foi dividido em quatro fatias, A, B, C e D, como descrito por Pfeffer *et al* (1979). A fatia C foi armazenada em formol à 10% para histopatologia.

4.9.2. Perfusão

No último dia de cada protocolo após o procedimento de eutanásia supracitado, outra parcela dos animais, também de todos os grupos, foram anestesiados profundamente com tiopental (0,1ml/100g de peso corporal). Após abertura completa do tórax e exposição do coração, os animais foram perfundidos com cânula manufaturada com catéter para flebocentese número 18, em ventrículo esquerdo (Figura 11), com bomba de perfusão (Modelo EL -500, Insight® Brasil), primeiramente com uma solução composta de água destilada, cloreto de sódio, tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4 e heparina, para limpar o tecido e evitar a formação de coágulos durante a perfusão. Secundariamente, foram perfundidos pela solução fixadora, composta de paraformoldeído 4% e tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4. Após o término, os encéfalos foram removidos cuidadosamente da caixa craniana e levados para a pós-fixação por 8 horas, na mesma solução de paraformoldeído 4% utilizada durante a perfusão. Posteriormente, foram colocados em solução com sacarose à 30% com tampão fosfato-salino 0,1 M (PBS) e acondicionados em refrigerador do DCFis para futura utilização (Hoffman *et al*, 2008).

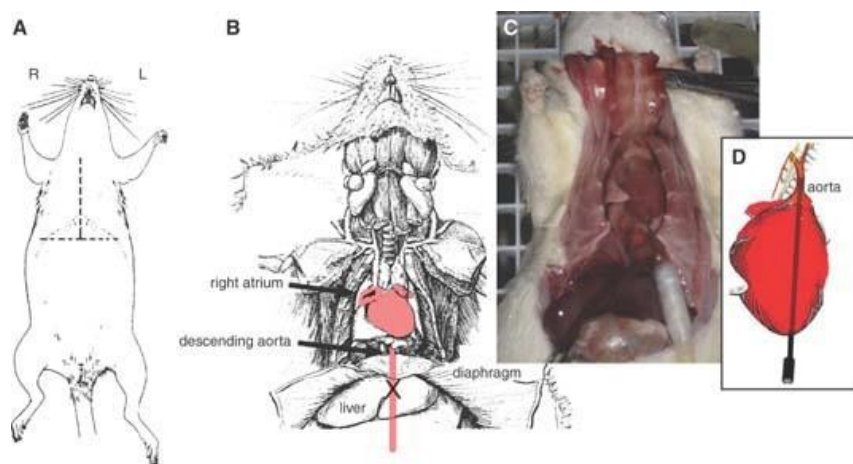


Figura 11: Técnica de perfusão em ratos. A: posição para o procedimento e exposição torácica. B: Localização anatômica e topografia cardíaca para introdução da cânula. C: Cânula em ventrículo esquerdo de rato. D: Ilustração de cânula dentro do ventrículo esquerdo e posicionamento próximo a artéria aorta para perfusão tecidual adequada.

4.9.3. Histopatologia do coração

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 deixá-lo resfriar 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 ^o	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

4.9.4. 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 *Image J* (version 1.27z, National Institute of Health, E.U.A.) que permitiu medir o tamanho do infarto no corte C e , de forma aproximada, do ventrículo esquerdo (VE).

4.9.5. ACTH e corticosterona plasmáticos

Como método de mensuração foi utilizado o radioimunoensaio. As amostras de plasma (25µL) foram colocadas em um tubo de ensaio ao qual foi adicionado etanol (1ml) para a extração dos hormônios; os tubos foram centrifugados sob refrigeração (4°C; 15 minutos; 2430 g) e, em seguida, os sobrenadantes foram vertidos em outros tubos para o processo de liofilização. O material liofilizado, por sua vez, foi armazenado a 20 °C até a realização do radioimunoensaio, quando foi ressuspensão em 500 µl de tampão fosfato. Os níveis plasmáticos do ACTH e da corticosterona foram quantificados a partir da utilização de padrões e anticorpos específicos, adquiridos a partir da *Sigma* (EUA) para corticosterona e *MP Biomedicals* (EUA) para ACTH. A separação das frações livre e ligada foi realizada com utilização de carvão-dextran (0,5/0,05%). A radioatividade foi lida em contador gama da marca *GMI Inc* (Cobra II, Packard®, EUA). As concentrações de ACTH foram avaliadas em pg/ml; para a corticosterona, ng/ml.

4.9.6. TNF-α e IL-1β plasmáticos

Os níveis de TNF-α e IL-1β em ratos foram medidos usando um kit ELISA ultra-sensível (*Biosource International*, EUA) específicos para cada um, usados de acordo com as instruções do fabricante. Os detalhes da metodologia são descritos por Francis *et al*, 2003. Resumidamente, uma microplaca de 96 poços para cada protocolo foi revestida com anticorpos específicos para as citocinas. Após as amostras (100 uL) serem adicionadas em duplicata nas microplacas, foram incubadas por duas horas e depois lavadas com tampão fosfato por cinco vezes. Subsequentemente, foram adicionados 100 ul de solução com anti-anticorpos , incubando, desta vez por quarenta e cinco minutos e lavando-as. Posteriormente, foi adicionado solução de estreptavidina-peroxidase conjugada (100 ul), incubando por 45 minutos e lavando por mais uma vez.. Finalmente, foi adicionado 100 uL de solução de cromégeno, incubando pela última

vez, no escuro, durante 15 min. A reação foi parada com HCl e lida a 450 nm utilizando um leitor de placas de ELISA (*Biotek ELX 800*, EUA). A concentração mínima detectável de TNF- α foi 0,1 pg / ml e de IL-1 β de 1 pg / ml

4.9.7. TNF – α e IL-1 β hipotalâmicos

Os níveis hipotalâmicos das citocinas foram medidos tal como descrito por Irwin *et al*, 1999. Resumidamente, os tecidos foram homogeneizados em tampão HEPES 0,1nM, contendo um grupo de inibidores de protease e um detergente (21 mM de leupeptina, aprotonina 31 nM, 10 nM de PMSF, e 1% de Triton X-100). As amostras foram centrifugadas durante 15 min a 13.430 g e o sobrenadante foi recolhido. O conteúdo de proteína da amostra foi mensurada utilizando um ensaio proteico Bio-Rad (*Bio-Rad Laboratories*, EUA) com BSA como padrão. As amostras foram armazenadas a -20 ° C até serem analisadas utilizando o kit de ELISA ultrasensível (*Biosource Internacional*, EUA) como descrito anteriormente. Os níveis de cada citocina foram expressas em picogramas por miligrama de proteína. A concentração mínima detectável de TNF- α foi de 1 pg/ μ g de proteína e de IL-1 β de 3 pg/ μ g de proteína.

4.9.8. CRH hipotalâmico

No caso do CRH, os níveis hipotalâmicos foram avaliados através também de ensaio imunoenziático, através de kit ELISA ultrasensível (*Biosource international*, EUA), como no item anterior. A concentração mínima detectável foi de 1 pg/ μ g de proteína.

4.9.9. TNF- α cardíaco

Neste caso, os níveis cardíacos foram avaliados através de Kit ELISA ultrasensível (*Biosource international*, EUA), como nos itens anteriores. A concentração mínima detectável foi de 10 pg/g de proteína.

4.9.10. Concentrações plasmáticas de BDNF

As concentrações de BDNF foram determinadas com um kit ELISA (ChemiKine, Cat. CYT306, MERCK MILLIPORE, EUA). Para este kit, anticorpos policlonais que revestiram as placas foram gerados contra BDNF humano. O BDNF capturado foi detectado usando anticorpos monoclonais de biotina conjugada de camundongo. Os anticorpos de BDNF não cruzaram com NGF, NT3 e NT 4/5. A concentração mínima detectável foi de 6 pg/ml. O procedimento foi realizado conforme as instruções do kit. As amostras foram diluídas em tampão de homogeneização e em tampão TRIS (pH 7.4). Os ensaios foram realizados em duplicata. As concentrações foram expressas em pg/ml (Béjot *et al*, 2011).

4.9.11. Imunofluorescência

Cortes coronais de 20 µm foram feitos por todo giro denteado hipocampal (bregma – 2.3 mm até – 6.3 mm) com auxílio do atlas Paxinos & Watson, 2013, através de um micrômetro (modelo CM 100, *Leica Microsystem*, Reino Unido). Os cortes foram montados descongelados em lâminas revestidas por aminopropiltrióxido (APES, *Sigma - Aldrich*, EUA) e então armazenadas em temperatura – 20 ° C. Oito cortes uniformemente espaçados foram selecionados do giro denteado por um método randômico (Mayhew e Burton, 1988) e fixados em solução de paraformaldeído 0,5 % (pH 7,4) por 3 minutos. As reações seguintes foram realizadas em sala com temperatura controlada e todos os anticorpos utilizados foram diluídos em tampão fosfato – salino (PBS). Os cortes foram incubados por uma hora com anticorpo primário anti – Ki-67 (1:150, Novocasta NCL-Ki-67-MMI), um marcador de proliferação celular (Kee *et al*, 2002). Após lavagem, foram incubados e contra-corados com iodeto de propídeo (1:3000; *Sigma – Aldrich*, EUA) por 30 segundos e montados em glicerol.

As imagens foram capturadas por uma câmera digital Hamamatsu (modelo C4742-95, Japão) operada pelo software Openlab versão 5.5.2. , através do microscópio de fluorescência Nikon (modelo EFD – 3, Japão). O número de células positivas para Ki-67 na zona subgranular (SGZ) então foram marcadas e contadas.

A SGZ foi escolhida baseada em estudos que mostram que 70% das células capazes de se dividirem no hipocampo se diferenciam em células granulares no giro denteado (Zao *El at*, 2006). O volume do giro denteado foi calculado utilizando-se o método cavalieri (Schmitz e Hof, 2005). O número de células positivas para ki-67 em cada corte foi combinado a fim de definir o número total de células proliferadas.

4.9.12 Análise Estatística

A análise estatística foi usada para a comparação dos resultados apresentados pelos grupos experimentais (não pareada). A comparação foi entre dois grupos, em todos os parâmetros. Para os parâmetros que apresentaram distribuição Gaussiana foi utilizado o teste t de student. Para aqueles que apresentaram distribuição assimétrica foi utilizado o teste de Mann - Whitney. 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 7.0).

5. RESULTADOS

5.1. Mortalidade Cirúrgica e Pós-Cirúrgica

No protocolo a curto prazo, a mortalidade durante a cirurgia de IM foi em média de 46%. Dentre os animais falso operados, a mortalidade média foi de 12 %. No período crítico pós-cirúrgico, ou seja, nas primeira vinte e quatro horas após a cirurgia, no qual o risco de óbito é maior (Pfeffer *et al*, 1979), a mortalidade foi de 10 %. No protocolo a longo prazo, a mortalidade durante a cirurgia foi de 50%. Nos animais sham foi de 16%. No período crítico, a mortalidade nos animais infartados foi de 13 %.

5.2. Histopatologia Cardíaca

Nas fatias cardíacas que foram utilizadas dos animais para confecção das lâminas histológicas, o perfil macroscópico dos corações dos grupos falso operados no protocolo curto e longo foi semelhante, seja pela arquitetura muscular, como pelo perímetro da cicatriz fibrosa e a dilatação dos VE. Nos animais infartados nos dois protocolos as alterações também foram semelhantes, exceto pela aderência do músculo cardíaco na pleura visceral. Microscopicamente, 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. O grupo infartado do protocolo curto teve uma área de infarto de 41,68%, enquanto que o grupo infartado no protocolo longo teve uma média de 44,57%. Segundo Pfeffer *et al* (1979), ambos os valores se enquadram na classificação de infarto moderado.

5.3. Comportamento

5.3.1. Efeitos do IM no teste de campo aberto nos parâmetros exploratórios

Com o objetivo de avaliar a atividade exploratória, foram avaliados o número de passagem pelos quadrantes periféricos, o número de passagens pelo quadrante central e o tempo de inatividade total no teste.

Observou-se que o número de quadrantes periféricos percorridos, como mostra a Figura 12, não sofreu alterações entre os grupos no protocolo curto, três dias pós-IM (sham; $134,2 \pm 8,9$ vs $126,2 \pm 8,2$; infarto). No protocolo longo, 24 dias pós-IM, o número de quadrantes foi significativamente menor no grupo infartado ($118,2 \pm 7,6$ vs $95,2 \pm 8,2$, $p < 0,5$).

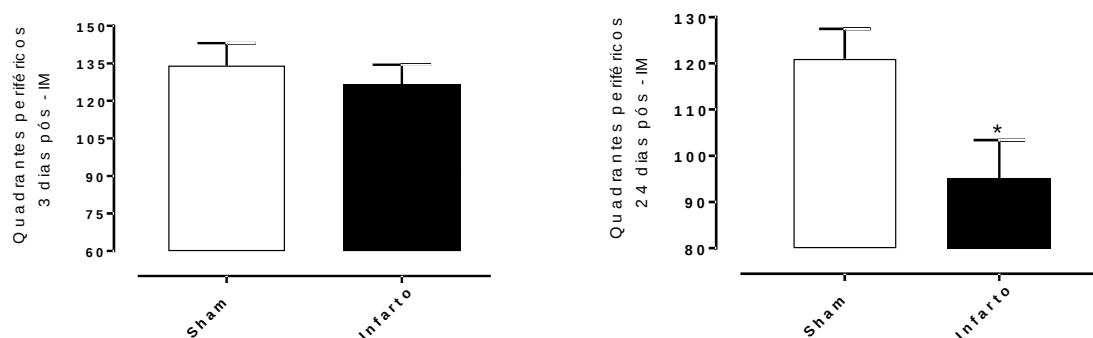


Figura 12: Número de quadrantes periféricos percorridos no TCA pós-IM no protocolo curto (esquerda) e longo (direita). Nota-se diferença significativa na exploração apenas no protocolo longo, no qual os animais infartados percorreram menos quadrantes. * $p < 0,5$ teste *Mann-Whitney*.

Em relação ao tempo total de inatividade no teste, corroborando às alterações supracitadas, apenas o protocolo longo apresentou diferenças (Figura 13). O grupo infartado apresentou tempo significativamente maior quando comparado ao grupo sham ($143,9 \pm 9,9$ vs $182,3 \pm 8,1$; $p < 0,05$)

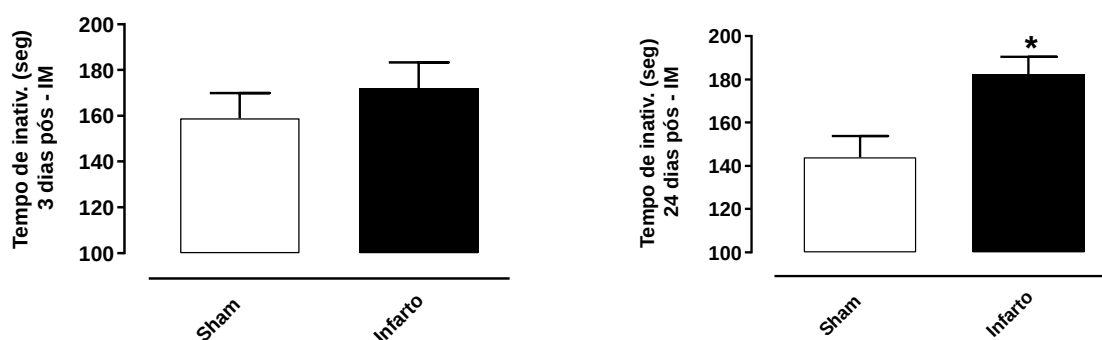


Figura 13: Tempo de inatividade total no TCA pós-IM, no protocolo curto (esquerda) e longo (direita). Refletindo as alterações na exploração nos quadrantes periféricos, os animais infartados apresentaram maior tempo de inatividade, apenas no protocolo longo. * $p < 0,05$ teste *Mann-Whitney*.

5.3.2. Efeito do IM no teste de preferência pela sacarose

Com o objetivo de avaliar a presença da anedonia no modelo de depressão pós-IM, foi avaliado a preferência pela sacarose, calculada conforme descrito na metodologia.

Neste teste (Figura 14) nota-se que, no protocolo curto, o grupo infartado apresentou porcentagem de preferência similar ao grupo sham. No protocolo longo, diferentemente, o grupo infartado apresentou preferência significativamente menor em relação ao grupo sham ($92,5 \pm 1,3$ vs $86,8 \pm 1,1$; $p < 0,05$).

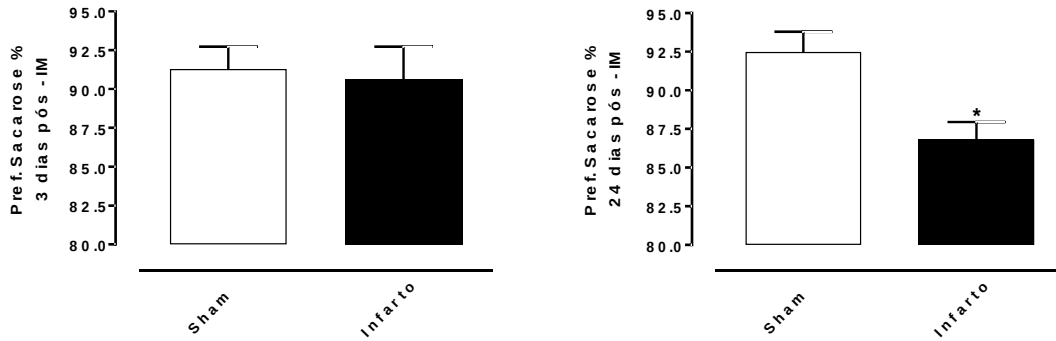


Figura 14: Preferência pela sacarose pós-IM, no protocolo curto (esquerda) e longo (direita). Os animais infartados apresentaram anedonia em relação aos animais falso operados apenas no protocolo longo. * $p < 0,05$ teste *t-student*.

5.3.4. Efeito do IM no tempo de imobilidade no teste do nado forçado

Como no TPS, objetivando avaliar a presença ou ausência de sinal análogo a depressão, foi avaliado o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.

Na Figura 15 nota-se, ao contrário do que observado até então, alterações apenas no protocolo curto. Neste, o grupo infartado permaneceu significativamente mais tempo imóvel em relação ao grupo sham ($160,5 \pm 17,2$ vs $239,3 \pm 19,5$; $p < 0,05$). No protocolo longo, não foram observadas diferenças.

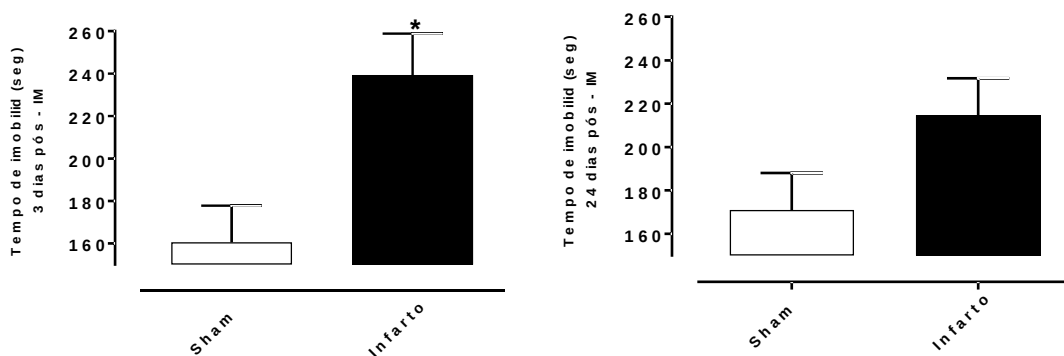


Figura 15: Tempo de imobilidade no teste do nado forçado pós-IM, no protocolo curto (esquerda) e longo (direita). Diferentemente do acontecido nos outros testes comportamentais, os animais infartados apresentaram maior tempo de imobilidade apenas no protocolo curto. * $p < 0,05$ teste *t-student*. No protocolo longo, $p = 0,065$.

5.4. Eixo Hipotálamo – Hipófise – Adrenal (HPA)

5.4.1. Efeito do IM nas concentrações hipotalâmicas de hormônio liberador de corticotrofina (CRH):

A Figura 16 mostra as concentrações de CRH nas células hipotalâmicas. Como pode ser observado, no protocolo curto, as concentrações não foram diferentes entre os grupos, mas, no protocolo longo, as concentrações de CRH nos animais do grupo infartado foram significativamente maiores quando comparadas aos do grupo sham ($29,0 \pm 0,65$ vs $41,7 \pm 2,86$).

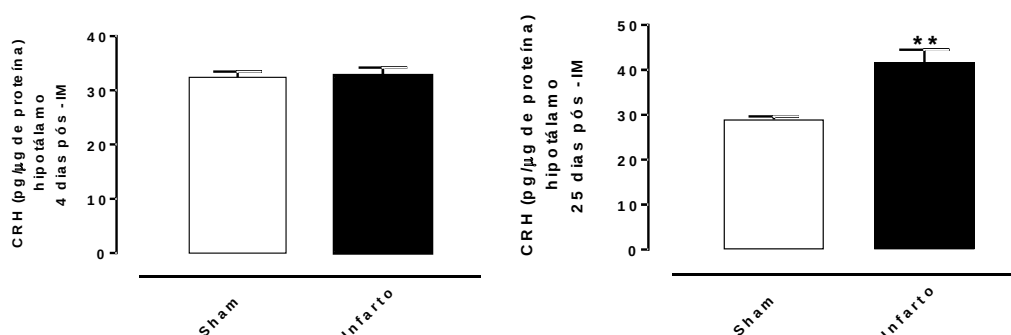


Figura 16: Níveis hipotalâmicos de CRH pós-IM, no protocolo curto (esquerda) e longo (direita). Os animais infartados apresentaram aumento significativo, observado apenas no protocolo longo ** $p < 0,01$ teste *t-student*.

5.4.2. Efeito do IM nas concentrações plasmáticas de ACTH

As concentrações plasmáticas de ACTH não sofreram alterações no protocolo curto, quatro dias pós-IM, como mostra a Figura 17. Já entre os grupos no protocolo longo, vinte e cinco dias pós – IM, as diferenças tornam-se marcantes. O grupo infartado apresenta concentrações significativamente maiores quando comparados ao grupo sham ($5,8 \pm 0,6$ vs $19,2 \pm 2,6$). Tais alterações são similares àquelas observadas nas concentrações hipotalâmicas de CRH, onde observa-se diferença entre os grupos apenas no protocolo longo.

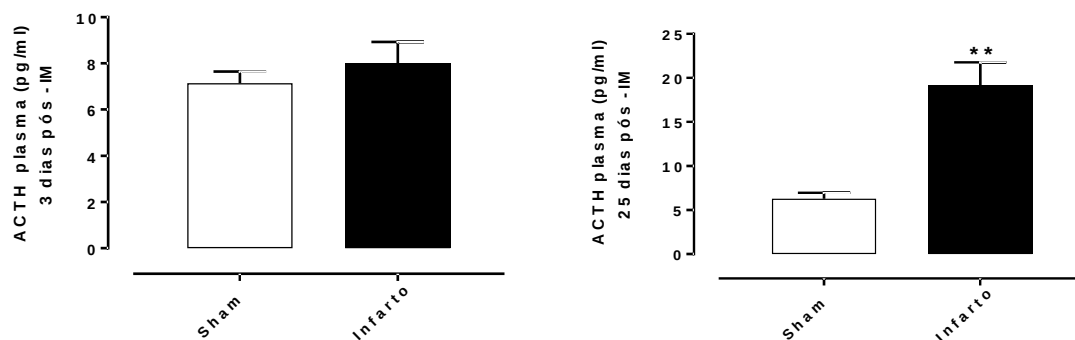


Figura 17: Concentrações plasmáticas de ACTH pós-IM, no protocolo curto (esquerda) e longo (direita). Os animais infartados apresentaram aumento em relação aos falso operados, observado apenas no protocolo longo, . ** $p < 0,01$, teste *t-student*.

5.4.3. Efeito do IM nas concentrações plasmáticas de corticosterona

Corroborando às alterações observadas nos dois últimos itens, apenas o protocolo longo apresenta diferença estatística entre os grupos. Como pode ser visto na Figura 18, a concentração de corticosterona dos animais do grupo infartado foi significativamente maior em relação aos animais do grupo sham ($191,9 \pm 7,2$ vs $252,4 \pm 10,17$).

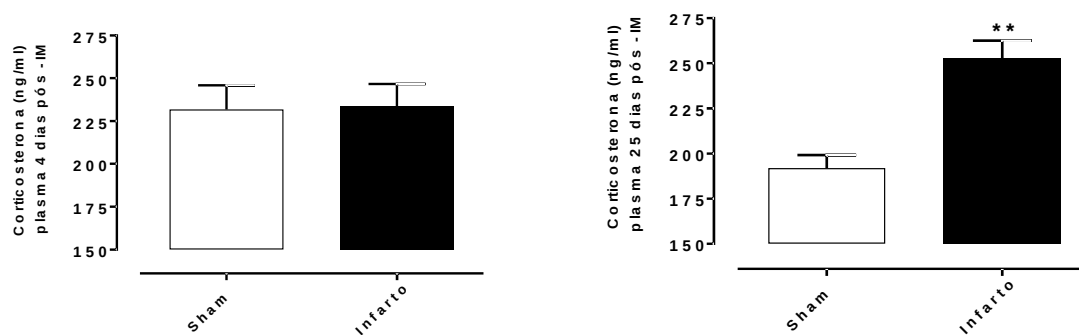


Figura 18: Concentrações plasmáticas de corticosterona pós-IM, no protocolo curto (esquerda) e longo (direita). Os animais infartados apresentaram aumento significativo em relação aos falso operados, apenas no protocolo longo, como visto com o ACTH e CRH. ** $p < 0,01$, teste *t-student*

5.5. Citocinas Pró-Inflamatórias

5.5.1. Efeito do IM nos níveis cardíacos de TNF- α

No coração, os níveis plasmáticos de TNF- α apresentaram-se alterados entre os grupos nos dois protocolos (Figura 19). No curto, os animais infartados apresentaram aumento significativo em relação aos animais do grupo sham ($85,27 \pm 7,36$ vs $876,4 \pm 63,87$). O aumento também foi significativo no grupo infartado no protocolo longo ($109,7 \pm 25,17$ vs $603,00 \pm 105,2$)

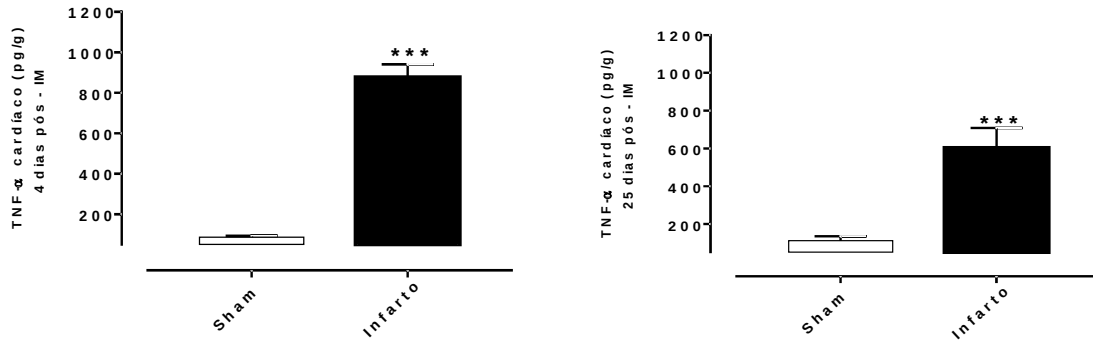


Figura 19: Níveis de TNF- α no coração. Os animais infartados apresentaram aumento em relação aos animais falso operados, observado tanto no protocolo curto como no longo. *** p < 0,001, teste *t-student*.

5.5.2. Efeito do IM nas concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-1 β

O IM promoveu alterações similares nas concentrações plasmáticas destas citocinas, tanto no protocolo curto como no longo (Figura 20 A e 20 B). No primeiro, o grupo infartado apresentou aumento significativo em relação ao grupo sham para TNF- α ($7,2 \pm 0,9$ vs $31,1 \pm 2,0$; p < 0,001) e para IL-1beta ($14,04 \pm 1,3$ vs $58,9 \pm 2,5$; p < 0,001). No longo, o aumento também foi significativo para TNF- α ($4,7 \pm 1,1$ vs $70,8 \pm 5,8$; p < 0,001) e para IL-1 β ($13,6 \pm 1,6$ vs $73,4 \pm 3,3$; p < 0,001).

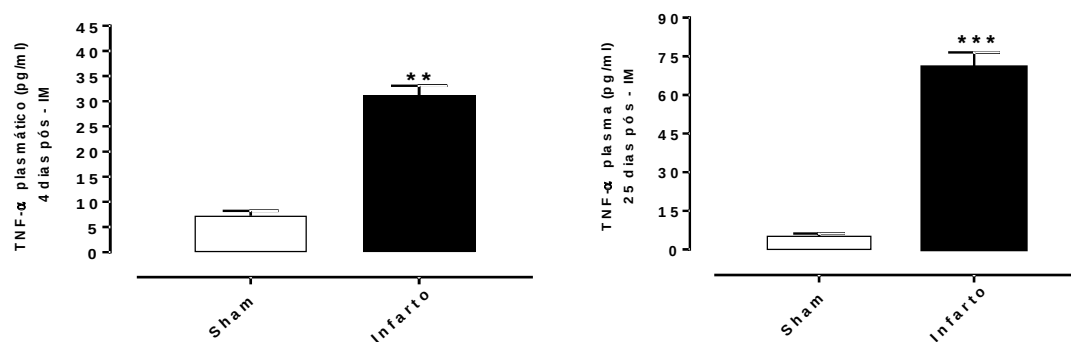


Gráfico 20A: Concentrações plasmáticas de TNF- α pós - IM. Os animais infartados apresentaram aumento significativo tanto no protocolo curto como no longo. ** p < 0,01; *** p < 0,001, teste *t-student*.

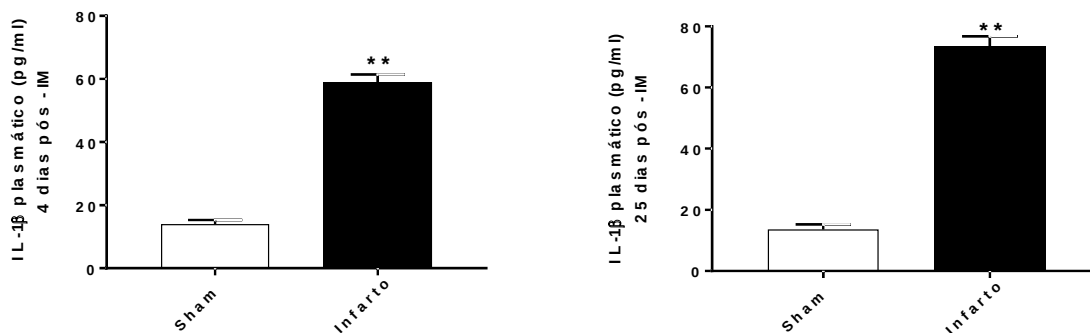


Gráfico 20B: Concentrações de IL-1 beta no plasma pós-IM. Os animais infartados apresentaram aumento em relação aos animais falso operados nos dois protocolos. ** $p < 0,01$, teste *t-student*.

5.5.3. Efeito do IM nas concentrações hipotalâmicas de TNF-alfa e IL-1beta

Diferente do constatado nas concentrações plasmáticas, apenas no protocolo longo o grupo infartado apresentou diferença em relação ao grupo sham (Figuras 21A e 21B), com aumento significativo em relação ao grupo sham para TNF- α ($2,0 \pm 0,4$ vs $9,3 \pm 0,8$; $p < 0,001$) como pode ser visto no gráfico 11 e para IL-1 β ($2,6 \pm 0,4$ vs $8,4 \pm 1,6$; $p < 0,001$).

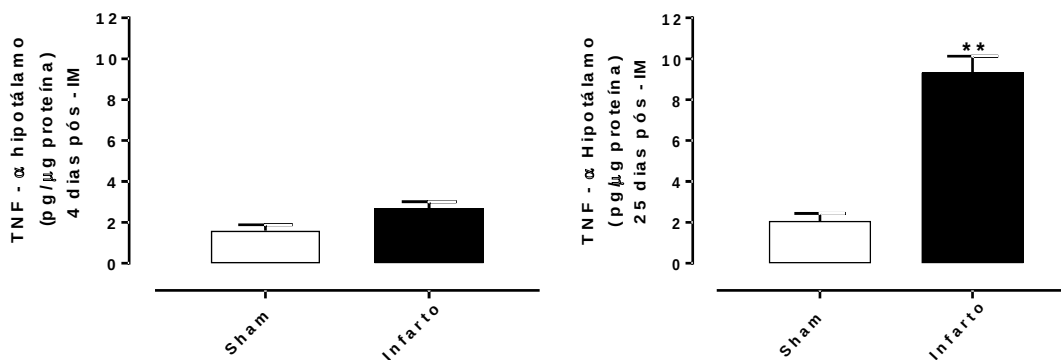


Gráfico 21A: Níveis hipotalâmicos de TNF- α pós-IM. Os animais infartados apresentaram aumento em relação aos falso operados apenas no protocolo longo. ** $p < 0,01$, teste *t-student*.

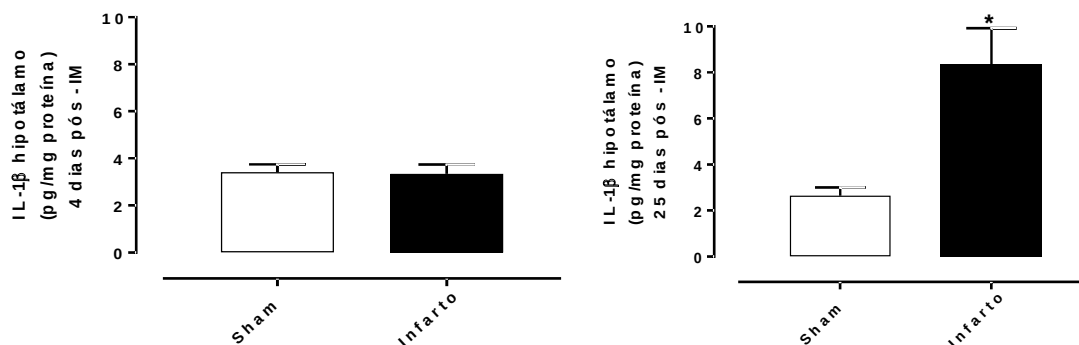


Gráfico 21B: Níveis hipotalâmicos de $IL-1\beta$ no hipotálamo pós-IM. Os animais infartados apresentaram aumento apenas no protocolo longo, como visto nos níveis de $TNF-\alpha$. * $p < 0,05$, teste *t-student*.

5.6. Efeito do IM nas concentrações plasmáticas de BDNF

A concentração plasmáticas de BDNF apresentou-se sem alterações entre os grupos no protocolo curto. Como visto nos níveis hipotalâmicos de citocinas, os animais infartados apresentaram alterações apenas no protocolo longo, com diminuição das concentrações (Figura 22)

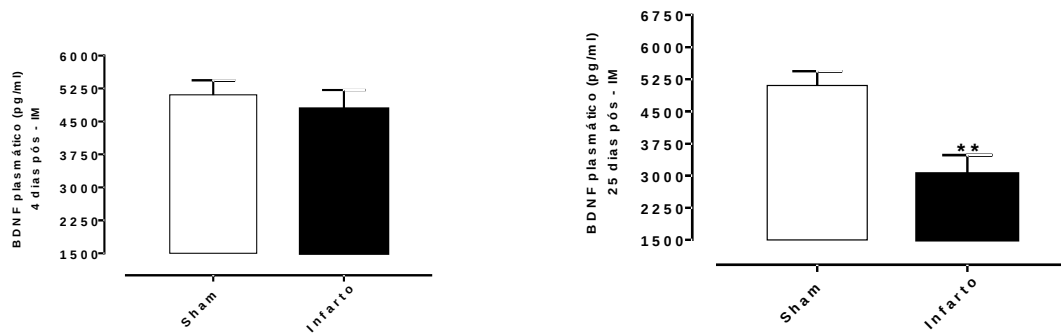


Figura 22: Concentrações plasmáticas de BDNF. Os animais infartados apresentaram diminuições das concentrações em relação aos falso operados, observada apenas no protocolo curto. ** $p < 0,01$, teste *t-student*.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, mais especificamente no protocolo longo, vinte e três dias pós – IM, os animais infartados apresentaram alterações comportamentais similares a modelos de depressão. No teste de preferência pela sacarose, o infarto induziu a diminuição pela preferência, comportamento chamado de anedonia (diminuição da busca pelo prazer). Tal comportamento é relatado em outros protocolos que utilizam o IM como modelos de depressão, como aqueles realizados por Schoemaker & Smits, 1994; Schoemaker *et al*, 1996; Saidov & Israilov, 2002. Nestes, o comportamento anedônico foi relatado a partir de duas semanas pós - isquemia, corroborando a modelos de depressão clássicos, como o de isolamento, restrição de movimentos, desamparo apreendido e àquele induzido por estresse imprevisível – *unpredictable stress*– (Willner *et al*, 1987; Vollmayr *et al*, 2003; Saenz *et al*, 2006). Os resultados no teste de campo aberto trazem informações complementares importantes, como a diminuição da exploração horizontal, representados pelo número de quadrantes percorridos e pelo tempo total de inatividade, vistos por Johnson & Grippo como um déficit motivacional.

A divisão deste experimento em dois protocolos, um curto e outro longo, algo único neste modelo, foi de extrema importância para associar as alterações comportamentais exclusivamente à depressão induzida pelo IM e não às alterações hemodinâmicas inerentes a insuficiência cardíaca induzida pelo infarto. O comprometimento físico causado pela insuficiência cardíaca após a isquemia é descartado neste experimento como causador das alterações nos testes supracitados, tendo em vista que, no protocolo curto, no qual as alterações hemodinâmicas e o remodelamento cardíaco são mais observados e o débito cardíaco é reduzido (Kishi, 2016), os animais infartados não apresentaram anedonia e diminuição da exploração. Logo, pode-se sugerir que este modelo de IM induz ao aparecimento de sinais análogos a depressão humana independente das alterações hemodinâmicas.

Como descrito por Willner *et al*, 1997, Francis *et al*, 2001 e Felder *et al*, 2003, tais alterações são engatilhadas inicialmente por uma resposta inflamatória intensa na musculatura cardíaca, induzida especificamente por fatores neurohumorais conhecidos, como mostram os gráficos 19, 20A e 20B, tanto no protocolo curto como no longo. Latini *et al*, 1994 e Neumann *et al*, 1995, mostraram que, além do aumento no tecido cardíaco, há aumento significativo das concentrações no plasma, proveniente de resposta inflamatória localizada no miocárdio, o que foi reproduzido neste experimento com as concentrações de TNF- α e IL-1 β , tanto nos protocolos curto como no longo. Johnson & Grippo, 2006, relataram que o aumento das concentrações destas citocinas pró-inflamatórias, além de outras alterações neurohumorais, induzem ao fenômeno conhecido como “estresse homeostático”, que leva ao aumento da produção e secreção de corticosterona, através de estímulo direto de receptores citocinérgicos presentes na glândula adrenal. O aumento prolongado das concentrações circulantes deste hormônio levam a uma hiperativação do eixo HPA (Turnbull & Rivier, 1999), através de um déficit no mecanismo de *feed-back* negativo, gerados por um mecanismo contra-regulatório em receptores do tipo GR1 e GR2 no hipotálamo e hipófise. Em

concordância com esta afirmativa, neste experimento, a concentração plasmática de corticosterona apresentou-se significativamente maior, nos dois protocolos. O aumento nas citocinas circulantes tanto no protocolo curto como no longo, corroborando ao relatado por Ridker *et al*, 2000, que afirma que as mesmas permanecem altas após nove meses. O aumento 25 dias pós - IM sugere que a influência direta das citocinas sobre a hiperativação do eixo HPA permaneça algum tempo após o infarto, contribuindo possivelmente às alterações comportamentais.

Ao investigar os níveis hipotalâmicos de TNF- α e IL-1 β , os ratos submetidos ao IM experimental apresentaram aumento significativo, apenas no protocolo longo, quando comparados aos animais falso operados, o que também sugere influência direta destas citocinas produzidas no SNC na atividade do eixo HPA e no comportamento, uma vez que estas dificilmente ultrapassam a barreira hematoencefálica (Banks *et al*, 1995). Turnbull e Rivier, 1999, descreveram, em modelos de estresse, algumas vias de sinalização das citocinas pró-inflamatórias periféricas no hipotálamo, como mostra a figura 5 no item 2.4.2. Dentre elas, a participação de órgãos circumventriculares como o órgão subfornicial (SFO), o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), a sinalização de intermediadores na barreira hematoencefálica e a ativação de núcleos catecolaminérgicos. Corroborando aos resultados encontrados neste experimento, usando o mesmo modelo de IM, Francis *et al*, 2004, mostraram alterações similares nos níveis hipotalâmicos de TNF- α e IL-1 β , além de IL-6. Além disso, através de estatística de correlação, mostraram relação direta do aumento dos níveis de citocinas com o aumento dos níveis de CRH.

Neste modelos de depressão pós – IM, os níveis hipotalâmicos de CRH e os níveis plasmáticos de ACTH apresentam-se significativamente aumentados apenas no protocolo longo, vinte e cinco dias pós cirurgia. A ausência de alterações no protocolo curto, juntamente com o aumento de TNF- α e IL-1 β no hipotálamo apenas no protocolo longo, sugere que o aumento central dos hormônios do eixo HPA recebe grande influência das citocinas centrais, diferentemente pelo visto nas concentrações de corticosterona, que recebe influência das citocinas plasmáticas.

O surgimento das alterações comportamentais apenas no protocolo longo, neste modelos, permite concluir que, o surgimento de sinais análogos a depressão em ratos deve-se em grande parte a alterações hipotalâmicas, mais especificamente à presença de citocinas produzidas localmente e da hiperatividade central do eixo HPA, perante o aumento das concentrações de ACTH e principalmente CRH, fato esse sugerido apenas neste trabalho.

Um dos resultados ainda pouco discutidos na literatura neste modelos de depressão induzido pelo IM é a alteração nas concentrações plasmáticas de BDNF. Esta e outras neurotrofinas são relatadas em diversos protocolos clássicos de depressão (Scaccianoci *et al*, 2006; Greenwood *et al*, 2007; Molteni *et al*, 2015). Todos, sem exceção, confirmam que a expressão desta proteína está diminuída em animais que apresentam sinais análogos a depressão. Neste modelo, as concentrações plasmáticas

apresentaram-se também significativamente menores em relação aos animais que não apresentam sinais comportamentais. Huang *et al*, 2011 e Vollmayr *et al*, 2001 relataram que, na depressão, ratos apresentam diminuição dos níveis hipocámpais e das concentrações plasmáticas de BDNF, e que no mesmo protocolo os animais apresentaram concentrações plasmáticas aumentadas de corticosterona. A relação entre BDNF e glicocorticóides é discutida na literatura, com autores defendendo uma relação inversamente proporcional entre os dois (Xu *et al*, 2006; Sertoz *et al*, 2008; Alexander *et al*, 2010). A relação desses fatores deve-se a influência direta da ativação de receptores do tipo GR1 e GR2 no hipocampo e a diminuição da expressão de BDNF (Jacob *et al*, 2006; Mao *et al*, 2012). Alguns autores ainda citam influência do CRH e ACTH em modelos de depressão nos níveis de BDNF. A partir destas afirmações, sugere-se que, neste experimento, ou seja, na depressão induzida pelo IM, as concentrações de BDNF sofram influências diretas dos níveis elevados dos três hormônios do eixo HPA, fato ainda não elucidado.

Esses dados em conjunto nos permitem concluir que o infarto do miocárdio experimental induz a comportamentos análogos a depressão, em parte devido a mecanismos inflamatórios gerados após isquemia, e que as alterações comportamentais independem de um possível comprometimento hemodinâmico que pudesse influenciar a atividade motora dos animais infartados.

Estudos adicionais serão imperativos para melhor se compreender a relação entre as doenças cardiovasculares e a depressão, no entanto, acreditamos que o presente estudo fornece informações inéditas sobre a fisiopatologia do infarto, que podem fundamentar futuras estratégias farmacológicas para diminuir a morbidade e quem sabe a mortalidade de pacientes infartados na clínica médica.

7. PERSPECTIVAS

Os dados da Imunofluorescência para Ki-67 ainda estão sendo gerados e os resultados parciais ainda estão em análise. De acordo com os resultados já gerados neste estudo, sugere-se que a neurogênese no hipocampo de ratos submetidos ao IM experimental esteja suprimida, fato ocasionado pela ativação dos mecanismos neuroimunohumorais supracitados no trabalho, justificando as alterações comportamentais observadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Almeida J](#), [Duarte JO](#), [Oliveira LA](#), [Crestani CC](#). Effects of nitric oxide synthesis inhibitor or fluoxetine treatment on depression-like state and cardiovascular changes induced by chronic variable stress in rats. [Stress](#) 18(4), 462-74, 2015.

Alexander N, Osinsky R, Schmitz A, Mueller E, Kuepper Y, Hennig J. The BDNF Val66Met polymorphism affects HPA-axis reactivity to acute stress. *Psychoneuroendocrinology*, 35(6), 949-953, 2010.

Anisman H, Merali Z, Hayley S. Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. *Progress in neurobiology*, 85 (1), 1-74, 2008.

Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal behaviour*, 21(2), 205-235, 1973.

Banks W, Plotkin SR, Kastin AJ. Permeability of the blood-brain barrier to soluble cytokine receptors. *Neuroimmunomodulation*, 2(3), 161-165, 1995.

Bantsiele GB, Bentué-Ferrer D, Saïkali S, Laviolle B, Bourin M, Reymann JM. Behavioral effects of four antidepressants on an ischemic rat model of emotional disturbances. *Behav Brain Res*, 201(2), 265-71, 2009.

Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO Journal*, 1(5), 549-53, 1982.

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

Béjot Y, Prigent-Tessier A, Cachia C, Giroud M, Mossiat C, Bertrand N, Marie C. Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochemistry international*, 58(1), 102-111, 2011.

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

Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity?. *Psychopharmacology*, 94(2), 147-160, 1988.

Brown ES, Rush AJ, McEwen B. Hippocampal remodelling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. *Neuropsychopharmacol*, 21(4), 474-84, 1999.

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

Casarotto PC, Andreatini R. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. *Eur Neuropsychopharmacol*, 17, 735-42, 2007.

Castagné V, Moser P, Roux S, Porsolt RD. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci*, 55 (8.10), 11-18, 2011

Ceccatelli S, Eriksson M, Hokfelt T. Distribution and coexistence of corticotropin-releasing factor-, neurotensin-, enkephalin-, cholecystokinin-, galanin- and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine-like peptides in the parvocellular part of the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*, 49, 309-323, 1989.

Chao HM, Sakai RR, Ma LY, McEwen BS. Adrenal steroid regulation of neurotrophic factor expression in the rat hippocampus. *Endocrinology* 139, 3112-3118, 1998.

Chung, Eugene S. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor- α , in patients with moderate-to-severe heart failure results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart failure (ATTACH) Trial. *Circulation* 107(25), 3133-3140, 2003.

Cohen MC, Cohen S. Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol* May, 105(5), 589-98, 1996

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 research*, 743(1), 77-85, 1996.

Coyle JT, Duman RS. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron*, 38, 157-160, 2003

Crupi R, Mazzon E, Marino A, La Spada G, Bramanti P, Cuzzocrea S, et al. Melatonin treatment mimics the antidepressant action in chronic corticosterone-treated mice. *J Pineal Res*, 49, 123–9, 2010.

Cush JJ. Unusual toxicities with TNF inhibition: heart failure and drug-induced lupus. *Clinical and experimental rheumatology*, 22, 141-147, 2004.

Daskalakis NP, De Kloet ER, Yehuda R, Malaspina D, Kranz TM. Early Life Stress Effects on Glucocorticoid-BDNF Interplay in the Hippocampus, 16, 8:68, 2015.

Del Porto, José Alberto. Conceito e diagnóstico. *Rev Bras Psiquiatr*, 21(1), 1999.

Dolotov OV. Semax, an analog of ACTH (4–10) with cognitive effects, regulates BDNF and trkB expression in the rat hippocampus. *Brain research*, 1117(1), 54-60, 2006.

Dhar AK, Barton DA. Depression and the Link with Cardiovascular Disease. *Front Psychiatry*, 21, 7-33, 2016

DSM-V-TR- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.

Du J, Zhang D, Yin Y, Zhang X, Li J, Liu D, Pan F, Chen W. The Personality and Psychological Stress Predict Major Adverse Cardiovascular Events in Patients With Coronary Heart Disease After Percutaneous Coronary Intervention for Five Years. *Medicine (Baltimore)* 95(15), 3364, 2016

Duman RS, Malberg J, Nakagawa S, D'Sa C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biological Psychiatry*, 48(8), 732-9, 2000.

Duman, R.S, Nakawa, S, Mayber J. Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacol*, 25, 836-44, 2001.

Dwived Y, Rizavi HS, Pandey GN. Antidepressants reverse corticosteronemediated decrease in brain-derived neurotrophic factor expression: differential regulation of specific exons by antidepressants and corticosterone. *Neuroscience*, 139, 1017–29, 2006.

Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, Manji HK, Chen G. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood regulation. *Journal of Neuroscience*, 23, 7311-7316, 2003.

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

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.

Felder RB, Francis J, Zhang ZH, Wei SG, Weiss RM, Johnson AK.. Heart failure and the brain: New perspectives. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284, 259–276, 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.

Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol*, 90, 57-70, 1978.

Francis J, Weiss RM, Johnson AK, Felder RB. Central mineralocorticoid receptor blockade decreases plasma TNF-alpha after coronary artery ligation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284(2), 328-35, 2003

Francis J, Chu Y, Johnson AK, Weiss RM, Felder RB. Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(6), 2264-71, 2004a.

Francis J, Zhang ZH, Weiss RM, Felder RB. Neural regulation of the proinflammatory cytokine response to acute myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287(2), 791-7, 2004b.

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

Frey BN. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life sciences*, 79(3), 281-286, 2006.

Galuppo P, Bauersachs J. Mineralocorticoid receptor activation in myocardial infarction and failure: recent advances. *Eur J Clin Invest* Oct, 42(10), 1112-20, 2012.

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

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

Gotz R, Koster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharl M. and Thoenen H, Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*, 372, 266-269, 1994.

Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F, Donat O, Eker C, Vahip S. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 255(6), 381-386, 2005.

Gould E, Tanapat P. Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* Dec 1; 46(11), 1472-9, 1999.

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

Gray J, McNaughton N. *The neuropsychology of anxiety*. 2nd edition. Oxford: Oxford University Press, 2-36, 2000.

Greenwood D, Jagger DJ, Huang LC, Hoya N, Thorne PR., Wildman SS, Housley GD. P2X receptor signaling inhibits BDNF-mediated spiral ganglion neuron development in the neonatal rat cochlea. *Development*, 134(7), 1407-1417, 2007.

Grippe, AJ. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. *Physiology&Behavior*,84(5),697-706,2005.

Helwig BG, Musch TI, Craig RA, Kenney MJ. Increased interleukin-6 receptor expression in the paraventricular nucleus of rats with heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physio*, 292(3), 1165-73, 2007.

Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Trends Neurosci*, 20, 78-84, 1997.

Huang EJ, Reichardt LF. TRK receptors : Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 609-642, 2003.

Huang Z, Zhong XM, Li ZY, Feng CR., Pan AJ, Mao QQ. Curcumin reverses corticosterone-induced depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels in rats. *Neuroscience letters*, 493(3), 145-148, 2011.

Hwang, In Koo. Enhanced cell proliferation and neuroblast differentiation in the rat hippocampal dentate gyrus following myocardial infarction. *Neuroscience letters*, 450(3), 275-280, 2009.

Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation*, 99(11), 1492-8, 1999.

Jacobsen JP, Mork A. Chronic corticosterone decreases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in the hippocampus, but not in the frontal cortex of the rat. *Brain Res*, 1110:221-5, 2006.

Jeanneteau FD. BDNF and glucocorticoids regulate corticotrophin-releasing hormone (CRH) homeostasis in the hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), 1305-1310, 2012.

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

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

Kala P, Hudakova N, Jurajda M, Kasperek T, Ustohal L, Parenica J, Sebo M, Holicka M, Kanovsky J. Depression and Anxiety after Acute Myocardial Infarction Treated by Primary PCI. *PLoS One*, 13, 11(4), 2016.

Kaloustian S. Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat. *Brain research*, 1216, 87-91, 2008.

Kaufman N, Gavan TL, Hill RW. Experimental myocardial infarction in the rat. *AMA Arch Pathol*, 67, 482-488, 1959.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386 (6624): 493-5, 1997.

Kishi T. Heart Failure as a Disruption of Dynamic Circulatory Homeostasis Mediated by the Brain. *Int Heart J*, 57(2), 145-9, 2016.

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*, 2011.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*, 16(6), 2027-33, 1996.

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.

Lathe R. Hormone and hippocampus. *J Endocrinol*, 169,205-31, 2001.

Latini R, Bianchi M, Correale E, Dinarello CA, Fantuzzi G, Fresco C, Shapiro L. Cytokines in acute myocardial infarction: selective increase in circulating tumor necrosis factor, its soluble receptor, and interleukin-1 receptor antagonist. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 23(1), 1-6, 1994.

Lessmann V, Gottmann K, Malsangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology*, 69, 341-374, 2003.

Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *The journal of experimental zoology*, 116(2), 321-61, 1951.

Lindsay RM, Wiegand SL, Altar CA and DiStefano PS, Neurotrophic factors: from molecule to man, *Trends Neurosci*, 17, 182-190, 1994.

Li S, Wang C, Wang M, Li W, Matsumoto K, Tang Y. Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. *Life Sci*, 15, 1373-81, 2007.

Lupien SJ, De Leon M, De Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NPV, Thakur M, McEwen B, Hauger R, Meaney MJ. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neurosci*, 1(1), 69-72, 1998.

Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, Wihler C, Koliatsos VE, Tessarollo L, Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96, 15239-15244, 1999.

Magariños AM, Verdugo JM, McEwen BS. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci.*, 94, 14002-8, 1997.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 20(24), 9104-10, 2000.

Mao QQ, Xian YF, Ip SP, Tsai SH, Che CT. Long-term treatment with peony glycosides reverses chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior via increasing expression of neurotrophins in rat brain. *Behav Brain Res*, 210, 171-7, 2010.

Mao QQ, Huang Z, Ip SP, Xian YF, Che CT. Peony glycosides reverse the effects of corticosterone on behavior and brain BDNF expression in rats. *Behavioural brain research*, 227(1), 305-309, 2012.

Martinowich K, Manji H, Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci*, 10(9), 1089-93, 2007.

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*, 58(2), 59-69, 1999.

McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*, 886,172-89, 2000.

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, 1307-1315, 2000.

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

Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M. Mechanism of TrkB - mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 36(1), 121-37, 2002.

Molteni R, Rossetti AC, Savino E, Racagni G, Calabrese F. Chronic mild stress modulates activity-dependent transcription of BDNF in rat hippocampal slices. *Neural plasticity*, 2015.

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

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*, 34, 13-25, 2002.

Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M, Schömig A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation*, 92(4), 748-755, 1995.

Nostramo R, Serova L, Laukova M, Tillinger A, Peddu C, Sabban EL. Regulation of nonclassical renin-angiotensin system receptor gene expression in the adrenal medulla by acute and repeated immobilization stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 308(6), 517-29, 2015.

Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*, 15(11), 7539-47, 1995 .

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

Olivares EL, Ribeiro VP, de Castro JPW, Ribeiro KC, Mattos EC, Goldenberg RC, Masuda MO. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 287(2), 464-470, 2004.

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, Silva-Almeida C, Pestana FM, Sonoda-Côrtes R, Araujo IG, Rodrigues N C, Rocha FF. Social stress-induced hypothyroidism is attenuated by antidepressant treatment in rats. *Neuropharmacology*, 62(1), 446-456, 2012.

O'Neil A, Fisher AJ, Kibbey KJ, Jacka FN, Kotowicz MA, Williams LJ, Stuart AL, Berk M, Lewandowski PA, Taylor CB, Pasco JA. Depression is a risk factor for incident coronary heart disease in women: An 18-year longitudinal study. *J Affect Disord*, 15, 117-24, 2016.

Ono, Koh. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation*, 98(2), 149-156, 1998.

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

Oswaldo AK, Lourenço MD. Estratificação do risco cardiovascular; a hipertensão e o risco de doença cardiovascular. *Jornal Angolano de Saúde*. Vol 1/1, 2016.

Otten U, Baumann JB, Girard J. Stimulation of the pituitary-adrenocortical axis by nerve growth factor. *Nature*, 282(5737), 413-4, 1979.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circulation research*, 44(4), 503-512, 1979.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation*, 72, 406-412, 1985.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol*, 260, 1406-1414, 1991.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*, 47, 379-391, 1978.

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.

Rang HP, Dale JM., Rittier JM. Rang and Dale's: Pharmacology. 6ed. Nova Iorque: Churchill/Livingstone, 2006.

Rantamäki T, Knuutila JEA, Hokkanen ME, Castrén E. The effects of acute and long-term lithium treatments on TrkB neurotrophin receptor activation in the mouse hippocampus and anterior cingulate cortex. *Neuropharmacology*, 50, 421- 427, 2006.

Ridker, P. M., Rifai, N., Pfeffer, M., Sacks, F., Lepage, S., Braunwald, E., & Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*, 101(18), 2149-2153, 2000.

Riedel G, Micheau J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 25(4), 835-53, 2001.

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

Saaralainen T, Hendolin P, Lucas G, Koponen E, Sairane M, MacDonald E, Agerman K, Haapasalo A, Nawa H, Aloyz R, Ernfors P, Castre E. Activation of the trkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and requires for antidepressant-induced behavioural effects. *J Neurosci*, 23(1), 349-57, 2003.

Sáenz JCB, Villagra OR, Trías JF. Factor analysis of forced swimming test, sucrose preference test and open field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behavioural brain research*, 169(1), 57-65, 2006.

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

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.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressant. *Science*, 301, 805-9, 2003.

Sapolski RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci*, 10(9), 2897-902.

Sapolski RM. Stress, Glucocorticoids, and Damage to the Nervous System: The Current State of Confusion. *Stress*, 1(1), 1-19, 1996

Scaccianoce S, Del Bianco P, Paolone G, Caprioli D, Modafferi AM, Nencini P, Badiani A. Social isolation selectively reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor without altering plasma corticosterone. *Behavioural brain research*, 168(2), 323-325, 2006.

Schaaf MJ, de Jong J, de Kloet ER, Vreugdenhil E. Downregulation of BDNF mRNA and protein in the rat hippocampus by corticosterone. *Brain Res*, 813, 112-20, 1998.

Scheuer DA, Mifflin SW. Repeated intermittent stress exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*, 274, 470-475, 1998.

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.

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

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*, **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*, **298(1)**, 17-25, 1996.

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

Selye H. Stress and disease. *Trans Am Laryngol Rhinol Otol Soc*, 312-326, discussion, 326-319, 1955.

Selye H. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*, 11(5), 1960.

Sertoz OO, Binbay IT, Koylu E, Noyan A, Yıldırım E, Mete HE. The role of BDNF and HPA axis in the neurobiology of burnout syndrome. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(6), 1459-1465, 2008.

Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(9), 3908-13, 1996.

Sheline YI, Gado M, Kraemer HC. Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry*, 160, 1516-8, 2003.

Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biological Psychiatry*, 54(1), 70-5, 2003.

Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhae M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410, 372-6, 2001.

Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav* 56, 131-137, 1997.

Smith MA, Makino S, Kim SY, Kvetnansky R. Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*, 136, 3743-3750, 1995.

Snyder JS, Kee N, Wojtowicz JM. Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol*, 85, 2423-31, 2001.

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.

Stevenson JA, Feleki V, Rechnitzer P, Beaton JR. Effect of exercise on coronary tree size in the rat. *Circulation Research*, 15(3), 265-269, 1964.

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.

Tanapat P, Galea LA, Gould E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci*, 16(3-4), 235-9, 1998.

Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol*, 25(2), 77-107, 2004.

Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Cytokines: Actions and Mechanisms of Action. *Physiol Rev*, 79, 1, 1999.

van der Staay JJ, Kerbusch S, Raaijmakers W. Genetic correlations in validating emotionality. *Behavior genetics*, 20(1), 51-62, 1990.

van Praag H, Korf J. Endogenous depression with and without disturbances of 5-hydroxytryptamine metabolism: a biochemical classification? *Psychopharmacol*, 19, 148-152, 1971.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* Mar, 2(3), 266-70, 1999.

van Praag H, Schinder AF, Chistie B, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 2002, 415, 1030-5.

Vollmayr B, Faust H, Lewicka S, & Henn FA. Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF) stress response in rats bred for learned helplessness. *Molecular psychiatry*, 6(4), 471-474, 2001.

Vollmayr B, Henn FA. Stress models of depression. *Clinical Neuroscience Research*, 3(4), 245-251, 2003.

Walz R, Lenz G, Roesler R, Vianna MMR, Marins V, Brentani R, Rodnight R, Izquierdo I. Time-dependent enhancement of inhibitory avoidance retention and MAPK activation by post-training infusion of nerve growth factor into CA1 region of hippocampus of adult rats. *European Journal of Neuroscience*, 12, 2185-2189, 2000.

Wann BP, Bah TM, Boucher M, Courtemanche J, Le Marec N, Rousseau G, Godbout R. Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression. *J Psychiatry Neurosci*, 32, 11-16, 2007.

Watson S, Mackin P. HPA axis function in mood disorders. *Psychiatry*, 5, 166-70, 2007.

Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93(3), 358-364, 1987.

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

Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 134, 319-329.

Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 2005

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

WHO - World Health Organization. Integrated Management of Cardiovascular Risk: Report of a WHO Meeting. Geneva, 2002

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, 2008.

Wozniak G, Toska A, Saridi M, Mouzas O. Serotonin reuptake inhibitor antidepressants (SSRIs) against atherosclerosis. *Med Sci Monit* Sep, 17(9), 205-14, 2011.

Xu Y, Ku B, Tie L, Yao H, Jiang W, Ma X, Li X. Curcumin reverses the effects of chronic stress on behavior, the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of CREB. *Brain research*, 1122(1), 56-64, 2006.

Yu IT, Lee SH, Lee YS, Son H. Differential effects of corticosterone and dexamethasone on hippocampal neurogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 317, 484-90, 2004.

Zalcman S. Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1,-2 and-6. *Brain research*, 643(1), 40-49, 1994.

Zornoff, L. Infarto do miocárdio experimental em ratos: análise do modelo. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2009.

Zuccato C, Cattaneo E. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology*, 81(5-6), 294-330, 2007.